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

Influencia del "heat shocking" en la producción de acetimetilcarbinol por el Bacillus polymyxa

Mardyks, Esther

1953

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:
Mardyks, Esther. (1953). Influencia del "heat shocking" en la producción de acetimetilcarbinol por el Bacillus polymyxa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0750_Mardyks.pdf

Cita tipo Chicago:
Mardyks, Esther. "Influencia del "heat shocking" en la producción de acetimetilcarbinol por el Bacillus polymyxa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1953. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0750_Mardyks.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

FCEFN-BA.

INFLUENCIA DEL "HEAT SHOCKING" EN LA PRODUCCION DE ACETILMETILCARBINOL POR EL BACILLUS POLYMYXA

Tesis para optar al título de Doctor en Química
presentada por

ESTHER MARDYKS

R E S U M E N

Se aplicó el método del "Heat shocking" a cinco cultivos de Bacillus polymyxa esporulados, con el propósito de inducirles una mayor resistencia al calor, y lograr así una mayor producción de acetilmetilcarbinol (AMC). Se usó para esto dos técnicas diferentes: la de Weizmann, que consiste en someter a un cultivo esporulado a 100° C, durante cinco minutos y luego enfriarlo bruscamente. Por este procedimiento selectivo, mueren las formas vegetativas y esporas débiles, sobreviviendo sólo las esporas más resistentes. Y la técnica propuesta por Sordelli, que modifica la anterior, haciendo un pasaje por tierra después de cada "heat shocking".

Los resultados obtenidos fueron juzgados por la inducción de una mayor resistencia al calor y por la producción de AMC; para lo cual se hicieron determinaciones cuantitativas del mismo - por el método volumétrico de Langlykke y Peterson- en los cultivos fermentados por las cinco cepas de Bacillus polymyxa, antes y después de sometidas a la acción del choque térmico, ya por la técnica de Weizmann, ya por la de Sordelli.

T. 7 : 750

TESIS: 750

FCEFN-BA.

1ª) No fué observada ninguna modificación ostensible de la resistencia al calentamiento.

2ª) No se observaron modificaciones de los caracteres morfológicos y de cultivo.

3ª) Parecería verosímil que la propiedad de resistir al calor está gobernada por variables que no son simplemente la selección de esporas más resistentes.

4ª) La falta de modificación de las propiedades morfológicas tuvo su paralelo también en la falta de cambio de la producción del ABC.

Esther Reardon de Palma

MINISTERIO DE EDUCACION
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUIMICA

INFLUENCIA DEL "HEAT SHOCKING" EN LA PRODUCCION DE ACETILMETILCARBINOL POR EL BACILLUS POLYMYXA

Tesis para optar al título de Doctor en Química
presentada por

E S T H E R M A R D Y K S

- 1 9 5 3 -

TESIS 750

Tesis 750

FCEFN-BA.

I N D I C E

		Página
I.-	Introducción	4
II.-	"Heat shocking" - Antecedentes	5
III.-	Bacteria usada	10
IV.-	Medios de cultivo	13
V.-	Parte experimental	15
a)	Fermentación	15
	Esporulación	15
	"Heat shocking" :	16
	Técnica de Seizmann	17
	Técnica de Sordelli	21
	Comparación de las dos técnicas	23
b)	Determinación cuantitativa del acetilmetilcarbinol	24
	Acetilmetilcarbinol	24
	Métodos cuantitativos - Antecedentes	35
	Experimentación: aparato, reactivos, procedimiento	38
	Fermentación	40
	Cálculos	42
VI.-	Discusión. Resumen y conclusiones	47
VII.-	Bibliografía	49

FCEFN-BA.

Queremos expresar aquí, antes de entrar en materia, nuestro más sincero agradecimiento al Profesor Doctor Alfredo A. Sordelli, quien nos ha propuesto el tema de esta tesis, guiándonos con sus enseñanzas y consejos, para nosotros de inestimable valor. Al Profesor Doctor Raul Ferramola, padrino de esta tesis, quien tuvo la gentileza de corregirla. A las Doctoras Nélida Giambiagi y Sara Hebe Goldemberg, por habernos cedido las cepas estudiadas y el material para la determinación cuantitativa del acetilmetilcarbinol, respectivamente. A todos los que directa o indirectamente han contribuído en la ejecución de este trabajo.

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

El acetilmetilcarbinol o acetoína, se halla en cantidades variables entre los productos de fermentación de una gran variedad de cultivos bacterianos. Así, hay bacterias que producen cantidades muy pequeñas, 50 mg. o aún menos por litro de cultivo; otras de 150 a 200 mg. por litro y, por fin, aquellas que como el Bacillus polymyxa llegan a producir, según las cepas, más de un gramo por litro, dependiendo de las condiciones experimentales elegidas.

Si bien es cierto que la aplicación industrial del acetilmetilcarbinol (AMC) es por el momento de escaso valor, en cambio, por ser fácil de caracterizar, constituye un test bacteriológico muy importante para la identificación de distintas especies bacterianas.

Es por ello, que el estudio de este cuerpo, sus propiedades, caracterización, determinación cuantitativa, su origen en las fermentaciones, etc., ha sido realizado por numerosos investigadores.

En este trabajo de tesis, hemos querido estudiar la posibilidad de aumentar la producción de AMC, sometiendo a las bacterias a la influencia del "heat shocking" o choque térmico, eligiendo para ello, especialmente, el Bacillus polymyxa, por su doble condición de esporulado y gran productor de acetoína.

CAPITULO II

"H E A T S H O C K I N G" - A N T E C E D E N T E S

Cuando durante la primera guerra mundial, la escasez de acetona hizo movilizar a muchos investigadores en la búsqueda de nuevos procedimientos para su obtención en gran escala, Chaim Weizmann, en Inglaterra, encontró un método que llamó "heat shocking" y que aplicado por él al Clostridium acetobutylicum, mejoró notablemente su habilidad fermentativa, en el sentido de dar una mayor producción de solventes.

El "heat shocking" o choque térmico, es un procedimiento por el cual las células vegetativas y esporas débiles son destruídas, quedando sólo las esporas más resistentes.

Consiste en someter un cultivo esporulado a una temperatura de 100° centígrados durante unos minutos y luego enfriarlo rápidamente.

Weizmann (110,111,112) señala que los mayores productores de solventes son aquellos cultivos cuyos esporos son más resistentes al calor y declara además que sometió a sus cultivos a 100-150 "heat shocking", alternando este tratamiento con repetidos subcultivos de los esporos sobrevivientes luego de cada choque térmico.

El primero en comprobar la modificación del metabolismo de un cultivo por medio de repetidos subcultivos, fué probablemente M.L.Grimbert (33), en el año 1893, quién estudió la fermentación producida por un bacilo productor de alcohol butílico. Observó que los cultivos en un medio con glucosa, producían una cierta cantidad de ese alcohol, cantidad que se aumentaba, después de

repetidos subcultivos en un medio poco apto para la obtención de ese alcohol como es la inulina, y viceversa, después de repetidos subcultivos en un medio con glucosa, esa bacteria fermentaba a la inulina más intensamente que al principio. A raíz de esta observación supone que no todos los bacilos de una generación están dotados de la misma actividad, ni de la misma resistencia y que por una verdadera selección sólo subsisten aquellos que pueden resistir un medio poco favorable.

La aclimatación de cultivos de distintos organismos para crecer o fermentar en medios que contienen substancias que les son desfavorables o que son mal utilizadas, ha sido frecuentemente referido. así Effront (23), en 1894, estudió el acostumbramiento de algunos fermentos (levadura de cerveza, fermentos láctico y butírico) a compuestos de flugr, observando posteriormente (24), en 1920, la tolerancia adquirida por los microorganismos hacia substancias tóxicas (arsénico), señalando que el mecanismo de esta tolerancia depende de la selección y no de una verdadera inmunización. También Fulmer (25), en 1921, aclimató levaduras para crecer en presencia de fluoruro de amonio.

En general ha sido observado que subcultivos repetidos en presencia de un carbohidrato desfavorable, resulta en un aumento de la habilidad para utilizar ese carbohidrato particular: Patwardhan (73), en 1930, usó este procedimiento para aclimatar al Bacillus acetoethylicus a un medio con altas concentraciones de pentosas en el cual no desarrollaba.

En el caso de la fermentación acetobutílica, la observación hecha independientemente por distintos investigadores, de que un cultivo de Clostridium acetobutylicum, luego de sucesivos transplantes disminuye su rendimiento en solventes, contraria-

mente a lo que se podría esperar, dió lugar a que Weizmann usara sucesivamente ambas técnicas: la del "heat shocking" como método selectivo de las esporas más resistentes al calor , y la técnica de los subcultivos repetidos. Es así que cultivos poco fermentadores pueden ser notablemente mejorados por repetido crecimiento, esporulación e "heat shocking".

Legg (56),en 1928, dice haber utilizado con éxito este tratamiento sobre cultivos perezosos.

Meyer y Mettger (114) en 1927, trabajando con seis cepas de Clostridium acetobutylicum obtuvieron por este método, y luego de un período de dos años, un aumento promedio en la producción de solventes superior al cien por ciento. Observaron que un almacenaje de los esporos por un período mayor de seis meses, daba lugar aparentemente a una disminución de su poder de producir solventes. Sin embargo, era posible rejuvenecer estos cultivos por "pasteurización" y subcultivos alternados.

Barffus (7) en 1937, cultiva las esporas de una variedad del Bacillus amylobacter A.M.Bredemann, primero en un medio neutro o alcalino que favorezca el crecimiento y la esporulación. Destruye luego las formas vegetativas por un breve calentamiento a alrededor de 90ª-C y cultiva las esporas en un medio no neutralizado o sea ácido. Esto lo repite alternativamente varias veces, siendo las esporas, en cada repique, cultivadas con una acidez mayor.

Por lo que se ha visto, la mayoría, sino todos los trabajos o patentes publicados que hablan sobre el "heat shocking", se refieren al Clostridium acetobutylicum. Nosotros no hemos hallado en la bibliografía, ninguna publicación sobre experiencias que usen el choque térmico sobre otras bacterias, con excepción de un trabajo de Blackwood, Wheat, Leslie, Ledingham y Simpson(13)

en 1949, sobre fermentación de maíz por el Bacillus polymyxa con miras de obtener una mayor producción del 2-3-butilene-glicol, y en el cual dicen haber ensayado el "heat shocking" sobre cultivos esporulados de esta bacteria, pero con poco éxito, pues los resultados fueron bajos e inseguros.

Otro trabajo publicado en 1946 por Kooi (52), sobre fermentación de medios de maíz por Aerobacillus polymyxa, señala igualmente que obtuvo poco efecto el ensayo de la subcultivación del organismo en la producción de 2-3-butilene-glicol.

En cuanto a la resistencia de las esporas bacterianas al calor, pocos trabajos han sido publicados hasta ahora que se refieren a un aumento de la resistencia de las mismas bajo ciertas condiciones de selección artificial. Así, podemos citar los realizados por Bigelow y Esty (10) en 1920, quienes por repetidos subcultivos de suspenciones de esporas sobrevivientes de termófilas obligadas, consiguieron aumentar su resistencia al calor.

En 1926, Magoon (64) demuestra haber conseguido un aumento de dos a cuarenta y cuatro minutos a 100° C con esporas de Bacillus mycoides, y O.B.Williams (117) en 1929, observa también un aumento en el caso del Bacillus subtilis de treinta y ocho a cincuenta y cuatro minutos a 95°C.

Otros investigadores, en cambio, no obtuvieron éxito: Sommer (92) en 1930, señala que el Clostridium botulinum no muestra tendencia a aumentar su resistencia al calor; Morrison y Rettger (67) en 1930, trabajando con dos bacterias mesofílicos esporuladas de la leche, no observaron variación luego de intentar durante seis meses modificar su resistencia al calor.

Rahn (82) en 1932, 1943, 1945, por otra parte, cree que los últimos sobrevivientes no son más resistentes que el término medio, habiendo sobrevivido el período de calentamiento sólo por

casualidad.

F.T.Williams (116) en 1936, hizo ensayos con las siguientes bacterias: B. subtilis, B. mycoides, Clostridium pasteurianum, Clostridium botulinum y Clostridium sporogenes. Luego de ocho a diez series selectivas, dice no haber observado un aumento significativo con excepción del Bacillus mycoides (de 10 a 25 minutos a 100ª C). Señala además que no halló ninguna relación entre la edad de las esporas y su resistencia al calor.

Knaysi (49) en 1948, considera que la resistencia de las esporas en una especie dada no es un valor fijo. Davis y O.B.Williams (17) en 1948, realizaron experiencias en el mismo sentido con el Bacillus lobigii, llegando a la conclusión por los resultados obtenidos, que entre los esporos de una población bacteriana, existe una resistencia graduada al calor.

CAPITULO III

B A C T E R I A U S A D A

El Bacillus polymyxa ha sido descripto, entre otros autores, por Donker (20), Porter, Mc Cleskey y Levine (77) y Ledingham, Adams y Stanier (55). Su estudio bacteriológico se remonta a los tiempos de Prazmowski (79) en 1880, pero la naturaleza de la fermentación hidrocarbonada que realiza, fué recién establecida por primera vez por Donker en 1926.

La investigación bioquímica de la fermentación que lleva a cabo este organismo, fué iniciada en 1942 por Stahly y Perkman (94) y se continúa por los trabajos de Adams y Stanier (3), Adams (1), y Dyson Rose (83).

El Bacillus polymyxa es un bacilo gram negativo, esporulado, aerobio y anaerobio facultativo. Las formas vegetativas que miden aproximadamente de 1,4 a 8 micrones, son móviles con flagelos perítricos. Se autolisan con bastante rapidez a medida que los cultivos envejecen, cuando no tiene lugar la formación de esporas (55). Estas son grandes, elípticas, terminales y subterminales del tipo clostridio.

La mayoría de las cepas fermentan arabinosa, celobiosa, dextrina, galactosa, glucosa, inulina, lactosa, levulosa, manitol, manosa, rafinosa, sorbitol, trehalosa, xilosa y almidón.

Algunas cepas fermentan ramnosa, según Ledingham, Adams y Stanier (55); en cambio Porter, Mc Cleskey y Levine (77), no hallaron entre las cepas que estudiaron, ninguna capaz de fermentar la ramnosa. No fermentan al dulcitol e inositol.

Todas las cepas licúan la gelatina, producen catalasa, reducen

los nitratos a nitritos y dan la reacción Voges-Proskauer positiva.

No producen ácido sulfhídrico.

La temperatura óptima para su desarrollo es de 30°C.

Los principales productos que forman en la fermentación hidrocarbonada son: 2-3-butilene-glicol, etanol, acetoína e hidrógeno.

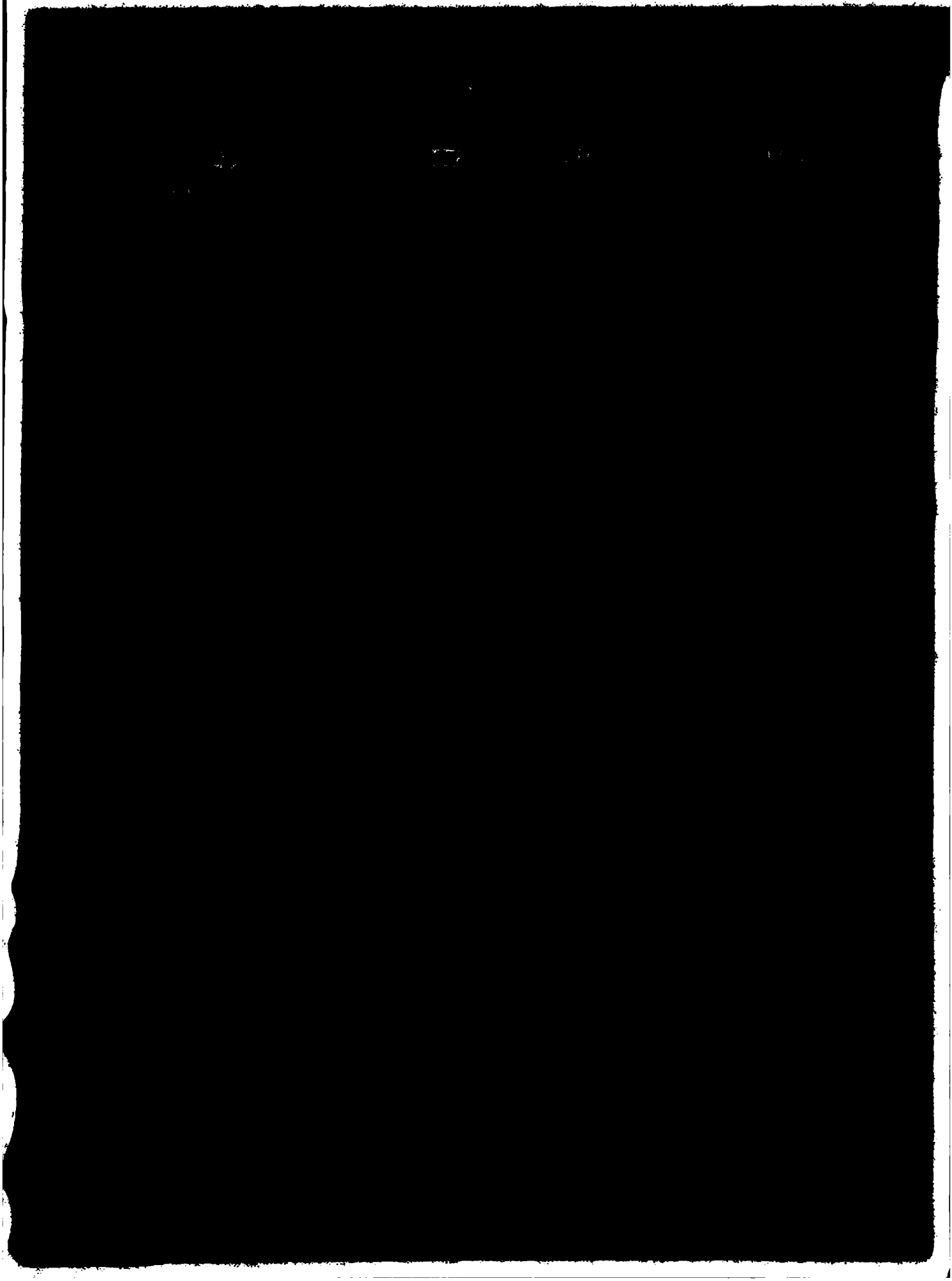
El Bacillus polymyxa puede ser aislado de una gran variedad de fuentes naturales como ser tierra, agua, leche, granos, y heces y de plantas frescas y en descomposición.

Se ha observado que la mayoría de las cepas de esta bacteria presentan el fenómeno de la disociación, es decir, de dar origen a varios tipos distintos de colonias, según Stanier, Adams y Ledingham (96). N.Giambiagi (32) sólo observó dos tipos de colonias, lo cual coincide también con lo observado por Moscotti (65).

Nosotros también pudimos observar estos dos tipos distintos de colonias, al sembrar el bacilo en placas de Petri con agar-extracto de carne: unas blancas, circulares, convexas y brillantes (mucosas) y las otras transparentes (azuladas), circulares y planas.

En la observación microscópica de los dos tipos de colonias, coloreadas por el método de Gram-Kopeloff, pudimos comprobar que las bacterias correspondientes a las colonias blancas estaban casi todas esporuladas; en cambio, las correspondientes a las colonias transparentes eran bastones sin esporular. Esto ya había sido observado también por Giambiagi y por Moscotti.

En nuestro trabajo hemos usado cinco cepas de Bacillus polymyxa, aisladas por la Dra. Nélida Giambiagi, quien nos las cedió gentilmente. Estas cepas son las numeradas 1, 3, 5, 7, y 9.



CAPITULO IV

M E D I O S D E C U L T I V O

El medio de cultivo usado por nosotros para el Bacillus polymyxa, consistía en avena al 5% y fosfato dipotásico al 0,1%.

La avena fué molida previamente en un mortero con el objeto de obtener una mayor dispersión de la misma en el volumen total de líquido. Se agregó luego el fosfato dipotásico y el agua destilada.

La suspensión fué calentada de treinta a cuarenta y cinco minutos, a llama moderada, agitando continuamente, para favorecer la gelatinización de los ingredientes y evitar así el estallido de los granos de almidón durante la esterilización.

A pesar de este calentamiento con agitación, sugerido por Ledingham, Adams y Stanier (55), quienes lo usaron para granos de trigo, no pudimos evitar del todo, durante la esterilización, el humedecimiento de los tapones de algodón de los tubos de ensayo.

Decidimos entonces esterilizar primero todo el medio de cultivo preparado en un balón grande; distribuírlo luego en los tubos y volver éstos a esterilizar. Pero igualmente aparecían mojados los tapones, de manera que optamos por seguir usando elprimer procedimiento, ya que el uso de los tapones mojados no nos trajo ningún inconveniente, con la ventaja de realizar así una sola esterilización.

Para que la distribución en los tubos fuera lo más uniforme posible y debido a la naturaleza del medio de cultivo, tuvimos la precaución de agitar el recipiente cada vez que retirábamos con pipeta el volumen de líquido necesario.

La esterilización fué realizada en autoclave a 120° C (1 atmósfera) durante treinta minutos.

Tierra estéril:

Los cultivos de Bacillus polymyxa, fueron inoculados en tierra estéril (¹), para favorecer la esporulación y la ulterior conservación de los esporos. Aquella fué preparada de la siguiente manera: la tierra de jardín fué secada previamente en la estufa, luego desmenuzada, distribuída en tubos de ensayo, en cantidades de 2 y 1 gramo (para el cultivo madre y los repiques, respectivamente) y esterilizada a 120°C durante 40 minutos.

Como la tierra quedaba húmeda al salir del autoclave, fué secada nuevamente en la estufa. Con el objeto de poder inocular siempre una cantidad constante de tierra esporulada en el medio de cultivo, se usó un asa preparada para tal efecto, arrollando el extremo de modo que formara un hueco.

(¹) En su trabajo sobre fermentación acetobutílica de la xilosa, Underkofler y sus colaboradores (100), señalan que es imposible obtener una buena esporulación en tubos de cultivo ordinarios y de la manera usual. Demuestran que ello puede mejorarse si se pasa asépticamente el medio a un frasco estéril, de tal modo que forme una capa delgada de líquido, o por secado del líquido en tierra estéril.

CAPITULO V

P A R T E E X P E R I M E N T A L

Fermentación:

Cada una de las cinco cepas del Bacillus polymyxa con que trabajamos, fué sembrada en tubos de agar estría; al cabo de veinticuatro horas de incubación, a veces cuarenta y ocho horas, los cultivos estaban bien desarrollados. Tomamos, entonces, un ansa de cada uno de estos cultivos y la repicamos en tubos con medio de avena-fosfato, los llevamos luego a la estufa a 30°C, durante cuatro días.

Transcurrido este lapso, se observó en todos los tubos abundante fermentación, traducida por formación de gas. Además hubo digestión del medio, exteriorizada por la presencia de grumos.

Para poner en evidencia la presencia de acetilmetilcarbinol (AMC) en el líquido fermentado, se practicó la reacción de Barritt (8) -una modificación de la reacción de Voges-Proskauer (109)-. Para ello, a 1 ml. del líquido a determinar, se añadió 0,5 ml. de hidróxido de potasio al 16% y 0,5 ml. de solución alcohólica de α-naftol al 6%, se agitó y se obtuvo una coloración rosada, característica de esta reacción.

Esporulación:

Con una pipeta se extrajo estérilmente 0,5 ml. del cultivo en avena-fosfato y se inoculó en un tubo con 2 gr. de tierra estéril, tratando de mezclar bien con la misma pipeta. Se llevó los tubos a la estufa a 37°C donde permanecieron tres días, al cabo de los cuales la tierra se había secado, condición que favorece

la esporulación.

Para comprobar la formación de esporas en la tierra, sembramos un ansa de ésta en un tubo de caldo-extracto de carne, lo calentamos a 80°C durante cinco minutos, para destruír las formas vegetativas y luego lo incubamos a 37°C durante 24 horas. Observamos turbidez del caldo y la presencia del Bacillus polymyxa en un preparado microscópico, lo que nos reveló que la tierra inoculada contenía esporas.

A esta tierra con esporas de Bacillus polymyxa la denominamos Cultivo To.

Heat shocking:

El "heat shocking" lo realizamos sobre los cultivos esporulados de Bacillus polymyxa contenidos en tubos de ensayo comunes(*)

Introducimos éstos en agua hirviendo (100°C) contenida en un recipiente bien grande, de más o menos diez litros, para evitar en lo posible un descenso de la temperatura del agua al introducir los tubos. Allí fueron dejados dos y tres minutos y luego retirados y enfriados rápidamente.

(*) Un estudio sistemático sobre el choque térmico en la fermentación acetobutílica fué realizado por Duprat, Kotzev y Tranchet (21). Hicieron pruebas con distintos tubos de ensayo, comunes y de Pyrex, de distintas dimensiones, así como con distintos medios de cultivo. Ensayaron también distintos tiempos de calentamiento. Llegan a la conclusión de que el uso de tubos de vidrio Pyrex o comunes, no afecta en absoluto los resultados, no sucediendo así con el tamaño de los mismos, cuya influencia es mayor. Por los resultados que obtuvieron, aconsejan el uso de tubos medianos (15x150 mm) ya que aventajan a los grandes y son prácticamente iguales a los pequeños (12x75mm) en la rapidez de su calentamiento.

Como todas las cepas ensayadas resistieron perfectamente este tiempo de calentamiento, decidimos aumentarlo a cinco, diez y hasta quince minutos , para poder, de esta manera seleccionar las esporas más resistentes al calor.

Técnicas usadas:

En la aplicación del "heat shocking", hemos usado dos técnicas: la de Weizmann y la técnica propuesta por el profesor Sordelli.

Hemos trabajado en ambos casos con las cinco cepas de Bacillus polymyxa, sembrando seis tubos para cadadcepa, lo que hace untotal de sesenta tubos usados en cada "heat shocking" para las dos técnicas.

Técnica de Weizmann:

El método usado por Weizmann sobre cultivos de Clostridium acetobutylicum, es el que figura en sus patentes (111, 112, 113), y que obtuvimos de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de Norte América (United States Patent Office).

En tubos con 8ml. del medio de avena-fosfato, se inoculó un ansa del cultivo de Bacillus polymyxa esporulado en la tierra -Cultivo Te- y se incubó a 30°C durante cuatro días. (Se sembraron en total 30 tubos: seis por cada cepa).

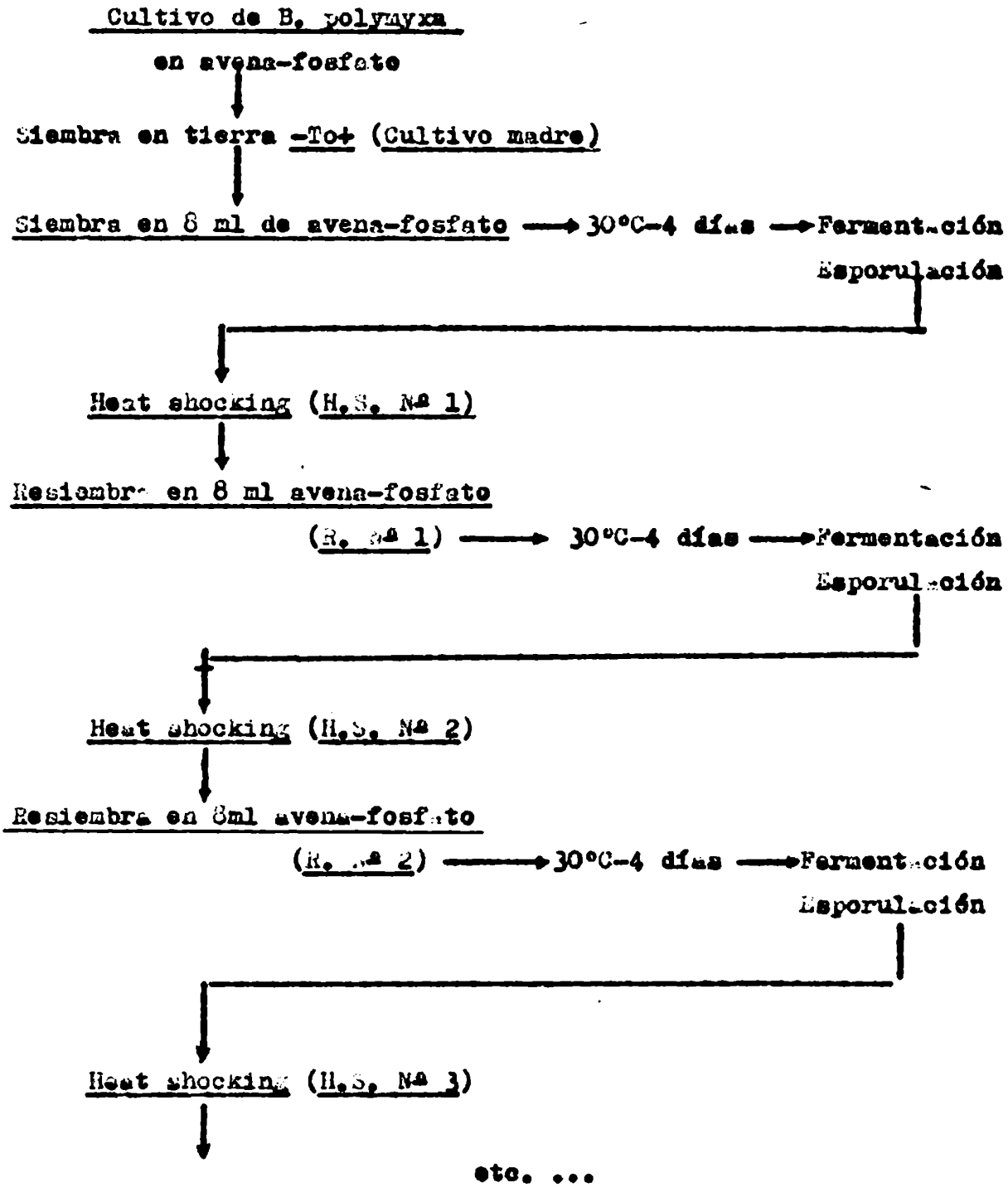
Al cabo de este tiempo los cultivos deben haber producido la fermentación. Entonces fueron sometidos al choque térmico, es decir, a 100°C durante cinco minutos. Luego fueron enfriados bruscamente.

Por este procedimiento selectivo mueren las formas vegetativas y esporas débiles, sobreviviendo sólo las esporas más resistentes.

Procedimos a continuación a mezclar estérilmente en su correspondiente Erlenmeyer, todos los cultivos ya "shockados" de una misma cepa, se tomó un ansa de esta mezcla y se volvió a inocular otros seis tubos con 8 ml. de avena-fosfato y se incubó todo a 30°C durante cuatro días. Esta sería la resiembra Nª 1.

Una vez que hubieron fermentado, los cultivos fueron nuevamente sometidos al "heat shocking" -choque térmico Nª 2-, enfriados, mezclados e inoculados en nuevos tubos con avena-fosfato, incubados a 30°C cuatro días -resiembra Nª 2-, después de fermentados nuevamente fueron "heat shockados" -choque térmico Nª 3- y así sucesivamente.

Esta sucesión de resiembras y choques térmicos tiene por finalidad lograr esporas resistentes y de gran potencia fermentativa.


Cultivo de B. polymyxa
en avena-fosfato
Siembra en tierra -To+ (Cultivo madre)
Siembra en 8 ml de avena-fosfato
30°C-4 días
Fermentación
Esporulación
Heat shocking (H.S. Nº 1)
Resiembra en 8 ml avena-fosfato
(R. Nº 1)
30°C-4 días
Fermentación
Esporulación
Heat shocking (H.S. Nº 2)
Resiembra en 8ml avena-fosfato
(R. Nº 2)
30°C-4 días
Fermentación
Esporulación
Heat shocking (H.S. Nº 3)
etc. ...

Cuando en algunas de las resiembras no se observaba fermentación en ninguno de los tubos, es decir, que los esporos no resistieron el último choque térmico a que habían sido sometidos, retrocedíamos a la resiembra anterior que había fermentado y que, por consiguiente, contenía los esporos sobrevivientes al "heat shocking" precedente.

Se sembró un ansa de ese cultivo en otros tubos con avena- fosfato y si se lograba la fermentación, se continuaba con el mismo procedimiento. Pero si ésto nó se conseguía, retrocedíamos al subcultivo inmediato anterior a éste y así hasta encontrar el que tuviera esporos más resistentes y por consiguiente, fermentadores.

Esto es lo que ocurrió con las cepas 1, 3 y 5, como puede verse en el cuadro que va a continuación.

En el caso de la cepa 1, y luego de ocho choques térmicos, el resultado fué negativo, es decir, no obtuvimos más fermentación, a pesar de haber retrocedido a varias resiembras anteriores.

Llegamos, pues, a la conclusión, que se trataba de una cepa poco resistente al calor.

Las cepas 3 y 5 se hicieron negativas, en lo que a fermentación se refiere, más precozmente, pues después del séptimo y quinto "heat shocking" respectivamente, murieron. Pero logramos, por el procedimiento del retroceso, progresar hasta el "heat shocking"23

En cambio las cepas 7 y 9 resistieron perfectamente los veintiseis choques térmicos (H/S.Nº 26) a que fueron sometidos.

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

Página no digitalizada

Tipo de material: Tabla

Alto: 24

Ancho: 69

Descripción: Heat shocking: Técnica de Weizman

Esta página no pudo ser digitalizada por tener características especiales. La misma puede ser vista en papel concurriendo en persona a la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir.

This page could not be scanned because it did not fit in the scanner. You can see a paper copy in person in the Central Library Dr. Luis Federico Leloir.

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

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

Página no digitalizada

Tipo de material: Tabla

Alto: 24

Ancho: 85

Descripción: Heat shocking: Técnica de Sordelli

Esta página no pudo ser digitalizada por tener características especiales. La misma puede ser vista en papel concurriendo en persona a la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir.

This page could not be scanned because it did not fit in the scanner. You can see a paper copy in person in the Central Library Dr. Luis Federico Leloir.

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

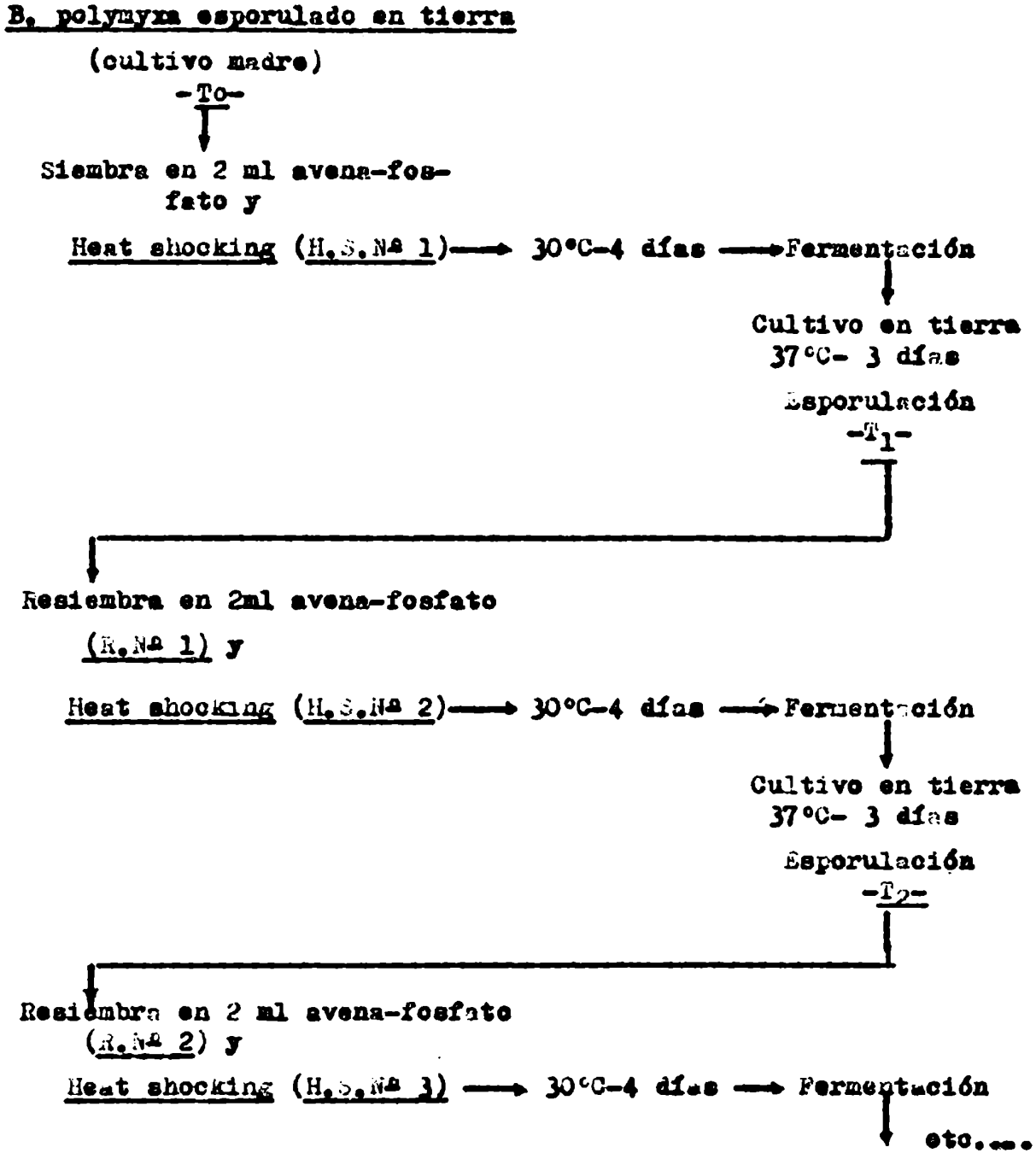
Técnica de Sordelli:

Aquí se inoculó un ansa del cultivo de Bacillus polymyxa esporulado en tierra -To-, en tubos con 2 ml del medio de avena-fosfato.

Estos tubos fueron sometidos inmediatamente de sembrados al "heat shocking" (100°C) y enfriados enseguida. Luego de estar incubados cuatro días a 30°C, los líquidos fermentados se juntaron y mezclaron, y de aquí se retiró con pipeta 0,2 ml que fueron inoculados en un tubo con 1 gr de tierra estéril. Se uniformó bien con la misma pipeta, y se llevó a incubar a la estufa a 37°C durante tres días, hasta que la tierra se hubo secado, lo que favorece la esporulación. A esta tierra que contiene los esporos que resistieron el primer choque térmico, se la llamó Cultivo T_1.

Un ansa de T_1 se sembró en otros seis tubos con 2 ml de avena-fosfato; se sometieron al "heat shocking" (H.S. Nº 2) y luego se los incubó a 30°C durante cuatro días.

El contenido de los tubos fermentados, se mezcló, se tomó 0,2ml y se inoculó en tubos con 1 gr de tierra estéril. Se pusieron a incubar en estufa a 37°C durante tres días y obtuvimos así la tierra esporulada de Bacillus polymyxa T_2, y así se siguió sucesivamente.


B. polymyxa esporulado en tierra
(cultivo madre)
-To-
Siembra en 2 ml avena-fosfato y
Heat shocking (H.S.Nº 1) → 30°C-4 días → Fermentación
Cultivo en tierra 37°C- 3 días
Esporulación
-T1-
Resiembra en 2ml avena-fosfato (R.Nº 1) y
Heat shocking (H.S.Nº 2) → 30°C-4 días → Fermentación
Cultivo en tierra 37°C- 3 días
Esporulación
-T2-
Resiembra en 2 ml avena-fosfato (R.Nº 2) y
Heat shocking (H.S.Nº 3) → 30°C-4 días → Fermentación
etc....

Como se ve en el esquema anterior, esta técnica se diferencia de la anterior en que se intercala entre cada "heat shocking", un pasaje por tierra.

Por otra parte, aquí hemos sometido a los cultivos de B. polymyxa, no sólo a choques térmicos de cinco minutos de duración, sino que a partir del "heat shocking" Nº 6, como puede verse en el cuadro siguiente, prolongamos el tiempo de calentamiento a diez minutos, y a partir del "heat shocking" Nº 9, a quince minutos. Pero este último lapso sólo fué resistido relativamente, por lo que en lo sucesivo realizamos el "heat shocking" únicamente durante diez minutos a 100°C.

Así llegamos con esta técnica propuesta por el profesor Sordelli, a los veinte choques térmicos, al cabo de los cuales, las esporas seguían todavía viviendo, sin haber tenido que retroceder ninguna vez a un cultivo anterior, como ocurrió con la técnica de Weizmann.

Comparación de las dos técnicas:

De los resultados obtenidos, se desprende que la resistencia de las esporas al calor, usando la técnica de Sordelli, es mayor que la resistencia de las mismas usando la técnica de Weizmann. De lo que se deduce que el pasaje por tierra, después de cada fermentación, les confiere una vitalidad mayor.

Determinación cuantitativa del acetilmetilcarbinol producido durante la fermentación.

Por medio del "heat shocking", hemos intentado, como ya lo dijéramos repetidas veces, aumentar la resistencia al calor de las esporas del Bacillus polymyxa.

Pero, en realidad, nuestra intención era en última instancia tratar de conseguir a través de esa mayor termoresistencia, intensificar la producción de AMC.

Veamos ahora si ello se ha logrado.

Procedimos, para ello, a determinar cuantitativamente el AMC en los líquidos fermentados por las cinco cepas en estudio, antes y después del "heat shocking", con las técnicas de Weizmann y de Sordelli.

En este capítulo nos vamos a ocupar sucesivamente de:

Acetilmetilcarbinol

Métodos cuantitativos - Antecedentes

Experimentación: Aparato
Reactivos
Procedimiento

Fermentación

Cálculos

Acetilmetilcarbinol:

El acetilmetilcarbinol (3 hidroxi-2 butanona) o acetoína, es producido por un gran número de bacterias.

En 1896, Péré (74), fué el primero en seguir la formación y y desaparición del AMC en cultivos de bacterias del género Bacillus subtilis y mesentericus vulgatus, pero ignoraba su identidad, creyendo que se trataba del aldehido glicérico.

En 1898, Voges y Proskauer (109), describen en cultivos de ciertos organismos, en glucosa y peptona, a los que agregaron una solución de potasa al 10%, la producción de una coloración rosada con fluorescencia verde, semejante a la de la eosina. Posteriormente se descubrió que esta coloración era debida a la formación de AMC.

Es a Grimbert (35), en 1901, a quien debemos la identificación del AMC en un cultivo microbiano. Este lo puso en evidencia por su osazona (76).

En 1904, Desmots (18), señala que las bacterias del grupo del Bacillus mesentericus dan AMC, y en 1905, Harden (37), demuestra que la coloración rosada descripta por Voges y Proskauer era debida a la presencia del AMC, que con la potasa se oxida a biacetilo, que reacciona luego con la peptona del medio dando esa coloración.

En 1906, Harden y Walpole (39), aislaron y describieron el AMC y 2-3-butilene glicol en la fermentación de glucosa por el Aerobacter aerogenes. En 1912, Harden y Norris (38), confirman los hechos observados por Desmots.

Lemoigne (58), en 1913, demuestra que todos los bacilos del grupo del Bacillus subtilis dan AMC y 2-3-butilene glicol, variando ambos con el tiempo de fermentación, con transformación del glicol en AMC.

En 1919, Lemoigne (59), encuentra este producto en cultivos de Bacillus anthracis.

También fué hallado en cultivos de levaduras por Neuberg y Reinfürth (70) en 1923, Kluyver, Donker y Visser't Hooft (47) en 1925, y Elion (25) en 1926.

Van Niel, Kluyver y Derx (102) en 1929, lo hallaron en cultivos de Streptococcus cremoris, siendo los primeros en sugerir la

importancia del saber y aroma de los cultivos de manteca por la presencia del AMC.

En cultivos de Bacillus subtilis fué identificado igualmente por Lafen (53) en 1932, y Horowitz-Wlassowa y Rodionova (42) en 1933.

Visser't Hooft y de Leeuw (108), encontraron el carbinol en algunas muestras de pan, en 1935.

También es producido por el género Acetobacter (Hermann y Neuschul (40), en 1932), y en una patente reciente, de 1946, Rutheford y Eisenman (85), señalan que la conversión de 2-3-butilene glicol en acetoína es realizada más fácilmente por el género Acetobacter que por los miembros del género Aerobacter y que puede obtenerse así mayor concentración de AMC. Aconsejan sembrar primero con un organismo del género Aerobacter y luego inocular un organismo del género Acetobacter, sin aislar el producto intermedio y sin agregar otros productos nutritivos.

En 1927, Wilson y colaboradores (117), demuestran que el AMC es producido en la fermentación acetobutílica por el Clostridium acetobutylicum (Weizmann), como producto final juntamente con ácido acético y ácido pirúvico. Y a partir de este último ácido, agregado a la masa en fermentación, Johnson, Peterson y Fred (44) en 1933, demuestran también su formación.

En 1943, Prévot y Taffanel (80), señalan que la mayoría de las bacterias anaerobias estudiadas por ellos, forman AMC, sea como producto intermedio o final del metabolismo e indican la importancia del mismo para el descubrimiento de estas bacterias.

Gallut (30) en 1946, comprueba que todas las cepas de Vibrio cholerae producen AMC, algunas de 2 a 60 mg. por litro de cultivo y otras de 2 a 204 mg. por litro.

La producción de acetoína a partir del 2-3-butilene glicol,

fué constatada ya por Kling (46) en 1905, bajo la influencia del Mycoderma aceti; más tarde, por otras especies del género Acetobacter, por Visser't Hooft (107) en 1925, y recientemente, en 1943, por Fulmer, Underkofler y Bantz (29) por el Acetobacter suboxydans.

Walpole (110) en 1910, también encontró que el Aerobacter aerogenes producía acetoína cuando crecía aeróbicamente en un medio compuesto de peptona y 2-3-butilene glicol, y observó que la producción de AMC era mayor si se hacía pasar una corriente de oxígeno.

En 1944, Stanier y Fratkin (95), estudiaron la oxidación del 2-3-butilene glicol por los géneros Aerobacter, Aerobacillus y Aeromonas.

En cuanto a la producción de AMC por el Bacillus polymyxa, fué observado por Donker (20) en 1926, en un medio de agua de levadura y 2-3-butilene glicol solamente. Fué estudiada con mayor detalle por Sthaly y Werkman (94) en 1942.

Propiedades del acetilmetilcarbinol.

El AMC comercial es un líquido, que conservado en heladera durante una semana o más se transforma en un sólido amorfo.

Tiene impurezas de diacetilo, que le comunican su olor, debido probablemente a la lenta oxidación del AMC. Stahly y Werkman (94) intentaron purificarlo por destilación al vacío, pero se descompone. Por ser soluble en agua y alcohol e insoluble en éter, en el que es soluble el diacetilo, estos autores lo purificaron lavándolo con éter anhidro y filtrándolo luego al vacío. Obtuvieron así, un producto cristalino, blanco e inodoro, sin punto de fusión definido.

Goldemberg (33) lavó también el sólido con éter anhidro, secándolo luego en una corriente de anhídrido carbónico.

La acetoína existe a temperatura ordinaria, en forma sólida y polimerizada, y al estado líquido como monómero. La forma sólida, según Pound (78), no sufre oxidación. Este autor, estudió el grado de adsorción de oxígeno por el líquido, observando que la adsorción era proporcional al tiempo, aunque señala que disminuye luego de cien a trescientos días.

El AMC tiene importancia como aromatizante de la manteca. Así los cultivos de manteca siempre lo contienen acompañado del diacetilo. Los cambios químicos que resultan de la formación de estos compuestos fueron estudiados por Hammer (36), con el objeto de producir mejores "starters" de manteca. Posteriormente, en 1933, Michaelian, Fermer y Hammer (66), señalan que el carbinol es cuantitativamente más importante que el diacetilo, ya que el contenido de AMC es de diez veces el de diacetilo. Estos compuestos son producidos por los Streptococcus fermentadores del ácido cítrico que están normalmente presentes en cultivos de manteca.

Una patente de Simons y Burton (90), señala la importancia del AMC como antioxidante -en una proporción de alrededor del 0,1 % ó más- en composiciones tales como los aceites de hígado de pescados. Actuaría , en este caso, como estabilizador de preparados de vitaminas liposolubles.

Según Piazza (75), el AMC podría ser un indicador muy importante para valorar ensilaje, ya que cuanto más pobre es el ensilaje, menor cantidad de carbinol contiene.

La acetoína se encuentra siempre en el vinagre de vino (Visser' t Hooft(107), siendo principalmente un producto de oxidación del 2-3-butilene glicol por las bacterias acéticas.

Yamada y Kurono (119) señalan que el AMC puede ser el factor determinante para la diferenciación de vinagres fermentados e imitados, porque no puede revelarse en estos últimos, o se halla en cantidades muy pequeñas. El vinagre de vino contiene de 500 a 800 mg por litro de AMC y el de alcohol de 2 a 16 mg por litro, según Tóth (99).

Los vinos también contiene acetoína -Garino Canina (31)-.

Según Antoniani y Gugnoni (6), el AMC no se encuentra en el vino como un producto normal de la fermentación sino que parece ser un producto de envejecimiento, hallándose en los vinos naturalmente viejos, especialmente los de pronunciado aroma.

Las sidras embotelladas tienen de 10 a 50 mg por litro de AMC, según Stenart (97) , y la cerveza de 18 a 26 mg por litro, según Ribereau Gayon-Peynaud (84).

En 1935, Visser't Hooft y de Leeuw (108), señalan que el AMC se encuentra en la mayoría de los panes fermentados por levaduras y es probablemente un factor importante en el sabor natural del pan. Este contiene, según Ribereau Gayon y Peynaud (84), de 18 a 28 mg por kg.

En el café tostado, Hughes y Smith (43) hallan cantidades iguales de AMC y diacetilo (aproximadamente 15 gamas por grame.)

También se ha encontrado la acetoína en granos de maíz, trigo cebada, lino, avena y centeno. Así Lemoigne y Monguillon (62), observaron que ésta aumentaba durante la germinación. Los mismos autores (63), y por el mismo procedimiento, encontraron acetoína en la sangre de algunos animales (vaca, carnero, cerdo y caballo)

Schmalfuss (88), halló también AMC en la orina humana.

En bacteriología el acetilmetilcarbinol tiene una importancia muy grande como elemento de clasificación de distintas especies bacterianas.

Así, por ejemplo, su presencia sirve para diferenciar el Aerobacter aerogenes de Escherichia coli que no lo produce; el Bacillus polymyxa, gran productor de AMC, del Bacillus macerans que no da acetoína -Porter, Mc Cleskey y Levine (77).

Entre los trabajos que usan la presencia del AMC, con el objeto de caracterizar las distintas especies del género Bacillus, se halla el de Lemoigne, Delaporte y Croison (61) quienes señalan que todos los bacilos son productores de AMC en mayor o menor grado. Así, según Angela Soriano (91), el Bacillus cereus no da la reacción de Voges-Proskauer. Sin embargo aquellos autores señalan en su trabajo que cuando se usan mayores cantidades de cultivo para la determinación de acetoína, puede revelarse su presencia. Concluyen que el AMC permite, en el caso del género Bacillus, diferenciar sobre todo especies que están bien separadas unas de otras y que no es muy seguro para especies muy vecinas.

La reducción de la acetoína, formada por algunas levaduras, al correspondiente glicol, fué propuesto por Antoniani (4), en 1942, como test para la clasificación de levaduras alcohólicas.

La producción de AMC por el vibrión colérico, podría también, servir para identificarlo, según señala Gallut (30)en 1946.

En cuanto al origen biológico del AMC, los estudios realizados hasta ahora, no llegan a un acuerdo general. Según algunos investigadores, el acetaldehido es un intermediario en la fermentación de glucosa a AMC. Así, Neuberg e Hirsch (68) en 1921, Neuberg y Ohle (69) en 1922, Neuberg y Reinfürth (70) en 1923, y Neuberg y Simon (71) en 1925, demuestran que el carbinol se forma por condensación de dos moléculas de aldehido, atribuyendo Neuberg esta condensación a la enzima carboligasa.

También Kluyver y Donker (47) en 1925, demuestran que en presencia de aceptores de hidrógeno (tales como oxígeno, azul de metileno o azufre) el aldehido acumulado durante la fermentación de la glucosa por levaduras, se transforma en AMC y 2-3-butanediol según el grado de aereación.

Tomiyasu (98), señala también que el agregado de acetaldehido acelera la formación de AMC; luego sería su precursor.

Otros autores demuestran la formación de acetoína a partir del ácido pirúvico; Hermann y Neuschul (40) con Acetobacter, y Johnson, Peterson y Fred (44), con Clostridium acetobutylicum. El ácido pirúvico se descarboxila dando acetaldehido y éste se condensa con otra molécula de acetaldehido dando AMC. Sin embargo, Silverman y Werkman (89) en 1941, señalan que una preparación de enzimas libre de células del Aerobacter aerogenes, convierte el ácido pirúvico en AMC y CO_2 sin formación intermedia de acetaldehido.

En cambio, otros autores, indican que la molécula de azúcar da directamente 2-3-butilene glicol que por oxidación biológica da AMC (Herowitz-Wlassowa y Rodienowa (42)).

También en 1937, Berritt(9), encontró que algunas bacterias pueden oxidar al 2-3-butilene glicol a AMC.

Stahly y Werkman (94) también demuestran la probable formación intermedia del acetaldehido ya que, por agregado de éste a un medio con glucosa, fermentado por Bacillus polymyxa, encuentran un aumento en la producción de AMC.

Por otra parte, en 1932, Walter Ciusa (15) demuestra con una serie de experiencias, que puede obtenerse AMC y diacetilo por acción enzimática de la pepsina sobre una de las proteínas de la leche y señala que ello estaría, por lo menos aparentemente, en contradicción con el hecho generalmente admitido de que el AMC se forma siempre por acción microbiana sobre los azúcares.

Los estudios realizados por distintos investigadores con el objeto de conseguir una mayor producción de AMC por fermentación, señalan como el factor más favorable a la aereación.

Aparte de las patentes de Verhave (103, 104) de 1929 y 1933, y de Kluyver y Scheffer (48) de 1933, y otra patente reciente, 1950, de Vergnaud (105), que usan una aereación intensa para evitar la formación de 2-3-butilene glicol o transformarlo en AMC, el trabajo más importante quizás, en este sentido, es el de Stahly y Werkman (94) publicado en 1942, quienes trabajaron con el Bacillus polymyxa y un sustrato formado por glucosa y peptona. Señalan que en condiciones aeróbicas hay un marcado aumento de AMC y que, en general, un bajo potencial redox favorece la reducción del carbinol a glicol y, en cambio, un alto potencial redox estimula la oxidación del glicol a carbinol. Consideran que el AMC y el 2-3-butilene glicol forman un sistema reversible de oxidación-reducción.

Ya en un trabajo anterior, Stahly (93), señala que en las primeras etapas de la fermentación de la glucosa o xilosa por Ba-

cillus polymyxa, se forma poco AMC, porque el E_h es bajo; pero a medida que la fermentación avanza y el potencial redox aumenta, se forma más AMC.

Posteriormente, en 1944, Freeman (26), trabajando con Aerobacter aerogenes, encuentra asimismo que la acetoína reemplaza al glicol como producto principal, cuando la aereación era continuada luego que la concentración de la sacarosa -en el medio usado- caía por debajo del 1%.

Kooi (52), fermentando medios de maíz con Bacillus polymyxa, encuentra también que largos períodos de fermentación conducen a un aumento en la producción de AMC y a una disminución en la producción de 2-3-butilene glicol, particularmente cuando la concentración del medio es baja.

También Adams (1) y Rose (83), presentan datos mostrando mayor producción de acetoína por efecto de la aereación y en general en condiciones aeróbicas.

Por otra parte, puede favorecerse la formación de AMC, por el agregado a los medios en fermentación, de aceptores de hidrógeno, tales como el azul de metileno, azufre, nitrato de potasio, aire a presión, cistina, quinona, etc, como lo indican los trabajos de Tomiyasu (98), Paretsky y Werkman (72), etc.

Los aumentos de AMC se hacen a expensas del 2-3-butilene glicol así, por ejemplo, el azul de metileno equilibra el sistema a un potencial redox donde puede funcionar como un aceptor de hidrógeno llevando a cabo la oxidación del glicol a carbinol.

Wilson, Peterson y Fred (116), estudiando la producción de AMC por el Clostridium acetobutylicum, encuentran que es muy sensible a distintos factores; así con proteínas y con carbonatos disminuye, y con fosfatos aumenta.

Por otra parte, Salmoiraghi (86, 87), señala que trabajando con Aerobacter aerogenes, el AMC se forma en mayores cantidades en

medios que contienen peptona que en aquellos que no la contienen, prescindiendo de la concentración de glucosa, y además en medios con pequeñas cantidades de glucosa, la mezcla de fosfatos monopotásico y bisódico, inhiben la producción de AMC. Con mayor concentración de glucosa (2 a 10%) la acción inhibidora solo tiene lugar con una concentración elevada de fosfatos.

También las sales inorgánicas parecen afectar la producción de AMC; Kluyver, Donker y Visser't Hooft (47), encontraron que las levaduras producen más AMC en un medio inorgánico que en otro con sustancias nutritivas orgánicas.

Métodos cuantitativos. Antecedentes.

Uno de los primeros métodos cuantitativos para determinar AMC en medios de cultivo, es el gravimétrico, propuesto por Lemoigne (60), en 1920. Consiste en agregar a una porción del cultivo, una solución de cloruro férrico para oxidar previamente el AMC a diacetilo, y luego destilar el diacetilo formado. El destilado se agrega a una mezcla de hidróxido de amonio, clorhidrato de hidroxilamina y cloruro niqueloso. El diacetilo se transforma en la dimetilglioxima que con el niquel da un precipitado rojo de niquel-dimetilglioxima, que se pesa.

En 1927, Van Niel (101), modifica el método de Lemoigne, porque no da resultados ni cuantitativos ni constantes, a pesar de su sensibilidad.

Su modificación consiste en agregar un exceso de solución de cloruro férrico al 50% a una porción del cultivo y destilar lentamente. El destilado es añadádo a una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina, cloruro niqueloso y acetato de sodio, en lugar del hidróxido de amonio usado por Lemoigne. Destilados aproximadamente los tres quintos, se cierra el balón y se coloca a 80°C a baño maría durante una hora. El precipitado de niquel-dimetilglioxima se filtra, lava, seca y pesa.

Según Van Niel se determina así un 97% de AMC, siendo los resultados constantes.

Pero Dirschl (19), en 1930, luego de realizar 25 determinaciones con éste último método, no consigue reproducir los resultados obtenidos por Van Niel, logrando solo un resultado promedio de 85%. Considera este autor que la oxidación con cloruro férrico es incompleta.

En 1937, Kniphorst y Kruisher (50), teniendo en cuenta los resultados de Dirschl, vuelven a ensayar el método de Lemoigne modificado por Van Niel, usando AMC puro y calentando cuidadosamente con el cloruro férrico y obtienen sólo un promedio de 91%.

Estos investigadores modifican entonces el método anterior proponiendo el uso de la mezcla de cloruro férrico más sulfato ferroso para oxidar el AMC a diacetilo y obtienen un resultado del 96 al 97%.

Prill y Hammer (81) en 1938, describen un micrométodo colorimétrico para el dosaje del AMC basado en la formación de un "dimetilglioximato" amoníaco-ferroso, de color rojo intenso. Por este método llegan a dosar de 0,010 mg a 0,150 mg de AMC.

Otro método colorimétrico es el propuesto por Eberle (22), en 1944, para la determinación de AMC en vinagre de vino y por el cual la acetoína es oxidada por el cloruro férrico a diacetilo, que da una coloración roja con creatina en medio alcalino (hidróxido de sodio).

Un procedimiento que no requiere la destilación previa del AMC para ser determinado en filtrados bacterianos, es el propuesto por White, Krampitz y Werkman (115) en 1946. Consiste en determinar la densidad del compuesto coloreado que se obtiene por condensación de la diacetiloxima con la urea, en presencia de un ácido fuerte.

Hooreman (41) en 1946, modifica el método de Lemoigne para ser usado como micrométodo colorimétrico. Convierte a la dimetilglioxima en un complejo coloreado con niquel tetravalente obtenido por oxidación del niquel bivalente (que usa Lemoigne) con agua de bromo. Se obtiene un complejo rojo, soluble, que Hooreman llama dimetilglioxima niquélica para diferenciarlo del precipitado obtenido por Lemoigne que llama dimetilglioxima "niquelosa".

De los distintos métodos cuantitativos señalados en la bibliografía, el método de Langlykke y Peterson (54) publicado en 1937, fué elegido por nosotros para la determinación del AMC.

Presenta la ventaja de ser un método volumétrico y sencillo, y si se tiene en cuenta además, la adaptación que hizo del mismo la Dra Goldemberg (33) para ser aplicado a cantidades pequeñas de líquido fermentado, resulta ser relativamente rápido.

La dificultad que presenta la determinación cuantitativa del AMC en cultivos, reside en el hecho que la acetoína generalmente se halla acompañada por otros compuestos de propiedades comunes. Así, por sus propiedades reductoras, de volatilidad y oxidación, interfieren en su determinación, los azúcares reductores, productos volátiles y alcoholes respectivamente. Reacciona además con el iodo alcalino -ya que tiene el grupo acetilo unido directamente al carbono- interfiriendo por ello , la acetona, también en su determinación.

Sin embargo, Langlykke y Peterson, desarrollaron su método basados precisamente en esta última propiedad del AMC de reaccionar con el iodo alcalino, dando iodoformo, y además, tuvieron en cuenta el hecho de que, cuando soluciones acuosas de acetoína son destiladas sin reflujo, lo hacen en una proporción definida y constante que es independiente de la concentración de la solución. (Método de Virtanen y Pulkki (106). Ver cuadro a continuación).

Así, según indican Langlykke y Peterson, destilando los tres cuartos de la solución, eliminando la primera mitad, y recogiendo y titulando el tercer cuarto destilado, las sustancias que interfieren son prácticamente eliminadas (acetona y etanol principalmente).

Volatilidad del AMC en solución acuosa

Fracción destilada %	AMC destilado según Langlykke y Peterson %
0 - 25	31,8
25 - 50	27,9
50 - 75	23,9

En cuanto al 2-3-butilene glicol, que también reacciona con el iodo alcalino a temperatura ambiente dando un contenido aparente de AMC equivalente a un 10% de su propio peso, prácticamente no interfiere, ya que no siendo volátil no aparece en el tercer cuarto destilado, siendo por lo tanto el error resultante despreciable.

Langlykke y Peterson hacen la destilación usando 100 ml del filtrado claro del cultivo: deshechan los primeros 50 ml y recogen y titulan los 25 ml siguientes.

Experimentación:

Nosotros hemos empleado para la destilación el aparato construído por el señor Klobassa para la Dra. Goldemberg, quien lo usó para el ensayo del método, en su trabajo de tesis (33).

Consta de un tubo de vidrio Pyrex de 4 cm de diámetro por 20 cm de largo, cuyo extremo esmerilado se adapta a un refrigerante. Esta longitud del tubo de destilación, tenía por objeto impedir el pasaje de espuma al destilado, en el caso de que ésta se formara.

Para evitar sobresaltos durante la ebullición del líquido, se

colocó dentro del tubo algunas perlas y capilares de vidrio.

La destilación fué realizada sobre 20 ml. del líquido centrifugado claro, colocado en el tubo de destilación y al que agregamos 1 gr. de ácido fosfotúngstico para evitar la formación de espuma.

La destilación duraba de quince a veinte minutos. El calentamiento fué hecho directamente con el mechero, cuidando que la destilación fuera regular y a razón de unas 25 a 30 gotas por minuto.

Los primeros 10 ml destilados fueron recogidos en una proveta de 10 ml. y deshechados, siendo recibidos los 5 ml. siguientes -tercer cuarto destilado- en un matracito de 5 ml., aforado por pesada con agua destilada. Esta fué la cantidad usada para titular.

Estos 5 ml., conjuntamente con las tres porciones de agua destilada empleada para enjuagar el matracito, fueron agregados a 5 ml de hidróxido de sodio N contenidos en un erlenmeyer de tapa esmerilada. Mientras se agitaba el erlenmeyer, fueron agregados con pipeta 5 ml de iodo 0,2 N, dejando luego el erlenmeyer en la oscuridad unos 10 a 15 minutos. Transcurridos éstos fué agregado 5,5 ml de ácido sulfúrico N , titulando inmediatamente con una solución 0,1 N de tiosulfato de sodio en presencia de almidón.

Al mismo tiempo y como control, fué hecho un blanco con agua destilada y 5 ml de iodo 0,2 N .

Para titular hemos usado una semi-microbureta que permite apreciar el centésimo de ml.

La concentración de los reactivos usados fué calculada en base a una determinación previa aproximada, con el objeto de conocer la cantidad de NMC que producen las distintas cepas de Ba-

cillus polymyxa utilizadas por nosotros.

Para la preparación de los reactivos usados en la determinación cuantitativa de AMC (iodo 0,2 N, tiosulfato de sodio 0,1 N, y almidón) hemos seguido las indicaciones de Kolthoff y Sandell (51).

Fermentación.

La fermentación fué realizada por nosotros en Erlenmeyer de 300 ml, usando 50 ml del medio compuesto de avena (5%), y fosfato bipotásico (0,1%) cuya preparación ha sido ya, detallada.

Esta diferencia entre la superficie y volumen del líquido a fermentar, tiene por objeto obtener una mayor aereación, lo que favorece la formación del AMC. Katznelson (45), fué el primero en estudiar la influencia de la relación de superficie a volumen en los medios de fermentación, siendo confirmadas sus observaciones por Adams y Leslie (2) en 1945.

Sembramos cuatro Erlenmeyers por cada una de las cinco cepas estudiadas, es decir, cuatro Erlenmeyers para cultivos no tratados y cuatro para cultivos sometidos al "heat shocking" y para una y otra técnica; lo que hace un total de sesenta Erlenmeyers.

El inóculo fué preparado con el mismo medio de cultivo (avena 5%, fosfato bipotásico 0,1%), en el cual fué sembrada un asa de un cultivo esporulado y se incubó a 30°C durante tres días.

La cantidad de inóculo usada para sembrar en cada Erlenmeyer -50 ml de medio- fué de 1,5 ml o sea una concentración del 3%.

La influencia del inóculo en la fermentación realizada por Bacillus polymyxa fué estudiada por Katznelson (45), Ledingham, Adams y Stanier (55) y Blackwood y Ledingham (11).

Estos investigadores llegan a la conclusión que en general la edad, cantidad y temperatura del inóculo no son factores críticos entre amplios límites.

Katznelson (45) dice que la edad del mismo puede oscilar entre 10 y 96 horas, y la cantidad a usar, entre 2,5 y 5% ó más.

Blackwood y Ledingham (11) señalan la importancia que tiene el hecho de que , usando una pequeña cantidad de inóculo, puede obtenerse asimismo, en operaciones de gran escala, un buen rendimiento de los productos de fermentación, ya que una mayor cantidad de inóculo, o en otras palabras, un mayor número de bacterias agregadas, sólo sirve para aumentar la velocidad de fermentación inicial sin afectar la proporción de los productos formados.

Los Erlenmeyers sembrados con el inóculo, fueron incubados a 30°C durante cuatro días; los líquidos fermentados fueron luego mezclados y centrifugados, usando el líquido sobrenadante para la destilación.

La centrifugación no ofreció dificultades para algunas cepas, ya que en 5 ó 10 minutos se obtenía una separación neta de la parte sólida y líquida; pero, en cambio, con otras, como ocurrió con la cepa 3, a la que llegamos a centrifugar durante casi una hora, no conseguimos modificar su turbidez.

Observando el aspecto de los líquidos fermentados podíamos predecir si centrifugarían bien o mal. Así, pudimos observar que los cultivos que centrifugaban rápidamente, presentaban

los productos sólidos de la fermentación reunidos en la superficie, y la parte líquida, bastante clara, por debajo. En cambio en los cultivos que centrifugaban mal, se observó una turbidez uniforme en todo el volumen del medio.

Esta distinta filtrabilidad de los medios fermentados por las cepas de Bacillus polymyxa y su relación con el rendimiento de los productos de fermentación, fué estudiada por Stanier, Adams y Ledingham (96). Estos investigadores distinguen tres tipos distintos y característicos de masas fermentadas, que dependen de la distribución de los sólidos después de la fermentación: tipos A y B, que no presentan dificultades en la filtración, y el tipo C que filtra muy mal y en el cual no hay una separación entre sólido y líquido. Señalan que cada tipo de medio fermentado puede estar formado por cepas buenas y malas productoras.

En 1950, Crowther (16) estudiando los medios fermentados por Bacillus polymyxa, halló los mismos tipos A, B y C de Ledingham.

Cálculos.

La reacción que tiene lugar con el iodo en medio alcalino es la siguiente:

$$3\ I_2 + 6\ NaOH = 3\ INa + 3\ IONa + 3\ H_2O$$

$$CH_3.CHOH.CO.CH_3 + 3\ IONa = CH_3I + CH_3.CHOH.COONa + 2\ NaOH$$

Vemos que una molécula de AMC equivale a seis átomos de iodo y por lo tanto un milimol (88 mg.) equivale a 60 ml de iodo 0,1N; luego por cada ml de iodo 0,1N usado en la reacción iodofórmica hay 1,467 mg. de AMC en la muestra.

Langlykke y Peterson hallaron que el 23,9% de la acetoína de la muestra aparece en el tercer cuarto destilado. Por lo tanto

para obtener el contenido total de AMC correspondiente a los 20 ml destilados, debemos dividir el contenido del tercer cuarto por 0,239.

$$\text{mg de AMC \%} = \frac{1,467 \times \Delta S_2O_3Na_2}{0,239} \cdot \frac{100}{20}$$

$\Delta S_2O_3Na_2$ representa la diferencia entre el gasto del blanco y el de la muestra, que expresados en ml de $S_2O_3Na_2$ dan el contenido de AMC de la muestra.

El método de Langlykke y Peterson fué aplicado por otros investigadores. Así , Blom y Efrom (14) trabajando con este método hallaron que para soluciones que contienen alrededor de 1% de acetoína, aparece en el tercer cuarto destilado el 24% del total de acetoína y Freeman y Morrison (27) obtienen un 23,4 %. La Dra Goldemberg (33) obtuvo un promedio de 25,3 % de AMC que destila en el tercer cuarto, y cuando usó ácido fosfotúngstico para precipitar las proteínas y las células, obtuvo un valor promedio de 21,1 mg %.

Justamente, Langlykke y Peterson (54) aconsejan determinar para cada medio de cultivo distinto usado, el porcentaje de AMC que destila en el tercer cuarto, ya que este valor varía con la naturaleza de la solución bajo análisis.

Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

Dada la naturaleza del medio de cultivo usado y para descartar la posibilidad de que el mismo absorbiera iodo durante la titulación, hicimos una serie de determinaciones previas, sembrando el Bacillus macerans, bacteria que digiere el medio en la misma forma que el Bacillus polymyxa, pero que no produce AMC.

La cepa de Bacillus macerans usada fué la numerada 3-21, que nos fué cedida gentilmente por la Dra. Giambiagi y fué sembrada en la misma forma que se hizo con la bacteria en estudio, e incubada a 37°C durante cuatro días.

El líquido fermentado fué centrifugado y luego destilados 20 ml (agregando 1 gr. de ácido fosfotúngstico), titulando el tercer cuarto destilado. Fué hecho un blanco con agua destilada y 5ml de iodo 0,2N.

Como se desprende del cuadro siguiente, el medio de avena-fosfato no absorbe prácticamente iodo, por lo que no introducimos con él, un error apreciable en la determinación del AMC.

Blanco $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml. gastados	Muestra $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml. gastados	Δ $S_2O_3Na_2$ ml.	Expresado en mg. de AMC en el 3er. cuarto
9,63 (promedio de 4 determinaciones)	9,63	0,00	0,09
	9,50	0,13	
	9,63	0,00	
	9,52	0,11	
		Prom. 0,06	

También fueron hechas determinaciones sembrando el Bacillus macerans y añadiendo cantidades conocidas de AMC puro (*), para

(*) El AMC usado en estas determinaciones, nos fué cedido, al estado sólido, por la Dra. Goldemberg, quien a su vez lo recibió de los Estados Unidos, de la Fairmount Chemical Co.

ver la influencia del medio de cultivo usado y determinar para este caso el porcentaje de AMC que destila en el tercer cuarto. El AMC fué agregado al líquido fermentado y centrifugado, en la cantidad de 50 mg. % (10 mg. de AMC para 20 ml. de líquido a destilar).

En todas estas destilaciones fué agregado 1 gr. de ácido fosfotúngstico y se hizo un blanco con agua destilada y 5 ml. de iodo. Los datos obtenidos pueden verse en el cuadro.

Hemos obtenido un promedio de AMC que destila en el tercer cuarto que es de 23,4%.

Por lo tanto, al hacer los cálculos, para obtener el total de AMC de la muestra, debemos dividir por 0,234.

$$\text{mg. \% AMC} = \frac{1,467 \times \Delta S_2O_3Na_2}{0,234} \times \frac{100}{20}$$

Determinación del porcentaje de AMC que destila en el tercer cuarto

Medio de cultivo: Avena 5% - PO_4HK_2 0,1%

Blanco	Muestra			
$S_2O_3Na_2$ 0,1N ml gastados	$S_2O_3Na_2$ 0,1N ml. gastados	△ $S_2O_3Na_2$ ml.	mg. AMC titulados en el 3er. cuarto	Porcentaje de AMC destilado en el 3er. cuarto
9,70 (promedio de 4 determinaciones)	8,17	1,53	2,24	22,4
	8,11	1,59	2,33	23,3
	8,05	1,65	2,42,	24,2
	8,13	1,57	2,30	23,0
	8,04	1,66	2,44	24,4
			Promedio %	23,4

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACETIL

	Cultivos sin heat shocking					Cultivos con heat shocki Tecnica de Weizman				
Cepa	Blanco $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml gast.	Muestra $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml gast.	$\Delta S_2O_3Na_2$ ml	mg AMC en el 3er cuarto	mg AMC %	H.S.	Blanco $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml gast.	Muestra $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml gast.	$\Delta S_2O_3Na_2$ ml	mg Al en e 3er cua
1	9,62 promedio de 4 deter.	8,45 8,44 8,38	1,17 1,18 1,24 → 1,20	1,76	37,6					
3	9,62	8,03 8,03 7,98 7,99	1,59 1,59 1,64 1,63 → 1,61	2,36	50,4	W_{21}	9,62 promedio de 4 deter.	8,00 7,55 7,58 8,06	1,62 2,07 2,04 1,56 → 1,82	2,6
5	9,63	8,60 8,60 8,61 8,61	1,03 1,03 1,02 1,02 → 1,03	1,51	32,3	W_{26}	9,63	7,82 7,91 7,85 7,97	1,81 1,72 1,78 1,66 → 1,74	2,5
7	9,63	8,31 8,31 8,23 8,31	1,32 1,32 1,40 1,32 → 1,34	1,97	42,1	W_{26}	9,63	8,95 8,98 8,92 8,91	0,68 0,65 0,71 0,72 → 0,69	1,01
9	9,62	8,45 8,39 8,35 8,33	1,17 1,23 1,27 1,29 → 1,24	1,82	38,8	W_{26}	9,62	8,69 8,71 8,70 8,67	0,93 0,91 0,92 0,95 → 0,93	1,36

'A DE ACETILMETILCARBINOL

IVOS CON HEAT SHOCKING TECNICA DE WEIZMAN					CULTIVOS CON HEAT SHOCKING TECNICA DE SORDELLI					
JCO Na_2 0,1N AST.	MUESTRA $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml GAST.	$\Delta S_2O_3Na_2$ ml	mg ΔMC EN EL 3ER CUARTO	mg ΔMC %	HS	BLANCO $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml GAST.	MUESTRA $S_2O_3Na_2$ 0,1N ml GAST.	$\Delta S_2O_3Na_2$ ml	mg ΔMC EN EL 3ER CUARTO	mg ΔMC %
					S_{20}	9,62	8,45 8,54 8,58 8,52	1,17 1,08 1,04 1,10 → 1,09	1,60	34,2
52 nedio leter.	8,00 7,55 7,58 8,06	1,62 2,07 2,04 1,56 → 1,82	2,67	57,1	S_{20}	9,62	8,04 8,03 8,02 7,99	1,58 1,59 1,60 1,63 → 1,60	2,35	50,2
63	7,82 7,91 7,85 7,97	1,81 1,72 1,78 1,66 → 1,74	2,55	54,5	S_{20}	9,63	8,51 8,55 8,55 8,54	1,12 1,08 1,08 1,09 → 1,10	1,61	34,4
63	8,95 8,98 8,92 8,91	0,68 0,65 0,71 0,72 → 0,69	1,01	21,6	S_{20}	9,63	7,87 7,87 7,81 7,84	1,76 1,76 1,82 1,79 → 1,78	2,61	55,8
62	8,69 8,71 8,70 8,67	0,93 0,91 0,92 0,95 → 0,93	1,36	29,1	S_{20}	9,62	8,18 8,26 8,10 8,23	1,44 1,36 1,52 1,39 → 1,43	2,10	44,9

CAPITULO VI

D I S C U S I O N

El compertamiento del Bacillus polymyxa al calentamiento no ha producido una selección muy evidente de formas superresistentes al calor, pues la simple prolongación del calentamiento a 100°C por un tiempo un poco más largo que al comienzo de los experimentos, produjo en general una reducción apreciable de la capacidad germinativa o la pérdida de ella. Puede decirse que el calentamiento a 100°C, si ha tenido una capacidad selectiva de ciertas formas, éstas no han sido ostensiblemente termorresistentes, y si alguna selección ha ocurrido no ha sido revelada por la supervivencia al calentamiento.

La irregularidad de los resultados obtenidos con la técnica de Weizmann y un mejor comportamiento de las bacterias previamente esporuladas por desecación, parecería indicar que existiera un camino de incrementar la diferenciación de las esporas en su propiedad termorresistente, por la influencia de factores capaces de inducir formas particulares de esporulación.

Esta suposición está en cierto modo afianzada por el diferente comportamiento de algunas cepas, que mostraron desde el comienzo una mayor resistencia. Parecería que hubiera algún factor genético que determinara la resistencia como una propiedad intrínseca. Naturalmente, como el fenómeno del "heat shocking" no fué analizado con el propósito de encontrar la variación inducida por él, sólo caben hacer suposiciones.

La falta de una selección ostensible por el calentamiento, o de la inducción de la termorresistencia por el mismo, fué desde el principio un motivo que nos indujo a no esperar mucho de la técnica del "heat shocking" para modificar las propiedades biológicas del Bacillus polymyxa. En efecto, la producción del AMC

no se vió modificada por el proceso del "heat shocking", tanto por el procedimiento de Weizmann como por el de Sordelli.

Tampoco fueron observadas diferencias en las características de las colonias en placas, ni tampoco en los cultivos líquidos en los que se formaba el AMC, pues conservaban sus características del cultivo inicial.

R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S

Se aplicó el método del "heat shocking" con el propósito de inducir una mayor resistencia del Bacillus polymyxa, aplicando dos técnicas diferentes.

Los resultados obtenidos fueron juzgados por la inducción de una mayor resistencia al calor y por la producción de AMC/.

1ª) No fué observada ninguna modificación ostensible de la resistencia al calentamiento.

2ª) No se observaron modificaciones de los caracteres morfológicos y de cultivo.

3ª) Parecería verosímil que la propiedad de resistir al calor está gobernada por variables que no son simplemente la selección de esporas más resistentes.

4ª) La falta de modificación de las propiedades morfológicas tuvo su paralelo, también, en la falta de cambio en la producción del AMC.

B I B L I O G R A F I A

(1) Adams, G.A.: Production and properties of 2-3-butanediol. VII. Fermentation of wheat by Aerobacillus polymyxa under aerobic and anaerobic conditions. Can.Jour.Research, F.24, 1-11 (1946).

(2) Adams, G.A. and Leslie, J.D. :Production and properties of 2-3-butanediol. I.The effects of surface-volumen ratio and reduced pressure on the fermentation of carbohydrates by Aerobacillus polymyxa and Aerobacter aerogenes. Can.Jour.Research, F.24: 107-118 (1946).

(3) Adams,G.A. and Stanier, R.Y. : Production and properties of 2-3-butanediol. III. Studies on the biochemistry of carbohydrate fermentation by Aerobacillus polymyxa. Can.Jour.Research, F.23: 1-9 (1945).

(4) Antoniani, C. : Biochim.terap. sper. 29: 105-110 (1942). (cit. por Chem. Abst. 1946, pág. 7511[2]).

(5) Antoniani, C. Castelli, F. Diamanti, G.: Biochem. terap. sper. 27, 403-405 (1940). (cit. Chem.Abst. 1946 , pág. 3198[7]).

(6) Antoniani, C. Gugnoni, S.: Ann. chim. applicata, 31, 417-22 (1941). Chem. Zentr., 1942,I,2076. (cit. Chem. Abst.1943, pág. 3222[2]).

(7) Barfuss, F.: Ger. 643,051 Apr.1. 1937. (cit. Chem. Abst., 1937, pág. 4446[2]).

(8) Barritt, M.M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by addition of a-naphtol. Jour. Pathol Bact. 42, 441.(1936)

(9) Barritt, M.M.: The origin of acetylmethylcarbinol in bacterial fermentations. Jour. Path. Bact. 44, 679-690.(1937).

(10) Bigelow, W.D. and Esty, J.R.: The termal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. Jour. Inf. Diseases. 27, 602-617, (1920). (cit. por Davis, F.L. and Williams, O.B.)

(11) Blackwood, A.C., Ledingham, G.A.: Production and properties of 2-3-butanediol. XX. Influence of the inoculum on the Aerobacillus polymyxa fermentation. Can. Jour. Research. F.25,180-191.(1947).

(12) Blackwood, A.C., Neish, A.C., Brown, W.E., Ledingham, G.A.: Production and properties of 2-3-butanediol. XVII. Fermentation of glucose by strains of Bacillus subtilis. Can.Jour.Research. B.25,56-64, (1947).

(13) Blackwood,A.C., Wheat,J., Leslie, J.D., Ledingham,G.A., Simpson,F.J.: Production and properties of 2-3-butanediol. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by Aerobacillus polymyxa. Can.Jour.Research. F 27, 199-210,(1949).

(14) Blom,R.M., and Efron, A.: Liquid-vapor equilibria in the acetylmethylcarbinol-water system. Ind.Eng.Chem. 37, 1237,(1945).

(15) Ciusa, W.: Il diacetile ed il metilacetilcarbinolo per azione della pepsina sul latte. NotaI . Ann. chim. applicata. 22, 594, (1932).
Sulla formazione per via enzimatica del metilacetilcarbinolo. Nota II. Il metilacetilcarbinolo per azione enzimatica delle proteine.

Ann. chim. applicat. 22, 747,(1932).

(16) Crewther, W.G.: Studies on Aerobacillus polymyxa. I. Fermentation and filtration characteristics of strains of Aerobacillus polymyxa. Australian J. Applied Sci. 1,437-446. (1950). (cit. por Chem.Abst. 1951, Julio 10, Nº 13).

(17) Davis, F.L., Williams, O.B.: Studies on heat resistance. I. Increasing resistance to heat of bacterial spores by selection. J. Bact. 56, 555, (1948)/.

(18) Fesmots H.: Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 138, 581,(1904). (cit. por Stahly G.L. and Workman, C.H.).

(19) Dirschl W.: Hoppe- Seylers Z. 186, 235, (1930). (cit. por Kniphorst, L.C.E. and Kruisheer, C.I.)

(20) Donker, H.J.L.: Bijdrage tot de kennis der boterzuurbutylalcohol en acetongistingen. Thesis. Delft.(1926). (cit. por Prescott,S.C. and Dunn, C.G. Industrial Microbiology. 1949).

(21) Duprat, E., Kotzev, E., Tranchet, C.A.: El choque térmico en la fermentación acetobutílica. Archivos de Farmacia y Bioquímica del Tucumán. Tomo V. Nº2, (1951).

(22) Eberle, F.: Deut. Essigind. 48, 53-54. (1944). Chem. Zentr. 1944, II, 1130. (cit. Chem. Abst. 1947. pág. 6665[h])

(23) Effront, Jean.: Accoutumance des ferments aux antiseptiques et influence de cette accoutumance sur leur travail chimique. Comtes Rendus Acad. Sciences. 119 , 169, (1894).

(24) Effront, Jean.: L'Acclimatation de la levure de biere a l'arsenic. Compt. Rend. Soc. Biol. 83, 806-807, (1920).
Sur le mécanisme de l'acclimatation des micro-organismes aux substances toxiques. Compt. Rend. Soc. biol. 83, 807-809, (1920).

(25) Elion, L.: Biochem. Z. 171, 40-44, (1926). (cit. por Stahly y Workman).

(26) Freeman, G.G.: Fermentation of sucrose by Aerobacter aerogenes. Biochem. J. 41, 389-398,(1944).

(27) Freeman, G.G. and Morrison, R.I.: Determination of some products of sugar and molasses fermentations. Analyst 71, 511-520, (1946).

(28) Fulmer, E.I.: J. Phys. Chem. 25, 455, (1921). (cit. por Underkofler, Christensen y Fulmer).

(29) Fulmer, E.I., Underkofler, L.A., Bantz, A.C.: The production of acetylmethylcarbinol by the action of Acetobacter suboxydans upon 2-3-butyleneglycol. J.Amer. Chem. Soc. 65, 1425-1427, (1943).

(30) Gallut, P.: Bull. soc.path.exotique. 39, 239-244, (1946). (cit. por Chem.Abst.1948 ,pág.1332[d]).

(31) Garino-Canina, E.: Il 2-3-butilenglicole e l'acetilmetilcarbinole nei vini e negli aceti. Ann.Chim.applicata. 23, 14-20- (1933).

(32) Giambiagi, Nélida.: Estudio de las bacterias fermentadoras del género Bacillus.(Aerobacillus?). Tesis. Universidad de Bs.As. Facultad de Ciencias,Exactas, Físicas y Naturales.(1950).

(33) Goldemberg, Sara Hebe.: Acetilmetilcarbinol: producción , investigación y determinación. Tesis. Univ. de Bs.As

Fac. de Ciencias Exac.Fís.y Naturales. (1951).

(34) Grimbert, M.L.: Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus. Ann. Inst. Pasteur. 7, 353, (1893).

(35) Grimbert, M.L.: Production d'acétylméthylcarbinol par le Bacillus tartricus. Comp.Rend...cad.Sci. 132, 706, (1901).

(36) Hammer, B.W.: Iowa Agr. Expt. Sta.Ann.Rept. 57, (1931). (cit. por Chem. Abst. 1932, pág.4386[6]).

(37) Harden, A.: Proc.Roy.Soc.London.(B), 77, 424,(1906).

(38) Harden, ..,and Norris, D.: The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2-3-butylenglycol from various substances. Proc.Roy.Soc.London (B) 85,73-76 (1912).

(39) Harden, A. and Walpole, G.S.: Chemical action of Bacillus lactis aerogenes (Escherich) on glucose and mannitol: Production of 2-3-butylenglycol and acetylmethylcarbinol. Proc.Roy.Soc.London.Series B.77, 399-405,(1906).

(40) Hermann, E., Neuschul, F.. Biochem.. 246, 446, (1932). (cit. por Stahly y Workman).

(41) Hooreman, M.: Microdosage de l'acétylméthylcarbinol dans les jus fermentés. Comp.Rend.Acad.Sci.222, 1257-1259 (1946).

(42) Horowitz-Wlassowa,L.M., Nodionowa, E.A.: Zentr.Bakt. Parasitenk. II Abt.97, 333-339 (1933). (cit. por Stahly y Workman. - Chem. Abs. 1930,pág. 1710[4]).

(43) Hughes, E.B., Smith, R.F.: J.Soc.Chem.Ind.(London) 68, 322-327,(1949). (cit.por Chem.Abs.1950 ,p.3174g).

(44) Johnson, M.J., Peterson, W.H., Fred, E.B.: J.Biol.Chem.101, 145,(1933). (cit.por Stahly y Werkman).

(45) Katznelson, H.: Studies with Bacillus polymyxa. I. Some factors affecting the fermentation of wheat by Bacillus polymyxa. Can.Jour.Research. C 22, 235-240, (1944).

(46) Kling,A.M.: Sur le méthylacétylcarbinol. Comp.Rend.Acad. Sci. 140, 1456, (1905).

(47) Kluyver, A.J., Donker, H.J., Visser't Hooft, F. : Uber die Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2-3-Butylenglykol im Stoffwechsel der Hefe. Biochem.Z. 161? 361-378,(1925).

(48) Kluyver, A.J., Scheffer, M.A. : U.S. 1,899,094. Feb.28, (1933). (cit. por Chem. Abs. 1933, pág.2757[4]).

(49) Knaysi, G.: The endospore of bacteria. Bact. Revs. 12, 19-77, (1948). (cit. por Davis y C.B.Williams).

(50) Kniphorst, L.C.E., und Kruisheer, C.I.: Die bestimmung von 2-3-Butylenglycol, acetylmethylcarbinol und Diacetyl in Wein und anderen Gärungsprodukten. Z. Untersuch. Lebensm. 73, 1-19, (1937).

(51) Kolthoff, I.M., Sandell, E.B.: Textbook of quantitative inorganic analysis. (1947).

(52) Kooi, E.R.: Production of 2-3- Butanediols by the fermentation of starch. Iowa State Coll. J.Sci. 21, 36-37, (1946).

(53) Lefon, M.: Bull. Soc. Chim. Biol. 14, 263-271, (1932). (cit. por Stahly y Werkman).

(54) Langlykke, A.F., and Peterson, W.H.: Determination of acetylmethylcarbinol. Effect on certain analytical procedures. Ind. Eng. Chem. Anal. Edition.9, 163-166, (1937).

(55) Ledingham, G.A., Adams, G.A., Stanier, R.Y.: Production and properties of 2-3-butenediol. I. Fermentation of wheat mashes by Aerobacillus polymyxa. Can. J. Research. F23, 48-71, (1945).

(56) Legg, D.A.: U.S. Patent 1,668,814. May.8.(1928). (cit.por Underkofler, Christensen and Fulmer).

(57) Lemoigne, M.: Comp. Rend. Acad. Sci. 155, 792, (1912). (cit. por Stahly y Werkman).

(58) Lemoigne,M.: Comp.Rend.Acad.Sci. 157, 653-655. (1913). Ann. Inst. Pasteur. 27, 856-885. (1913).(Cit. por Lemoigne, Delaporte y Croson)

(59) Lemoigne, M.: Comp. Rend. Soc. Biol. 82,984, (1919). (cit. por Stahly y Werkman).

(60) Lemoigne, M.: Réaction spécifique du 2-3-butyleneglycol et de l'acétylméthylcarbinol, produits de la fermentation butyleneglycolique. Comp. Rend. Acad. Sci. 170, 131-132, (1920).

(61) Lemoigne, M., Delaporte, B., Croson, M.: Contribution a l'étude botanique et biochimique des bactéries du genre Bacillus. Valeur du test de l'acétylméthylcarbinol pour la caractérisation des especes. Ann. Inst. Pasteur. 70, 65-79- (1944).

(62) Lemoigne, M., Monguillon, P.: Comp. Rend.190,1457-1459,(1930) (cit. por Chem. Abs.1930, pág.5326[4]).

(63) Lemoigne, M., Monguillon, P.: Comp. Rend. 191, 80-82,(1930) (cit, por Chem. Abs. 1930 , pág.5326[2]).

(64) Magoon, C.A.: Studies upon bacterial spores. Increasing resistance to heat through selection. J.Inf.Diseases 38, 429-439, (1926).

(65) Mascotti, N.J.V.,: Disociación de Aerobacillus polymyxa y su influencia en el rendimiento de 2-3-butilenglicol Ciencia e Investigación. 6, 187-189, (1950).

(66) Michaelian, M.B., Farmer, R.S., Hammer, B.W.: The relationship of acetylmethylcarbinol and biacetyl to butter cultures. Iowa Agr. Expt. Sta. Research Bull. 155, 325-360, (1933). (cit. por Stahly y Werkman).

(67) Morrison, E.W., Rettger, L.F.: Bacterial spores. I. A study in heat resistance and dormancy. J.Bact. 20 ,299-311. (1930). (cit. por Davis y O.B.Williams).

(68) Neuberg, C., Hirsch, J.: Biochem. Z. 115, 282. (1921) (cit. por Stahly y Werkman).

(69) Neuberg, C., Ohle, H. : Biochem.Z. 128, 610.(1922). (cit. por Stahly y Werkman).

(70) Neuberg, C., Reinfürth, E.: Biochem.Z. 143, 553-565.(1923). (cit. por Stahly y Werkman).

(71) Neuberg, C., Simon, E.: Biochem.Z. 156, 374-378.(1925). (cit. por Stahly y Werkman).

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

(73) Patwardhan,V.N.: J.Indian Chem.Soc. 7, 531.(1930). (cit.por Underkofler, Christensen y Fulmer).

(74) Péré, A.: Ann.Inst.Pasteur. 10, 417. (1896). (cit. por Lemoigne, Delaporte y Croson).

(75) Piazza, L.: Ann.Microbiol. 1, 45-47.(1940).- Chem. Zentr. 1940,II, 2972. (cit. por Chem.Abs. 1942,p.5913[1]).

(76) Pirot, R., Bourgain,M., Dufau-Casanabe, J.: Identification de l'acétylméthylcarbinol dans les milieux de culture par l'osazone correspondante et sensibilisation

de la méthode de Lemoigne. Ann.Inst.Pasteur. 69, 313-315.(1943).

(77) Porter, R., Mc Cleskey, C.S., Levine, M.: The facultative sporulating bacteria producing gas from lactose. Jour. Bact. 33, 163-183. (1937).

(78) Pound, J.R.: A note on the oxidation of acetoin. J.Phys.Colloid Chem. 51, 1449-1450.(1947). (cit. por Chem.-bs 1948,p.1885g).

(79) Prazmowski, A.: Untersuchungen über die zur Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien Arten. Botan.Zeit. 37, 409-422. (1879). (cit. por Adamsy Stanier).

(80) Prevot, A.R., Taffanel, J.: Importance de la recherche de l'acétylméthylcarbinol pour la determination des bacteries anaerobies. Ann.Fermentations. 8, 1-4. (1943).

(81) Prill, E.A., Hammer, B.W.: Iowa State Coll.J.Sci. 12, 385. (1938).

(82) Rahn, O.: The problem of the logarithmic order of death in bacteria. Byodynamica, 4, Nº 86.(1943).
Injury and death of bacteria by chemical agents. Byodynamics Monograph.Nº 3. (1945). (cit. por Davis y C.B.Williams).

(83) Rose Gyson : Production and properties of 2-3-Butanediol. XXII. The effect of aerobic conditions on the Aerobacillus fermentation. Can.J.Research. F 25, 273-279. (1947).

(84) Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E.: Bull.Soc.Chim.France.1947, 894-896. (cit. por Chem.-bs.1948 ,p. 1703e.)

(85) Rutheford, N.S., Eisenman, A.: 3-hydroxi-2-butanone. U.S. Patent 2,401,778. June 11.(1946). (cit.por Chem.Abs. 1946,p.5876[7]).

(86) Salmoiraghi, G.C.: Boll.Soc.ital.biol.sper. 23, 30-31.(1947) (cit. por Chem.Abs. 1947, p.6920i).

(87) Salmoiraghi, G.C.: Boll.soc.ital.biol.sper. 23, 31-32.(1947) (cit. Chem.Abs. 1947, p.6921b).

(88) Schmalfuss, H.: Z.Physiol.Chem. 188, 279-280. (1930). (cit. Chem.Abs. 1930, p.3817[6]).

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

(90) Simons, E.J., Buxton, L.O.: Stabilizing fat-soluble vitamin preparations. U.S.Patent 2,331,432. Oct.12.(1944) (Cit. por Chem.Abs. 1944, p.1610[9]).

(91) Soriano, A.M.de : Estudio sistemático de algunas bacterias esporuladas aerobias. Rev.Inst.Bacteriológico. 6, 507-640. (1935)

(92) Sommer, E.M.: Heat resistance of the spores of Clostridium botulinum. J.Inf.Diseases. 46, 85-114. (1930). (cit. por Davis y C.B.Williams).

(93) Stahly, G.L.: Dissimilation of carbohydrates by bacteria of the genus Aerobacillus. Iowa State Coll.J.Sci. 11, 110-112. (1936).

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

(95) Stanier, R.Y., Fratkin, S.B.: Studies on the bacterial oxidation of 2-3-butanediol and related compounds. Can.J. Research.B22, 140. (1944).

(96) Stanier, R.Y., Adams, G.A., Ledingham, G.A.: Production and properties of 2-3-butanediol. II. Strains of aerobacillus polymyxa in relation to filterability and butanediol production. Can.J.Research. F 23 72-78. (1945).

(97) ten Bert, D.W.: Acetylmethylcarbinol in cider. Analyst. 69, 307. (1944). (cit. Chem.Abs. 1945, p.3607).

(98) Tomiyasu, Y.: Production of acetylmethylcarbinol and 2-3-butyleneglycol by microorganisms. IV. Mechanism of the production of acetoin series compounds. J.Agr. Chem.Soc.Japan. 14, 1-6. (1938). (cit. per Chem. Abs. 1938, p.66833).

(99) Tóth, E.: Z.Untersuch.Lebensm. 82, 439. (1941). Chem. Zentr. 1942, 1, 941. (cit. Chem.Abs.1943, pág. 21311).

(100) Underkofler, L.A., Christensen, L.M., Fulmer, E.I.: Butyl-acetonic fermentation of xylose and other sugars. Ind.Eng.Chem. 28, 350-354, (1936).

(101) Van Niel, C.B.: Notiz über die quantitative Bestimmung von Diacetyl und Acetylmethylcarbinol.- Biochem. z. 187, 472-478.(1927).

(102) Van Niel, C.B., Kluyver, A.J., Derx, H.G.: Über das Butteraroma. Biochem.Z. 210, 234-251. (1929), (cit. per Stahly y Werkman).

(103) Verhave, T.H.: Acetylmethylcarbinol. Brit.Patent.337,025. June 26, 1929. (cit. Chem. Abs. 1931, p.19453).

(104) Verhave, T.H.: Sr, Ger. 575,594. apr.29, 1933. (cit. Chem.Abs. 1933, p.48741).

(105) Vergnaud, P.: The manufacture of butanediol and butanone. U.S. Patent. 2,529,061. Nov. 7, 1950. (cit. Chem. Abs. 1951, p. Febr. 25, N44).

(106) Virtanen, A.I., Pulkki, L.: The volatility with steam of water-soluble organic substances. Jour.Am.Chem.Soc. 50, 3138.(1928).

(107) Visser't Hooft, Fr.: Chem. Weekblad. 22, 272-276.(1925). (cit. Chem. Abs.(1917-1926),19, pag.2386[1]).

(108) Visser't Hooft, Fr., Leeuw, F.J.G. de : The occurrence of acetylmethylcarbinol in bread and its relation to bread flavor. Cereal Chem. 12, 213-229,(1935). (cit. Stahly y Werkman).

(109) Voges, O., Proskauer, B.: Z.Hyg.InfektKr. 28, 20.(1898). (cit. por Topley and Wilson's Principles of Bact. and immunity.).

(110) Walpole, G.S.: The action of Bacillus lactis aerogenes on glucose and mannitol.II.The investigation of the 2-3-butyleneglycol and the acetylmethylcarbinol formed; the effect of the free oxygen on their production, the action of B. lactis aerogenes on fructose. Proc.Roy.Soc.London.(B) 83, 272-286. (1910).

(111) Weizmann, C.: Acetone and Butyl alcohol. Brit.Patent 4,845 Mar.29, 1915.

(112) Weizmann, C.: Production of acetone and alcohol by bacteriological processes. U.S.Patent. 1,315585.Sep.9. (1919)

(113) Weizmann, C.: Fermentation process for the production of acetone and butylalcohol. U.S.Patent. 1,437,697. Dec.5, 1922.

(114) Weyer, E.M., Rettger,L.F.: A comparative study of six different strains of the organism commonly concerned in large scale production of butylalcohol and acetone by the biological process. J.Bact.14, 399,(1927)

(115) White, A.G.C., Krampitz, L.O., Werkman, C.H.: Method for direct determination of biacetyl in tissue and bacterial filtrates. Arch.Biochem. 9, 229-34,(1946).

(116) Williams, F.T.: Attemps to increase the heat resistance of bacterial spores. J.Bact. 32, 589,(1936).

(117) Williams, O.B.: The heat resistance of bacterial spores. J.Inf.Diseases. 44, 421-465, (1929).

(118) Wilson, P.W., Peterson, W.H., Fred, E.B.: The production of acetylmethylcarbinol by Clostridium acetobutylicum. J.Biol.Chem. 74, 495-507, (1927).

(119) Yamada, M., Kurono, K.: Production of acetoin and 2-3-butyleneglycol by microbes and their distribution in fermentation products. Bull.Agr.Chem.Soc.Japan. 3, 83-86. (1927). (cit. Chem.Abs. 1928,p.841[4]).