

Tesis de Posgrado

La producción de vitamina B12 en los lodos cloacales

Muchnik de Lederkremer, Rosa María

1956

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Muchnik de Lederkremer, Rosa María. (1956). La producción de vitamina B12 en los lodos cloacales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0910_MuchnikdeLederkremer.pdf

Cita tipo Chicago:

Muchnik de Lederkremer, Rosa María. "La producción de vitamina B12 en los lodos cloacales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0910_MuchnikdeLederkremer.pdf

7 19 3

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LABORATORIO DE FISICA

LA PRODUCCION DE VIBRACIONES EN LOS TUBOS SONANTES

1956

ROSA VILLAN DE REYES

Res. de Tesis: 910

- 1 9 5 6 -

FOFNA

RESUMEN

Se ha puesto a punto la técnica de determinación microbiológica de vitamina B₁₂ empleando el L. leichmannii ATCC. 4797

Mediante esa técnica se ha determinado dicha vitamina en barros activados secos de distinto origen encontrándose valores comprendidos entre 0,11 a 0,54 mg/Kg de barro seco.

Se ha tratado de aclarar el origen de dicho principio estudiando su evolución a través de las distintas etapas de digestión de una planta sita en la localidad de Ezeiza (Pcia. de Buenos Aires).

Se menciona el caudal diario medio de líquido crudo tratado y valores químicos determinados en algunas de las etapas del proceso.

Figuran datos del contenido de vitamina B₁₂ en los distintos líquidos de la planta y de ellos surge mediante cierta hipótesis que durante el proceso de digestión se produce vitamina B₁₂.

Se han incluido datos parciales del contenido de vitamina B₁₂ en algunas etapas del proceso de digestión anaerobia de un digestor de la ciudad de Córdoba de los cuales surge que dicha vitamina se produce durante el proceso de digestión.

R. M. de Lederkremer

Res. de Tesis: 910

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LA PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ EN LOS LUDOS CLOACALES

por

ROSA MICHÉLE DE LEDERERREMER

Tesis presentada para optar el
título de Doctora en Química
(orientación Química Biológica)

TESIS: 910

- 1956 -

1956 910

FOFBA

Agradecemos al Dr. Raúl Ferranola por concederme el honor de patrocinar esta Tesis.

Al Dr. Osvaldo A. Pese mi profundo reconocimiento por sus útiles consejos y valiosa colaboración.

Deseo agradecer también al personal de los Laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación donde se desarrolló este trabajo por el estímulo que me han dispensado en todo momento.

ÍNDICE

	Pág.
A) <u>INTRODUCCION</u>	1
a) Estructura de la vitamina B ₁₂	2
b) Propiedades físicas y químicas de la vitamina B ₁₂	3
c) Vitaminas del complejo B ₁₂ y factores relacionados a él	6
B) <u>MÉTODOS DE DETERMINACION DE LA VITAMINA B₁₂</u>	11
a) Métodos químicos y físicos	11
b) Métodos biológicos	13
1) Con animales de experimentación	13
2) Microbiológicos	14
2a) Métodos que emplean el <u>L. lactis</u>	15
2b) Métodos que emplean el <u>L. leichmannii</u>	18
2c) Métodos que emplean el <u>Esch. coli</u>	22
2d) Métodos que emplean <u>Euglena gracilis</u>	25
2e) Métodos que emplean protozoarios	26
C) <u>VITAMINA B₁₂ EN BARROS CLOACALES DIGERIDOS</u>	28
a) El proceso de digestión de líquidos cloacales y residuales	28
b) Antecedentes sobre la presencia de vitamina B ₁₂ en barros cloacales digeridos	30
D) <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	33
a) Instrumental empleado	33
b) Microorganismo empleado	33
c) Medio basal empleado	34
d) Preparación de soluciones de las sustancias integrantes del medio basal	36
e) Preparación del inóculo	37
f) Preparación del standard de vitamina B ₁₂	38
g) Obtención de la curva standard	38
h) Muestras examinadas y tratamiento de las mismas	41 bis
1) Dosaje de vitamina B ₁₂ en las distintas muestras	43
j) Determinaciones químicas	43

FORMA

Pág.

E) RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION

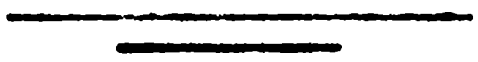
44

F) RESUMEN Y CONCLUSIONES

50

G) BIBLIOGRAFIA

51



A) INTRODUCCION

Estamos en presencia de la vitamina de descubrimiento más reciente y una de las más interesantes desde el punto de vista químico y fisiológico.

(1)

Desde que en 1926 se estableció el efecto terapéutico de los extractos de hígado en la anemia perniciosa, se trató de aislar el principio activo. La falta de un método rápido y exacto de bioensayo demoró este objetivo. Cuando en 1945 se aisló el ácido fólico se creyó estar en presencia del factor buscado; pero la sustancia aislada no presentaba toda la actividad terapéutica de los extractos de hígado por lo que el problema debió ser reconsiderado. Fue así que en 1947 Shorb (2) demostró la presencia en el extracto de hígado de un factor necesario para el crecimiento del Lactobacillus lactis Dornier. Las investigaciones posteriores pusieron en evidencia una estrecha relación entre el poder antianémico del extracto y su acción frente al microorganismo mencionado. Se contó desde entonces con un método microbiológico para dosar la actividad de las distintas fracciones de extracto hepático, facilitándose la tarea de aislamiento del principio activo. El éxito coronó la empresa cuando, en 1948, Rickes y col. (3) lograron cristalizar un compuesto rojo que llamaron vitamina B₁₂ por su relación con el complejo vitamínico B. En efecto, todos los factores de crecimiento aislados o concentrados hasta entonces y que presentaban acción sobre los microorganismos se incluyeron en el grupo de "vitaminas B" sustancias que presentaban las siguientes características:

- 1) Funcionaban como factores de nutrición para animales superiores.
- 2) Se hallaban presentes en todas las células vivas.
- 3) Estaban asociadas a la actividad catalítica en las mismas.

Buscando otras fuentes de vitamina B₁₂, Rickes y col. (4) aislaron de cultivos de Streptococcus griseus cristales de vitamina B₁₂ que estudios posteriores demostraron que eran iguales a los obtenidos de hígado.

Hacia la misma época Smith (5) y (6) en Inglaterra aisló el Factor Antianemia Perniciosa y comprobó su identidad con la vitamina B₁₂ (7). Este último investigador ensayó clínicamente la actividad de las distintas fracciones del extracto de hígado, las cuales controló por el color rojo característico que ellas revelaron por cromatografía. Esta técnica indicó también la presencia de otra sustancia de actividad biológica semejante (8). Se trataba de otro factor del llamado más tarde complejo B₁₂.

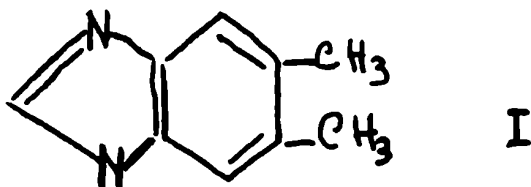
a) Estructura de la Vitamina B₁₂

Debido a la complejidad de la molécula y a su pequeña concentración en las fuentes naturales resultó una tarea ardua la determinación de su estructura.

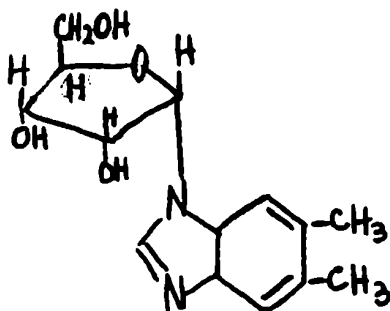
El primero en estudiar la constitución de la vitamina fue Smith (6) quien observó la presencia de cobalto como una característica notable de la vitamina, pues ese elemento no había sido hallado antes en ninguna sustancia orgánica de origen natural.

Las primeras determinaciones serias efectuadas le asignaron un contenido de cobalto de 4,5 % lo que indicaría un peso molecular mínimo cercano a 1900 (9). El análisis elemental le atribuyó una fórmula comprendida dentro de los siguientes límites C₆₁₋₆₄H₈₄₋₉₂O₁₃₋₁₄N₁₄P Co.

La hidrólisis ácida en caliente seguida de cromatografía sobre papel para separar las sustancias producidas permitió aislar tres compuestos que se llamaron α , β y δ (9). El compuesto δ se identificó con el 5-6 dimetilbencimidazol I que ya Beaven (10) había reconocido como constituyente de la vitamina mediante estudios espectrales



El compuesto β es un nucleósido de esta base, el N α -d-ribofuranosil 5-6 dimetilbencimidazol II



II

El compuesto α es el nucleótido correspondiente con el grupo fosfato en 3'. La estructura de los tres fué confirmada por síntesis.

Es interesante el hecho que el glucósido bencimidazólico tenga una configuración α cuando los glucósidos naturales de la purina son glucósidos β (11).

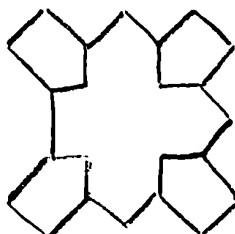
Por hidrólisis vigorosa de la vitamina B₁₂ se obtuvieron además: 5-6 moles de NH₃ que se comprobó procedían de amidas primarias; una sustancia que reacciona con la ninhidrina, que es el d-amino 1 propanol 2 que también está ligado a modo de amida (12) (13); ácido fosfórico (14) y un macro fragmento amorfo que contenía el átomo de Co. Este resto se estudió por oxidación, hidrólisis controlada y cristalografía con rayos X.

Mediante la hidrólisis suave seguida de electroforesis y cromatografía sobre papel se pudieron separar una serie de ácidos que conservaban el nucleótido combinado y poseían de 1 a 6 grupos carboxilo (11). Estos ácidos regeneraban la vitamina B₁₂ por transformación en las amidas correspondientes.

Por hidrólisis más vigorosa se obtuvo una serie de ácidos desprovistos de nucleótido y que poseían de 1 a 7 grupos carboxilo, lo que indicaba que la unión del nucleótido con el resto de la molécula se haría por medio de un séptimo carboxilo combinado en forma de amida con el aminopropanol esterificado a su vez con el ácido fosfórico del nucleótido.

La estructura del anillo central de la vitamina surgió de los trabajos de Cannon y col. quienes lograron aislar de hidrolizados

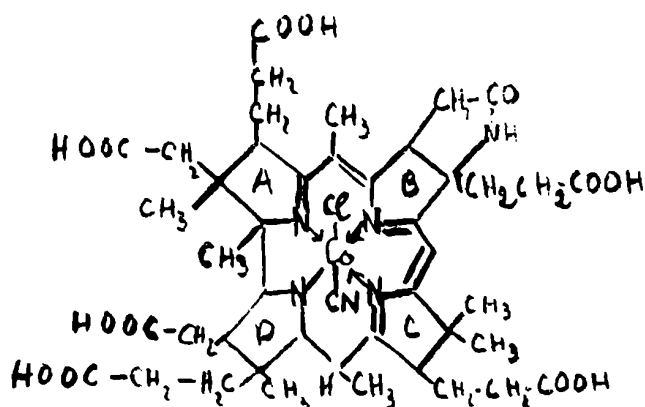
alcalinos de vitamina B₁₂ el cloruro de un ácido hexacarboxílico libre de malestido (15). El examen de este producto por rayos X llevó al conocimiento del sistema cíclico que rodea al átomo de cobalto. Estructura III (16).



III

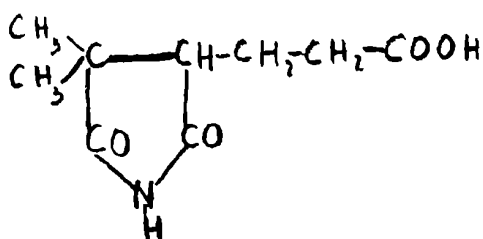
Esta estructura recuerda la de la hemina con la diferencia que dos de los anillos nitrogenados están unidos directamente y no por un átomo de carbono como sucede en las porfirinas naturales.

Desde entonces se determinó la posición relativa de todos los átomos excepto el hidrógeno por densidad electrónica. Estos resultados llevaron a proponer la fórmula IV (17).



IV

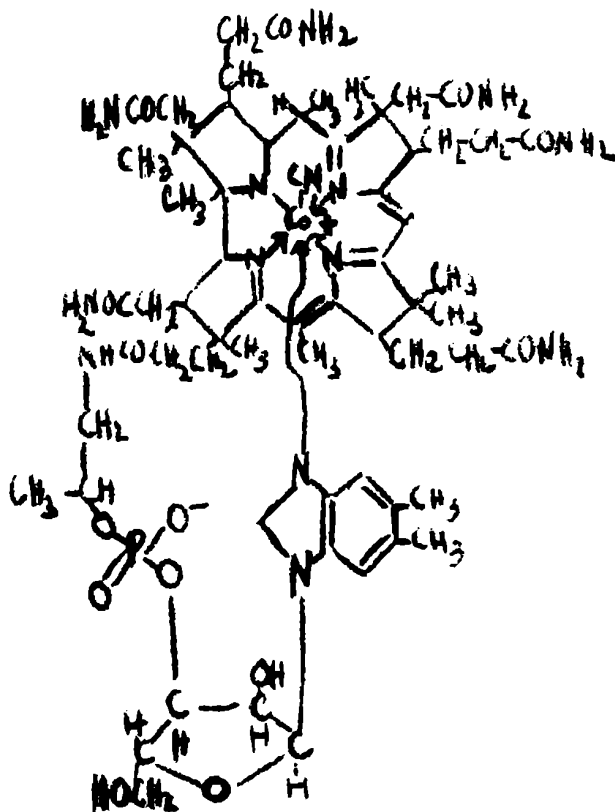
De los seis grupos ácidos presentes se observa que cuatro están como restos de ácido propiónico y dos de ácido acético. Según esta fórmula el anillo B estaría unido a una agrupación lactámica. Habría también ocho grupos metilo lo que está de acuerdo con el análisis químico. La estructura del anillo C está confirmada por el aislamiento de la succinimida V entre los productos de oxidación del ácido hexacarboxílico (18).



V

Por estudios de densidad electrónica en la misma vitamina B₁₂ se estableció que en ésta el anillo B no está ligado a una agrupación lactámica sino que habría un grupo CH₃ y un resto de acetamida en una posición (A) y en la otra un resto propionamida. El grupo cianuro estaría unido al cobalto del lado opuesto al que se encuentra en el ácido hemiacarboxílico. El amino propanol esterifica el ácido propiónico del anillo D.

En base a estos datos se formuló en agosto de 1955 la estructura molecular de la vitamina VI, que sería un híbrido con una carga negativa en el fosfato y una positiva en el átomo de cobalto. El número exacto y la posición de los dobles enlaces es todavía incierta. La fórmula molecular que le corresponde es C₆₃H₉₀O₁₄N₁₄PCo (19).



b) Propiedades físicas y químicas de la vitamina B₁₂

La vitamina B₁₂ cristaliza de acetona acuosa o agua en forma de pequeñas agujas rojo oscuro que por calentamiento a 210^o-220^o se oscurecen y funden por encima de 300^o.

Su solubilidad en agua es de 1,25 %. El espectro de absorción es característico y se utiliza en diversas reacciones de identificación; en solución acuosa al 1 % y en célula de cuarzo de 1 cm pre-

señala tres máximos a 278, 361 y 548 m μ respectivamente, Cuadro N $^{\circ}$ 1 .

Cuadro N $^{\circ}$ 1 - Extinciones de una solución acuosa de vitamina
B $_{12}$ al 1 %

E 1 % 1 cm			Bibliografía
278 m μ	361 m μ	548 m μ	
108	183	57	(12)
115	204	63	(8)
115	207	63	(20)
115	200	63	(21)

Es estable en solución acuosa entre pH 4,5-5,0 y su actividad no varió en soluciones conservadas a temperatura ambiente durante más de dos años (22). El calentamiento de soluciones ácidas (pH: 5,0) durante 1 h a 120 $^{\circ}$ C produjo una disminución del 3 % de su actividad, elevándose al 12 % cuando la solución era neutra. Por otra parte es rápidamente inactivada a pH menores de 2 y mayores de 7 (21).

e) Vitaminas del complejo B $_{12}$

El complejo B $_{12}$ comprende una serie de sustancias que estructuralmente se diferencian de la vitamina B $_{12}$ propiamente dicha, en el radical unido al átomo de cobalto.

Son todos compuestos cristalinos de color rojo, de propiedades físicas muy similares y activos sobre microorganismos y animales. Se han obtenido a partir de fuentes naturales y algunos de ellos por acción de distintos reactivos sobre la vitamina B $_{12}$. Por reducción de ella en presencia de óxido de platino como catalizador se obtuvo un factor también identificado en productos de fermentación y en extractos de hígado que se denominó vitamina B $_{12}$ (23) (24). Su espectro de absorción es muy semejante al de la vitamina B $_{12}$ pero por otra parte posee menor actividad biológica que ésta.

La vitamina $B_{12} b$ se aisló de los productos de la fermentación del Streptomyces aureofaciens por cromatografía en columna de sílice (25), del extracto de hígado (26) y por hidrogenación catalítica de la vitamina B_{12} (27). Sus propiedades pusieron de relieve que en ella el grupo cianuro de la vitamina B_{12} ha sido reemplazado por un cehidride. Se transforma fácilmente en vitamina B_{12} por acción del CNK (28) (29). Actualmente los factores $B_{12} a$ y $B_{12} b$ se consideran idénticos.

La diferencia más notable entre las vitaminas B_{12} y $B_{12} b$ es la mayor inestabilidad de esta última lo que se debería a que la unión $OH-Co$ es de carácter iónico y por lo tanto más lábil que la $CN-Co$ debido a que ésta por la presencia de la triple ligadura ($C \equiv N$) daría lugar a estructuras de resonancia en equilibrio lo que entrañaría una mayor estabilidad de la molécula. Por esta razón cuando se extrae la vitamina de fuentes naturales, se prefiere agregar cianuro al medio de extracción para transformar la vitamina $B_{12} b$ en la más estable vitamina B_{12} .

La complejidad introducida por los distintos factores hizo necesario el ordenamiento de su nomenclatura la que se limitó a llamar cobalamina al resto de la molécula de vitamina B_{12} desprovista del grupo cianuro. Los distintos factores relacionados se nombrarían entonces mencionando el grupo adicionado al cobalto. La vitamina B_{12} se convertiría por lo tanto en cianocobalamina y el factor $B_{12} a$ ($B_{12} b$) en hidroxicobalamina.

La lista se agranda con la nitritocobalamina (vitamina $B_{12} c$) producida por el Streptomyces griseus (30), y la sulfatocobalamina obtenida por acción del ácido sulfuroso sobre la vitamina B_{12} .

Ultimamente se han descrito además la cloro, cianato, tio-cianato cobalaminas, así como los llamados cobalicronos que son complejos de coordinación con amoníaco, aminas y algunos aminoácidos (31). Las diferencias esenciales entre ellas residen en sus distintos índices de refracción, R_f cromatográficos, sus espectros de absorción y los coeficientes de partición en mezclas de disolventes (32). Su acti-

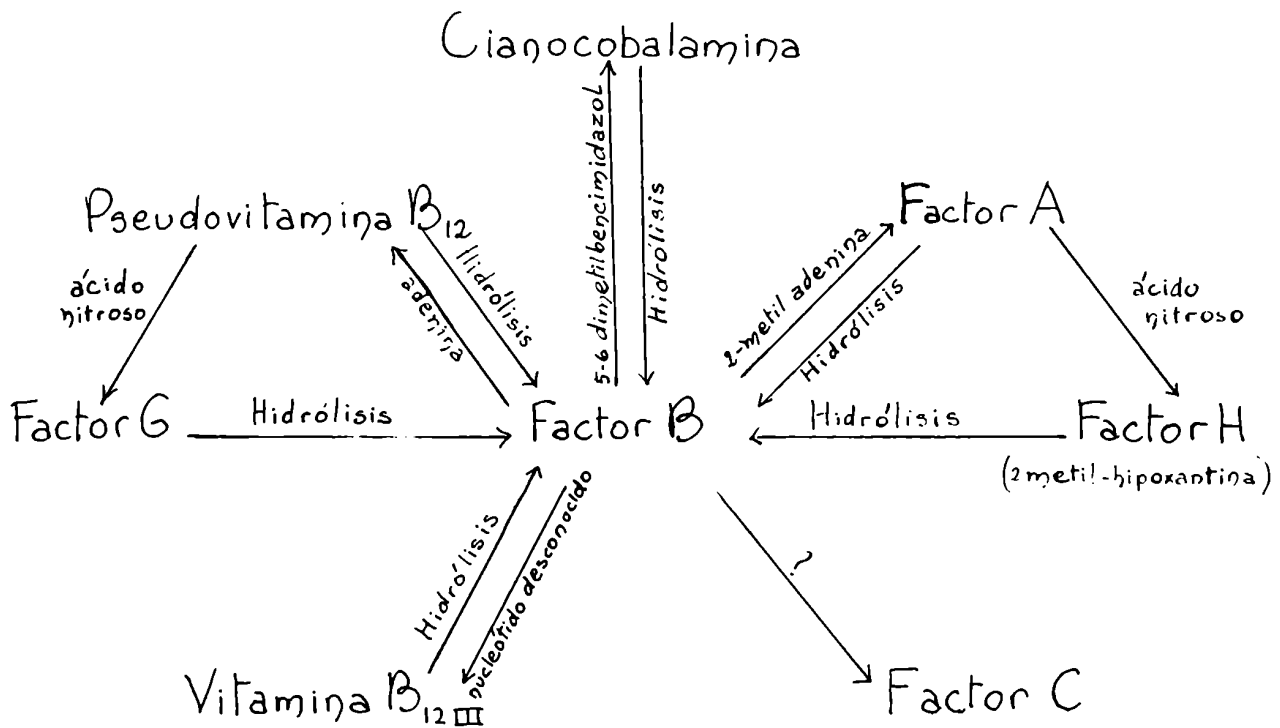
vidad microbiológica varía desde un 30 % hasta un 100 % de la de vitamina B_{12} , en la cual pueden ser transformadas por acción del cianuro de potasio.

Además de las sustancias mencionadas se conocen otras que se denominan factores pues solo presentan actividad microbiológica y poca o ninguna acción clínica o favorable del crecimiento de animales. Una excepción la constituye el factor llamado B_{12} III que se ha mostrado activo en la anemia perniciosa (33). La mayoría han sido aislados de Barros cloacales, heces de animales y de otras fuentes de fermentación microbiana, confirmando la estructura de algunos de ellos por biosíntesis.

Para su separación y reconocimiento resultó de gran utilidad la cromatografía sobre papel y la ionoforesis mediante las cuales se separaron unas diez sustancias que contienen cobalto y poseen espectros de absorción muy semejantes a los de la vitamina B_{12} .

Se pueden indicar al factor B como la sustancia madre de toda la serie. En efecto, su molécula está constituida por la de vitamina B_{12} desprovista del nucleótido. Su relación con los distintos factores y algunas vitaminas puede verse en la figura 1. De ella surge que la diferencia entre los factores y la vitamina B_{12} estriba en la base unida al nucleótido correspondiente. Del estudio de las relaciones indicadas surgió la posibilidad de biosíntesis de los distintos factores mediante el uso de microorganismos apropiados y en presencia del factor B y derivados de la purina o del benzimidazol. Empleando el *E. coli* 113-3 mutante artificial, se han podido realizar las síntesis indicadas en el cuadro N° 2.

Figura 1 - Relaciones del factor B con los demás factores



Cuadro Nº 2 - Biosíntesis de los distintos factores relacionados con la vitamina B₁₂

Sistema	Factor predominante en los extractos celulares	R _F en dos solv.	
		1	2
Factor B (control)	Factor C	0,02	0,04
♦ nucleótido de B ₁₂	Vitamina B ₁₂	0,25	0,30
♦ 5-6 dimetilbencimidazol	Vitamina B ₁₂	0,25	0,30
♦ 5-metilbencimidazol	Factor nuevo	0,19	0,23
♦ bencimidazol	Factor nuevo	0,17	0,24
♦ 5-6 diclorobencimidazol	Factor nuevo	0,35	0,41
♦ 4 cloro 1-2 benzotriazol	Factor nuevo	0,25	0,40
♦ 5 nitrobencimidazol	Factor nuevo	-	0,23
♦ 5 aminobencimidazol	Factor nuevo	-	0,14
♦ adenina	Pseudovitamina B ₁₂	0,11	0,035
♦ 2-metiladenina	Factor A	0,13	0,12
♦ 2-6 diaminopurina	Factores nuevos	0,04 0,06	0,04 0,07
♦ 2-6-dicloroadenina	Factor nuevo	0,22	0,25

- 1) butanol sec. / ácido acético / agua
- 2) butanol sec. / NH₃ / agua

FACTOR	ESTADO	BASE DEL NUCLEÓTIPO	ABSORCIÓN MÁXIMA (m ^μ)	n _D ²⁰	B		MOVILIDAD IONOMÉTRICA en 2 x V x seg x 10 ⁻⁵	BIBLIOGRAFÍA
					BUTANOL Sec/Acido Acético/agua	BUTANOL sec/amoníaco/agua		
Factor B	Amorfo	No tiene	276, 315, 355, 503, 530	—	0,50	0,45	(35)(36)(37) (38)(33)(31)	
Pseudovitamina B ₁₂	Cristalino	Adenina	278, 308, 320, 361, 518, 548-50	204 361	0,11	0,085	(39)(40)(33)	
Factor A	Cristalino	2-Metil-adenina	280, 320, 361, 520, 548	204 361	0,13	0,12	(36)(39)(33) (40)(41)(42)	
Factor C ₁	?	?	?	—	0,02	0,04	(36)(33)(39)	
Factor C ₂	?	?	?	—	0,04	0,06	(36)(33)(39)	
Factor E	?	?	?	—	0,35	0,40	(33)	
Factor F	Cristalino	?	?	—	0,21	0,17	(33)	
Factor G +	Cristalino	Biponanzina	359, 516, 540,	—	—	—	(40)(41)(33)	
Factor H ++	Cristalino	2-metil-biponanzina	358, 517, 540,	—	—	—	(40)(41)(33)	
Vitamina B ₁₂ III	Cristalino	?	295, 361, 518, 550	204 361	0,13	0,14	(33)	
Cianocobalamina	Cristalino	5-6-dimetil-biponanzina	278, 361, 520, 550	204 361	0,25	0,30	0	

+ Se obtuvo por desaminación de la pseudovitamina B₁₂

++ Se obtuvo por desaminación del factor A

B) MÉTODOS DE DETERMINACION DE VITAMINA B₁₂

Las técnicas descriptas pueden clasificarse en: físicas, químicas, biológicas incluyéndose en estas últimas a las microbiológicas. Todas ellas son o fueron valiosas pues reemplazaron al primitivo método de dosaje en pacientes con anemia perniciosa.

a) Métodos químicos y físicos

Se mencionarán solamente los más importantes sin pretender abarcarlos en su totalidad.

En el estudio de muestras cuyo principal y único constituyente coloreado es la cianocobalamina se han mostrado particularmente útiles los llamados métodos espectrofotométricos. Estos pueden emplearse para la identificación cualitativa de la vitamina o para su dosaje. En efecto, para el primer objetivo basta con determinar las absorciones correspondientes a 278, 361 y 548 m μ empleando para ello una cubeta de cuarzo de un cm. y agua destilada como testigo. En el caso de tratarse de vitamina B₁₂ deben cumplirse las siguientes relaciones:

$$\frac{A_{361}}{A_{278}} \quad \text{no} \quad < \quad 1,68 \quad \text{y} \quad \text{no} \quad > \quad 1,88$$

$$\frac{A_{361}}{A_{548}} \quad \text{no} \quad < \quad 2,83 \quad \text{y} \quad \text{no} \quad > \quad 3,45$$

El dosaje de la vitamina se hace de terminando la absorción de la muestra a 361 m μ practicándose dicha medida en una solución de 4 mg % en caso de una muestra sólida y aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{361}}{0,0207} \quad \times \quad \frac{1}{P} \quad \times \quad \frac{100}{100-p}$$

donde P = peso de la muestra en mg/10 ml

p = pérdida de peso de la muestra por secado 2 hs. a 105° C y a una presión no mayor de 5 mm de Hg.

La fórmula a aplicarse en el caso de una solución acuosa de vitamina B_{12} es más sencilla:

$$\frac{A_{281}}{0,0207} = \gamma \text{ de Vit. } B_{12}/\text{ml}$$

Una variación de la técnica enunciada fué propuesta por Marsh y Kusel (43) quienes la aplicaron a mezclas complejas de vitaminas previa separación de las interferencias mediante determinadas resinas intercambiadoras.

Dentro de los métodos espectrofotométricos se encuentran también los que valoran el cobalto de la molécula (44) y el de Boxer y Richards (45) que dosan el 5-6 dimetilbencimidazol liberado por hidrólisis. Es de notar que los primeros son de aplicación limitada ya que no identifican el origen del cobalto dosado.

También Boxer y Richards (46) son los autores de una técnica que dosa el radical cianuro liberado por fotólisis. Este método permite valorar hasta 0,005 μ g de CN^- aunque es poco específico.

Para terminar con los métodos espectrofotométricos mencionaremos el de Bachey, Boley y Shank quienes en 1954 (47) describieron una técnica de dilución isotópica que es específica para dosar cianocobalamina aún en extractos de baja potencia, pero que resulta inaplicable para trabajos de rutina. Consiste en agregar a la muestra a ensayar una cantidad conocida de cianocobalamina marcada con Co^{60} procediéndose luego a aislar la vitamina B_{12} pura que se determina por espectrofotometría. La radioactividad del producto aislado mide la cantidad de cianocobalamina recuperada después de las distintas etapas de extracción. Por este método se han podido ensayar muestras que contenían 100 γ de vitamina B_{12} en concentraciones tan bajas como 0,1 γ /ml.

También se han indicado técnicas que se basan en el característico coeficiente de partición de la vitamina B_{12} en el sistema agua-alcohol benzílico. En efecto, salvo la interferencia de sustancias coloreadas puede dosarse vitamina B_{12} efectuando ensayos de distribución a contracorriente (48).

b) Métodos biológicos

Los consideraremos agrupados en:

- 1) Los que utilizan animales de experimentación (incluido el hombre)
- 2) Los que emplean microorganismos (bacterias, algas, protozoarios).

1) Son métodos largos y pocos exactos pero que en algunas ocasiones son necesarios para verificar los resultados obtenidos mediante otras técnicas más sencillas. Presentan la ventaja de poder realizarse, aunque con limitaciones, con la muestra directamente y sin separaciones previas.

Los animales que se emplean son en general pequeños y de crecimiento rápido: pollo, rata, ratón y cobayo.

En el desarrollo de las técnicas es necesario cuidar algunos factores que las hacen complejas. Estos son, entre otros: biológicos, del medio ambiente (temperatura, humedad, iluminación, ventilación, etc.) y de la ración alimenticia. Completa el conjunto de dificultades el hecho de que la flora intestinal de los animales es capaz de sintetizar la vitamina, la que por otra parte existe como reserva de origen materno. En esencia las técnicas que utilizan animales de experimentación requieren planteles deficientes en vitamina B_{12} lo que suele conseguirse alimentándolos con dietas pobres y aislándolos de sus heces (49).

Cuthbertson y Thornton (50) emplearon una dieta a base de soja y glucosa para obtener una colonia de ratas deficientes en vitamina B_{12} .

Se puede lograr el mismo objetivo mediante dietas sintéticas a base de sustancias pobres en grupos metilo lábiles. Un factor físico que permite obtener idéntico resultado es el frío. Otras veces se puede recurrir a animales de crecimiento retardado, lo que se logra incorporando caseína iodada a la dieta de ratones normales (51).

Ahora bien, el efecto de la vitamina B_{12} es distinto según sea el animal de experimentación; ni el pollo ni la rata presentan alteración del cuadro hemático por carencia de la vitamina. En los ensa-

yes que utilizan estos animales se sigue su aumento de peso, que es proporcional a la vitamina B_{12} que se incorpora a la dieta con el material que se ensaya.

Por otra parte, en el cobayo, la falta de la vitamina altera no sólo el crecimiento normal sino que produce también trastornos hemáticos, razón por la cual algunos autores lo consideran el más eficaz para estudiar la actividad hematopoyética de la vitamina.

En cuanto a la especificidad de su acción en los animales se puede señalar que el pollo y la rata responden no sólo a la vitamina B_{12} sino también a las demás sustancias que forman el F.P.A. (factor proteico animal), por ello los resultados obtenidos son en general más elevados que los hallados por los métodos microbiológicos (52). Por otra parte los factores relacionados a la vitamina B_{12} que influyen en estos últimos no afectan los ensayos en animales, a excepción del factor B_{12} III como ya se indicó anteriormente.

2) Los métodos microbiológicos presentan la ventaja de su sencillez, especificidad, rapidez y exactitud. Han sido empleados para el dosaje no solo de vitaminas y aminoácidos sino también para la determinación de pequeñas concentraciones de metales. Se requiere para ello el microorganismo adecuado y un medio basal que contenga todas las sustancias necesarias para su crecimiento a excepción del factor que se investiga. Luego de un tiempo de incubación se observa y mide el desarrollo que será proporcional a la concentración del factor. Se construye entonces una curva standard con las cantidades de sustancia presente y el desarrollo obtenido. Trabajando en iguales condiciones puede hallarse por interpolación el contenido de dicha sustancia en una muestra incorporada al medio deficiente y determinando el crecimiento.

La variación biológica que afecta los ensayos con animales no influye en cambio en las determinaciones microbiológicas pues en estas últimas las respuestas son un promedio de las actividades de millones de microorganismos.

En lo que sigue, pasaremos revista detallada por ser el tema de este trabajo de los métodos sugeridos para la determinación de la vitamina B_{12} mediante el empleo de microorganismos.

2a) Métodos que emplean Lactobacillus lactis

Cronológicamente son los primeros, ya que Shorb (2) empleó el L. lactis Dornier en el primer ensayo microbiológico de la vitamina B_{12} . En el cuadro N° 4 figuran los detalles salientes de las técnicas y en el cuadro N° 5 la composición de los medios basales respectivos.

CARACTERÍSTICAS DE LAS TÉCNICAS DE REEMPLAZO L. LACTIS

AUTOR	MICROORGANISMO REEMPLAZADO	TÉCNICA DE ENSAYO	CULTIVO Y TIPO DE MICROORGANISMO	INOCULO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	DETERMINACIÓN
Zborb y Sriebs (53)	<u>L. Lactis</u> Berner ATCC 5000	Tubo de ensayo común. Volumen total 10 ml.	Extracto de levadura Skim milk (Bifco) Jugo de tomate	En la técnica descripta no figuran detalles.	66 hs. - 37°C	Turbidimétrica
Greene, Brook y Mc./Wormack (54)	<u>L. Lactis</u> Berner ATCC 5010	Tubo de ensayo común. Volumen total 10 ml.	Extracto de levadura Skim milk (Bifco) Jugo de tomate	Cultivo de 18-24 hs. a 37°C en medio basal más 0,2 mg de extracto de hígado. Sedimento suspendido en S.F. estéril y diluido 1:50. Siembra 1 gota por tubo	40 hs - 37°C	Turbidimétrica
Carvell, Keditseben y Hendlin (55)	<u>L. Lactis</u> Berner variante 6°	Tubo de ensayo grande. Volumen total 5 ml.	Extracto de levadura 1% Glucosa 1% Jugo tomate 0,02% Agar Facto 1,5%	Cultivo de 24 hs. a 37°C en medio basal + 0,009 de vit. B12/ml. Sedimento lavado 2 veces con A.D. y diluido a 20-25% de transmisión de luz. Siembra 1 gota por tubo	40 hs. - 37°C	Titulación de acidas con NaOH 0,05N
Poster, Lilly y Woodruff (56)	<u>L. Lactis</u> Berner ATCC 10.697	Placa de Petri 25 ml medio basal fundido, en friedo a 52°C y sembrado. Se usan 6 colonias por placa	Extracto de levadura 1% Dextrosa 1% Jugo de tomate 0,02% Agar Facto 1,5%	Cultivo de 18 hs. a 37°C en medio base sin agar al cloruro de sodio + 0,0001 Vit. B12/ml. 1 lt. de medio basal es siembra con 5 ml. de inoculo.	18 hs. - 37°C	Medición del diámetro de la zona de crecimiento

Cuadro N° 5 - Medios basales (a) para la determinación de Vit. B₁₂
con Lactobacillus lactis

Componentes	(1) Shorb y col. (53)	(2) Greene y col. (54)	(3) Casvall y col. (55)	(4) Foster y col. (56)
Hidrolizado de caseína	-	10 g	2 g	2 g
Mezcla de aminoácidos	(b)	-	(c)	-
L. Cystina	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg
D.L. Triptófano	800 "	200 "	800 "	800 "
Acetato de sodio (anh.)	12 g	12 g	12 g	12 g
SO ₄ F ₂ 7 H ₂ O	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg
SO ₄ Na 4 H ₂ O	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
PO ₄ H ₂	1 g	1 g	1 g	1 g
PO ₄ H ₂ K	1 g	1 g	1 g	1 g
Adenina	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
Guanina ClH	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
Uracilo	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
Xantina	20 mg	-	-	-
Pireidixina	4 mg	-	-	-
Niacina	8 mg	2 mg	400 γ	400 γ
Riboflavina	4 mg	400 γ	400 γ	400 γ
Tiamina	20 mg	400 γ	400 γ	400 γ
Pantotenato de Ca	4 mg	400 γ	400 γ	400 γ
Biotina	10 γ	4 γ	0,8 γ	0,8 γ
Acido fólico	10 γ	4 γ	4 γ	4 γ
Piridoxamina	-	800 γ	800 γ	800 γ
Acido p-aminobenzoico	4 mg	200 γ	80 γ	80 γ
Jugo de tomate	100 ml	100 ml	-	-
Glucosa	20 g	20 g	20 g	20 g
Cl ₂	20 mg	20 mg	20 mg	40 g
d-l-alanina	400 mg	-	400 mg	400 mg
Acido fumárico	-	-	1 g	1 g
Etiloxalacetato de Na	-	-	1 g	1 g
Esterilización	-	3' 120°C	13' 15 lb.	20' 120°C

- a) Las cantidades se refieren a 1 l de medio de doble concentración.
 b) l-arginina, ácido d-l aspártico, ácido l-glutámico, glicina, l-histidina, l-hidroxiprolina, dl isoleucina, l-leucina, dl lisina, d-l metionina, d-l norleucina- d-l fenilalanina, l-prolina, d-l serina, d-l treonina, l-tirosina, d-l valina, 400 mg de cada uno.
 c) d-l leucina, d-l isoleucina, d-l valina, d-l metionina, l-tirosina, d-l fenilalanina, ácido d-l glutámico, d-l treonina, ácido d-l aspártico, l-arginina, l-histidina, d-l serina, d-l norleucina, glicina, 400 mg de cada uno - l-lisina, 200 mg.

2 b) Métodos que emplean L. Leichmannii

Para obviar la dificultad del riguroso control de las condiciones de trabajo que presentan los métodos que emplean el L. lactis se propuso reemplazar a éste por el L. leichmannii. Evidentemente este microorganismo presenta ventajas con respecto a aquél pero responde también a la timidina y a desoxiribósidos (57). Esta interferencia que es particularmente notable en ensayos en placa se puede evitar fácilmente por dilución y trabajando en tubos de ensayo. Desde luego que ello no rige si la concentración de las interferencias es elevada y el contenido de vitaminas B_{12} bajo. En este caso es necesario practicar una doble determinación con la muestra tal cual y luego de un tratamiento con NaOH que destruye la vitamina B_{12} y no afecta los desoxiribósidos (58).

Otro camino para evitar las interferencias es separando las vitaminas y factores por cromatografía sobre papel y revelar por método microbiológico en placa (59). Los distintos R_f de las sustancias separadas permite identificarlas.

Con el objeto de evitar la destrucción de la hidroxicobalamina por acción del calor de esterilización (60), Ford (61) recomendó el agregado de CNK que incorporado al líquido de extracción de la muestra permite transformar las cobalaminas en cianocobalaminas. En este caso es necesario cuidar de no agregar una cantidad mayor a los 10^{-4} g/ml de medio final.

También se ha mencionado el uso de reductores (ácido tioglicólico, cisteína, glutatión, ácido ascórbico) que protegen las cobalaminas de la acción del calor.

Keeggs (62) se manifestó partidario del ácido tioglicólico que uniría a su acción reductora un efecto promotor del crecimiento del L. leichmannii. En apoyo de esto último puede indicarse que los ácidos orgánicos en general actúan activando el desarrollo del microorganismo. El ácido acético mismo o sus sales que se incorporan como buffer a los medios son también promotores del crecimiento de estas bacterias.

En el cuadro N° 6 se pueden observar detalles de las técnicas

cas mencionadas empleando como microorganismo L. leichmannii y en el cuadro nº 7 la composición de los medios basales respectivos.

CUADRO N° 6

CARACTERISTICAS DE LOS METODOS QUE EMPLEAN L. LEICHMANNII

AUTOR	MICROORGANISMO EMPLEADO	TECNICA DE ENSAYO	CULTIVO STOCK DEL MICROORGANISMO	INOCULO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	DETERMINACION
Capps, Hobbs y Fox (63)	<u>L. Leichmannii</u> ATCC 4797	Tubo de ensayo común. Volumen total 10 ml.	Extracto de levadura 2% Proteosa peptona 0,5% Glucosa 1,0% PO4H2K 0,2% Tween 80 0,01% Beato agar 1,0%	Cultivo de 24 h a 37°C en el medio: Extracto de levadura 2% Proteosa peptona 0,5% Glucosa 1,0% PO4H2K 0,2% Tween 80 0,01% Sedimento lavado 4-5 veces en S.F. estéril y diluido. Siembra 1 gota por tubo	18 hs. a 37°C	Turbidimétrica
Winstein y Eigen (64)	<u>L. Leichmannii</u> ATCC 7830	Tubo de ensayo común. Vol. Total 10 ml ó en placa de Petri	Subcultivos semanales En Agar Difco-triptosa	Cultivo de 24 hs. a 37°C en el medio. Tryptosa 2% Skim milk 2% A.D. 100	Tubo 72 hs. 37°C	Titulación acidez NaOH 0,1M
Skiggs, Nepple Valentik, Huff y Wright (62)	<u>L. Leichmannii</u> ATCC 4797	Tubo de ensayo común. Vol. total 10 ml.	Subcultivos mensuales en el siguiente medio: Skim Milk (Difco): 10% Tryptosa : 1% A.D. : 100 Agar : 1%	Se suspenden 0,1 ml de un cultivo de 24 hs. a 37°C en 10 ml. de S.F. y luego se diluye 1:10 en S.F. El medio empleado es el mismo del stock pero sin agar	Placa de Petri una noche a 37°C 24-72 hs. a 37°C	Intensidad de desarrollo Turbidimétricas (24-48 hs.) 6 Titulación de acidez con NaOH 0,1M (72 hs)
Fernscoopes Norteamericana Ed XIV (65)	<u>L. Leichmannii</u> ATCC 7830	Tubo de ensayo común. Vol. total 10 ml.	Extracto de levadura 0,75% Beato peptona 0,75% Glucosa anhidra 1,0% PO4H2K 0,2% Tween 80 sol. 10% 1 ml Jugo de tomate 10 ml Agar 1,25 g A.D. 100 Este medio se ajusta a pH 6,8 con NaOH 1M	Cultivo de 16-24 hs. a 37°C en el medio usado para el stock pero sin agar. Sedimento lavado 3 veces con 10 ml de medio basal dilución 1:1 y suspendido en otros 10 ml. Siembra 1 gota por tubo.	72 hs. a 37°C	Titulación de acidez con NaOH 0,1 M

Cuadro N° 7 - Medios basales para la determinación de vitaminas B₁₂
con Lactobacillus leichmannii

Componentes	1	2	3
	Winstain y Eigen <u>L. leichmannii</u> AICC 7830	Skoggs, Apple, Huff y Wright <u>L. leichmannii</u> AICC 4797	Valentik, U.S.P. Ed. XIV <u>L. leich-</u> <u>mannii</u> AICC 7830
Hidrolizado de caseína	100 ml	10 g	-
Acidos caseínicos	-	-	15 g
L-cistina	400 mg	200 mg	400 mg
dl triptófano	800 mg	400 mg	400 mg
acetato de sodio (anhidro)	40 g	12 g	20 g
SO ₄ Fe 7H ₂ O	20 mg	20 mg	20 mg
SO ₄ Mg 7H ₂ O	400 mg	400 mg	400 mg
SO ₄ Mn 4H ₂ O	20 mg	20 mg	20 mg
PO ₄ HK ₂	5 g	1 g	1 g
PO ₄ H ₂ K	5 g	1 g	1 g
Adenina sulfato	20 mg	10 mg	20 mg
Guanina Cl ₄	20 mg	10 mg	20 mg
Uracilo	20 mg	10 mg	20 mg
Xantina	20 mg	10 mg	20 mg
Tween 80	2 ml	2 ml	2 g
Piridoxina	2,4 mg	4 mg	4 mg
Piridoxal	500 γ	4 mg	4 mg
Piridoxamina	-	-	0,8 mg
Ac. nicotínico	1,2 mg	2 mg	2 mg
Riboflavina	400 γ	2 mg	1 mg
Tiamina	400 γ	2 mg	1 mg
Pantotenato de Ca	800 γ	2 mg	1 mg
Biotina	0,8 γ	10 γ	8 γ
Ac. fólico	1 mg	1 mg	0,2 mg
Ac. p-aminobenzoico	20 γ	1 mg	2 mg
Jugo de tomate	-	-	10 g
Aspargina	200 mg	-	200 mg
Glutamina	40 mg	-	-
Glucosa	40 g	40 g	40 g
ClNa	20 mg	20 mg	20 mg
Acido tiomálico	-	1 g	-
dl alanina	400 mg	-	-
Acido ascórbico	-	-	4 g
Acido ribonucleico	-	200 mg	-
Digerido enzimático de caseína	25 ml	-	-
Esterilización	no descripta	15 min. 120° C	5' 120° C

Las cantidades están dadas para 1 l de medio basal de doble concentración
Nota. La composición del medio basal empleado en el método de Capps, Hobbs y
Fox se describe más adelante al tratar la parte experimental pues fué el
utilizado en este trabajo.

2 e) Métodos que utilizan Escherichia coli para la determinación de vitamina B₁₂.

Teniendo en cuenta los requerimientos de vitamina B₁₂ de mutantes de Esch. coli aisladas por Davis y Mingioli (66) se desarrollaron varios métodos que utilizan esta bacteria en ensayos en tubo o en placa (67, 68, 69, 70). La cepa de uso más generalizado es la Esch. coli 113-3 Davis.

Como desventaja de estos métodos se puede mencionar que la metionina y especialmente todos los factores relacionados con la vitamina B₁₂ interfieren en las determinaciones. Precisamente, la mayoría de estos factores fueron descubiertos mediante ensayos bioautográficos, utilizando Escherichia coli para determinar la actividad de las distintas sustancias aisladas por cromatografía sobre papel.

Shive (71) describió un método para determinar vitamina B₁₂ basado en su propiedad de contrarrestar la acción inhibitoria que posee la sulfanilamida para el crecimiento del Escherichia coli.

Burkholder (72) recomendó una técnica sencilla utilizando la mutante 113-3 de Escherichia coli.

En el cuadro nº 8 se han resumido detalles de técnicas que emplean esta bacteria y en el cuadro nº 9 la composición de los medios basales respectivos.

CUADRO N° 8

CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE SIEMBRA MICROBIOLÓGICA.

AUTOR	MÉTODO MICROBIOLÓGICO	TÉCNICA DE SIEMBRA	CULTIVO STOCK DEL MICROORGANISMO	EXCUBA	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	DIFERENCIACIÓN
Shive (71)	<u>Sphaerobolus</u> gall	En placa de Petri. <u>Standard</u> por cuadruplicado. En 10 ml de medio basal ingulado, se colocan cuatro discos de papel y en cada uno 0,1 ml. de los cuatro standards de vit. B12. <u>Tubo</u> : or triplicado, las placas se preparan en la misma cámara; a dos discos se agrega el standard de vit. B12 y a los otros dos la solución que se ensaya.	Subcultivos dos veces por semana en el siguiente medio: Peptona: 1 % Glucosa: 4 % AGAR : 3 %	Se usa el medio basal sin agar ni sulfa. Se hacen 2 cultivos sucesivos de 24-48 hrs. a 37°C en 5 ml de medio. Centrifuga y resuspende en 5 ml. de S.F. estéril. 100 ml. de medio basal se siembra con 2 ml. de esta suspensión.	16-24 hrs. a 37° C	Medida del diámetro de la zona de crecimiento.
Buckholder (72)	<u>Sphaerobolus</u> gall 113-3 (Davis)	a tubo con un volumen total de 5 ml.	Agar Bifco	En cultivo de 10 hrs. a 37°C en caldo Bifco se centrifuga y resuspende en S.F. estéril. Se inocula con 1 gota por tubo.	15 - 18 hrs. a 30° C con agitación	Turbidimetría

Cuadro No 9

Medios basales para la determinación de vitamina B₁₂
con Escherichia coli

Componentes	Shive <u>Escherichia coli</u>	Burkholder (concentración doble) <u>Escherichia coli 113-3</u>
ClNH_4	9,99 g	-
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg	-
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg	200 mg
PO_4K_2	-	6 g
PO_4K_2	8 g	14 g
SO_4Mg	10 g	-
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	-	2 g
Acido L-glutámico	125 mg	200 mg
d l serina	20 mg	-
Timina	6 mg	-
Xantina	20 mg	-
Dextrosa (anhidra)	20 g	20 g
Sulfanilamida	200 mg	-
Agar	15 g	-
Acido p-aminobenzoico	20 γ	-
Biotina	2 γ	-
Pantotenato de Ca	400 γ	-
Acido fólico	6 γ	-
Inositol	2 mg	-
Acido nicotínico	400 γ	-
Piridoxina	6,68 mg	1
Riboflavina	400 γ	-
Tiamina cloruro	400 γ	-
Sodio tioglicolato	-	200 mg
Citrato $\text{Mg} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1 g
Asparagina	-	8 g
Arginina	-	200 mg
Glicina	-	200 mg
Histidina	-	200 mg
Prolina	-	200 mg
Triptófano	-	200 mg

2 d) Métodos que emplean Euglena Gracilis para la determinación de Vitamina B₁₂

Hutner y col. (73) encontraron que la Euglena gracilis var. BACILLARIS podía utilizarse para la determinación de la vitamina B₁₂. El ensayo es muy sensible y por lo tanto apropiado para dosar la vitamina en extractos de baja potencia (74,75). El microorganismo no responde a desoxirribósidos y el medio basal requerido para su crecimiento es simple, sin embargo su uso no se ha generalizado pues el ensayo es largo y es necesario disponer de un equipo especial para incubar los tubos a baja temperatura y expuestos a la luz.

Cuadro N° 10 - Características del método de Hutner y col. para dosaje de vitamina B₁₂ con Euglena gracilis.

Microorganismo empleado	Técnica de ensayo	Inóculo	Tiempo y temp. de incubación	Determinación
<u>Euglena gracilis</u> var. <u>bacillaris</u>	En tubos de 100 x 13 mm con un volumen de 2 ml.	10 ml de medio basal se suplementa con suficiente extracto de hígado como para obtener 2/3 de máximo crecimiento. Se siembra con una gota de este cultivo.	4 días 28-31°C	Turbidimétrica

En el cuadro N° 10 se dan las características de una técnica que utiliza Euglena gracilis var. bacillaris para el dosaje de vitamina B₁₂ y en el cuadro N° 11 la composición del medio basal.

Cuadro nº 11

Medio basal para la determinación de vitamina B₁₂ con *Bacillus gracilis*

Componentes	Hutner y col. (13)
$PO_4H_23H_4$	1,6 g
Citrato de K (monohidrato)	0,4 g
$SO_4Mg 7H_2O$	0,4 g
Butirato de Na	4,0 g
Glutanato monosódico	2,0 g
Cl_2Ca	0,2 g
$SO_4Fe 7H_2O$	40 mg
$SO_4Mn H_2O$	12 mg
$SO_4Co 7H_2O$	10 mg
Cl_2Zn	1,6 mg
$MoO_4Na_2 2H_2O$	2,0 mg
$SO_4Cu 5H_2O$	0,16 mg
Tiamina ClH	

2 e) Métodos que emplean protozoarios para el dosaje de vitamina B₁₂

Ultimamente (76,77) se han recomendado dos protozoarios para la determinación de vitamina B₁₂: Ochromonas malhamensis y Potriochromonas Stipitata.

Los datos obtenidos con estos organismos son los que más concuerdan con el ensayo biológico, lo que indica que no responden a los factores relacionados con la vitamina B₁₂. Son por lo tanto los microorganismos más específicos para la determinación de vitamina B₁₂ de todos los mencionados.

El ensayo con Cochranonas malhamensis requiere tres días de incubación y el que emplee Poterochromonas stipitata cinco a siete días, lo que constituiría una desventaja de estos métodos, pero ella estaría compensada por la gran especificidad obtenida en los resultados.

En el cuadro N° 12 se han resumido las actividades de la vitamina B₁₂ y los factores relacionados a ella frente a los distintos microorganismos citados. De su observación surge entre otras cosas que con el Escherichia coli algunos factores presentan distinta actividad según se haga la determinación en tubo o en placa, lo que los distinguiría de la vitamina B₁₂ que presenta igual actividad en ambos tipos de ensayo.

Cuadro N° 12

Actividad microbiológica de los factores relacionados con la vitamina B₁₂ (78)

Compuesto	Base del nucleótido	Actividad microbiológica				
		<u>Esch. coli</u> (en placa)	<u>Esch. coli</u> (en tubo)	<u>Lb. Leich-</u> <u>mannii</u> (en tubo)	<u>Euglena</u> <u>gracilis</u> (en tubo)	<u>Cochranonas</u> <u>malhamensis</u> (en tubo)
Cianocobalmina	5-6 dimetil benzimidazol	+++	+++	+++	+++	+++
Pseudovit. B ₁₂	Adenina	+++	+	++	++	-
Factor A	2 metiladenina	+++	++	++	++	-
Factor B	-	+++	+	-	-	-
Factor C ₁	no conocido	+++	+	+	+	-
Factor C ₂	no conocido	+++	+	+	+	-
Factor D	no conocido	-	-	-	-	-
Factor E	no conocido	+++	-	-	-	-
Factor F	no conocido	+++	++	-	-	+(?)
Factor G	Hipoxantina	+++	-	++	-	-
Factor H	2 metil-hipoxantina	+++	++	++	-	-
Factor I o Vit. B ₁₂ III	no conocido	+++	++	++	-	++

- +++ Actividad igual a la cianocobalamina
- ++ Actividad del orden del 50% de la cianocobalamina
- + Actividad del orden del 10% de la cianocobalamina
- Actividad < 1% de la cianocobalamina

C) - VITAMINA B₁₂ EN BARROS CLOACALES DIGERIDOS

a) El proceso de digestión de líquidos cloacales y residuales.

Las distintas etapas del proceso de digestión de los líquidos cloacales, tal como se realiza en la planta de Ezeiza (Fcia. de Buenos Aires) son en líneas generales las siguientes:

- 1º) El líquido cloacal crudo que llega a la estación de bombeo se hace pasar por un enrejado que retiene las materias gruesas.
- 2º) El líquido así tratado es impulsado por medio de bombas centrífugas al Establecimiento Depurador donde entra el sedimentador primario, cámara circular abierta en la que permanece 2 horas. Allí se separan los materiales sólidos en suspensión de mayor y menor densidad que el líquido, constituyendo respectivamente el barro y la espuma a digerir. Estos son impulsados por un mecanismo de brazos giratorios hacia una tolva ubicada en el centro.
- 3º) El líquido decantado junto con el que proviene de la recirculación del sedimentador secundario se conduce por cañerías al lecho percolador. Este está constituido por un gran tanque circular abierto con fondo perforado cubierto de una capa de pedregullo granítico.
El líquido cae en forma de lluvia, filtrando a través y dejando a su paso un sedimento de materia orgánica que es oxidado por el aire existente en los intersticios del lecho filtrante y por la ventilación proveniente de conductos de hormigón distribuidos en todo el perímetro de la estructura.
En esta etapa se cumple por lo tanto una acción mecánica de filtración que retiene las partículas más gruesas y una acción biológica debida a bacterias aerobias que transforman las materias orgánicas en solución o suspensión coloidal en compuestos más estables que coagulan en el sedimentador secundario.

- 4º) El líquido filtrado recogido en la canaleta colectora central pasa a una cámara de salida donde una parte se recircula (*) al sedimentador primario y el resto se conduce al tanque de sedimentación secundaria. Este es similar al sedimentador primario pero no posee equipo espumador pues en esta etapa no hay formación de espuma. El tiempo de sedimentación es también acá de 2 horas. Parte del líquido decantado se recircula a la salida del sedimentador primario, la purificación del resto se completa antes de su desagüe al río con el agregado de cloro.
- 5º) Los barroes acumulados en la tolva del sedimentador primario son aspirados e impulsados por bombeo al digestor, estructura de hormigón armado con fondo cónico que funciona como pose Isheff con varios compartimientos.
- Hay que señalar que la etapa de digestión no se cumple en condiciones óptimas, pues para esto habría que mantener una temperatura regulada de unos 30º mediante la calefacción del digestor.
- 6º) La última etapa de todo el proceso es el secado de los barroes digeridos que permanecen con tal fin en las playas de secado unos 15 días. Son piletas cubiertas de pedregullo y un manto filtrante de arena gruesa. El drenaje se hace por medio de caños perforados que conducen al escurrido al desagüe general. La deshidratación se realiza entonces por acción de drenaje y evaporación obteniéndose barroes que pueden ser usados luego como relleno o fertilizantes.

(*) La recirculación tiene por objeto :

- a) Efectuar una dilución del líquido afluyente con la consiguiente disminución de septicidad en el sedimentador primario y formación de espuma en el secundario.
- b) Nivelar las diferencias de caudal horario.

b) Antecedentes sobre la presencia de vitamina B₁₂ en barros cloacales digeridos.

Conocida la síntesis de la vitamina B₁₂ por bacterias del suelo e intestinales, era lógico suponer su presencia en los barros cloacales. Los primeros trabajos sobre este material realizados por Hoover y col. (79) confirmaron la existencia de vitamina B₁₂ en cantidades pequeñas pero significativas dada la extraordinaria actividad biológica de la misma. Por ello concluyeron que la cantidad presente en barros secos bajo condiciones suaves era bastante superior que la requerida para complementar la dieta animal.

En el cuadro N° 13 se han resumido los valores obtenidos por Hoover y col. (79).

Cuadro N° 13 - Vitamina B₁₂ en barros cloacales activados (1)

Muestra	B ₁₂ aparente	Factores de crecimiento estables en medio alcalino	B ₁₂ por diferencia
	µg/g	µg/g	µg/g
Barros residuales (húmedo)	8,8	1,6	7,3
Barros cloacales (húmedo)	9,7	0,4	9,3
Liofilizado	6,7	0,4	6,3
Secado 24 hs. a 105°C	4,0	0,4	3,6
Secado 24 hs. a 70°C en aire circulante	7,0	0,4	6,6
Secado en vacío	2,7	0,3	2,4
Producto comercial muestra A	3,2	0,4	2,8
muestra B	6,4	2,0	4,4

(1) Los valores están calculados sobre residuo seco según Hoover y col. (79).

Más tarde los mismos autores (80) analizaron el contenido de

vitamina en barros secos activados de distinta procedencia y lo encuadraron entre los valores de 3,5 a 4 mg/kg.

Cuadro N° 14

Contenido de vitamina B₁₂ en barros secos comerciales

Procedencia	Humedad %	Vitamina B ₁₂ (mg/g)			
		Método I (1)	Actividad no específica	Método II (2)	Método III (3)
Milwaukee Wis. (milorganita)	10,8	4,11	0,17	3,9	4,5
Chicago Ill. (Southwest plant)	4,6	3,74	0,30	3,4	2,9
Chicago Ill. (Columat plant)	2,2	1,81	0,19	1,5	1,6
Houston Tex. (Hou. Actinita)	10,0	3,77	0,22	3,5	3,4

- 1) Ensayo directo con L. leishmannii
- 2) Valores dados por el método I, menos la actividad no específica obtenida por el crecimiento del L. leishmannii después de la destrucción alcalina de la vitamina B₁₂.
- 3) Ensayo con L. leishmannii previa separación de la vitamina B₁₂ por cromatografía sobre papel.

Respecto al origen de la vitamina en dichos barros, fueron los autores mencionados los primeros en tratar de aclararlo. En efecto, estudiaron su variación a través de las distintas etapas del proceso de digestión de los barros, pero sus resultados no aclararon con exactitud si la vitamina es sintetizada por acción microbiológica en los tanques de aeración o si su presencia se debe únicamente a la cantidad incorporada con el líquido crudo.

Para un contenido de alrededor de 0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$ de líquido crudo, se encontró 150 $\mu\text{g}/\text{l}$ de barro digerido o 1,5 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 15 $\mu\text{g}/\text{g}$ respectivamente con respecto a los sólidos totales, una diferencia de sólo diez veces, lo cual indicaría que los tanques de aeración actúan especialmente como sistemas de refinamiento y concentración de la vitamina.

Más exitoso fue el trabajo de Sjöstrom y col. (81) que afirmaron haber probado que la vitamina B_{12} se producía en la digestión anaeróbica de los barros y consiguieron aislar de los mismos cianocobalamina cristalina determinando su identidad por espectrofotometría. Los ensayos los llevaron a cabo sobre muestras de barro tomadas en las distintas etapas de la digestión y que conservaban a -20°C hasta el momento de su estudio. Encontraron que más del 98% de vitamina B_{12} se encuentra adsorbida sobre las partículas suspendidas en el barro. Para liberar la vitamina sometían las muestras a 120°C durante 15' a $\text{pH} = 6$ y en presencia de 0,01% de CaCl_2 . Determinaron la vitamina B_{12} por el método de agar en placa con *Esch. coli* 113-3 previa separación de los demás factores de crecimiento por cromatografía sobre papel o ionoforesis. La concentración de vitamina B_{12} del barro digerido era de 1,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 22 $\mu\text{g}/\text{g}$ de sustancia seca. afirmaron que el 82% de vitamina se producía durante la digestión y un 18% estaba ya presente en los líquidos cloacales crudos (0,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La cromatografía sobre papel y la ionoforesis revelaron la presencia, además de la vitamina B_{12} , de los siguientes factores de crecimiento: Factor A, Factor B, pseudovitamina B_{12} , Factor C y Factor C_2 . Por ensayos con *L. lactis* Dorner se pudieron determinar pequeñas cantidades de tres desconocidos que eran los de la tiamina, adenina y guanina.

La presencia de vitamina B_{12} en barros cloacales digeridos, hizo pensar en la posible preparación de concentrados para enriquecer los alimentos animales y fue así que Miner y Wolnak (82) obtuvieron a partir de Hilorganita (fertilizador de origen cloacal) un concentrado con un contenido de 25 - 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de vitamina B_{12} .

D. PARTE EXPERIMENTAL

a) Instrumental de vidrio. En lo posible se empleó material nuevo que fué utilizado solamente para la determinación de vitenina B_{12} . Se lo sometió siempre a una limpieza enérgica que para el caso de los tubos de ensayo siguió los siguientes pasos: un primer lavado con detergente, enjuague con agua corriente, limpieza con mezcla sulfocárdica, enjuague con agua corriente repetido en exceso (unas 10 veces) y finalmente 3 enjuagues con agua destilada. Los tubos así tratados y sus tapas de aluminio se sometieron a un secado de 2 hs a 180° C.

El resto del material: erlenmeyers, pipetas buretas, matraces aforados, se lavó en igual forma pero se secó en estufa a 45° C.

b) Microorganismo empleado. Se usó el L. Leichmannii ATCC 4797. Se conservó esta bacteria por pasajes semanales en el siguiente medio de cultivo:

Extracto de levadura	7,5 g
Sacto peptona	7,5 g
Glucosa anhidra	10,0 g
PO_4H_2K	2,0 g
Tween 80 sol. 10%	10,0 ml
Jugo de tomate	100,0 ml
Se ajusta a pH = 6,8 con NaOH 1 M	
Agar	12,5 g
Agua destilada hasta	1000 ml

Se calentó todo en autoclave hasta disolución, filtró y distribuyó en tubos pequeños (10 ml) en cantidad de 3 ml en cada uno. Se esterilizó durante 20' a 120° C y se guardaron en heladera a 4° C hasta su uso.

El jugo de tomate se preparó también en el laboratorio mediante el siguiente procedimiento:

Se suspendieron 5 g de calite o filtercell en 1.000 ml de jugo de tomate comercial, se agitó bien y se filtró con ayuda de vacío

por un buchner adicionado de una capa de celite suficiente para dar un líquido límpido. El filtrado obtenido se guardó en heladera bajo capa de tolueno.

El L. Leishmannii se sembró por punción en el medio citado, se incubó a 37° C. durante 24 hs. y se mantuvo en heladera a 4° C hasta el momento de su uso. Se usó siempre para los pasajes un cultivo de no más de una semana.

c) Medio basal empleado en la determinación de vitamina B₁₂.

Se adoptó el medio de Capps, Hobbs y Fox (63) que se indica a continuación:

Acidos casamínicos libres de vitamina	12 g
Dextrosa	40 g
Acetato de sodio	20 g
l-Cistina	0,2 g
dl-Triptófano	0,2 g
Adenina	0,02 g
Guanina	0,02 g
Uracilo	0,02 g
Xantina	0,001 g
Tiamina Clorhidrato	0,002 g
Riboflavina	0,002 g
Niacina	0,002 g
Pantotenato de calcio	0,0002 g
Piridoxina Clorhidrato	0,004 g
Acido p-aminobenzóico	0,0002 g
Biotina	0,00001 g
Acido fólico	0,0001 g
Tween 80	2,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Fosfato monopotásico	1,0 g

Sulfato de magnesio	0,4 g
Cloruro de sodio	0,02 g
Sulfato ferroso	0,02 g
Sulfato de manganeso	0,02 g
Agua destilada hasta	1000 ml

Este medio se preparó a partir de soluciones madres de las sustancias que lo integran y cuya preparación y concentración se indica a continuación.

d) Preparación de soluciones de las sustancias integrantes del medio basal.

Todas las soluciones se mantuvieron en frascos bajo capa de tolueno y en heladera a 4° C hasta el momento de su uso. Como cada una de ellas tenía una duración determinada se las renovó a los tiempos que se indican particularmente.

Solución de ácidos casamínicos:

Se disolvieron 120 gr de ácidos casamínicos "Difco" en 900 cc de agua destilada. Se llevaron a pH = 3,5 con CaH y agregó entonces 15 g de carbón activo do. Se agitó durante media hora y se filtró usando colite grado analítico. El filtrado se llevó a un volumen de 1.000 cc con agua destilada.

Esta solución se conserva indefinidamente.

Solución cistina triptófano:

Se suspendieron 4,0 g de l-cistina y 4,0 g de d-l triptófano en 700-800 cc de agua, se calentó a 70-80° C y añadió gota a gota y agitando CaH diluido (20%) hasta obtener una solución clara. Se necesitaron aproximadamente 12 cc de CaH 20 %. Se enfrió y se llevó a 1000 cc. Esta solución también se conserva indefinidamente.

Se usó d-l triptófano sintético pues el l-triptófano puede estar contaminado con ácido nicotínico.

Solución adenina-guanina-uracilo :

Se disolvieron 200 mgr de sulfato de adenina, 200 mgr de clorhidrato de guanina y 200 mgr de uracilo calentando en 10 ml de ClH 90%. Se enfrió y agregó agua destilada hasta un volumen de 200 ml.

Esta solución debió renovarse cada 15 días.

Solución de xantina :

20 mgr de xantina se suspendieron en 30-40 ml de agua destilada, se calentó a 70° C y agregó agitando solución de NH₃ concentrado hasta disolución. Se enfrió y llevó con agua destilada a un volumen de 200 ml.

Esta solución se renovó cada 15 días.

Solución riboflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico :

Se preparó una solución en 100 ml de ácido acético 0,02 N que contenía: 5 mg de riboflavina, 5 mg de clorhidrato de tiamina, 5 mg de ácido nicotínico y 25 microgs. de biotina. Se renovó cada 15 días.

Solución ácido p-aminobenzoico, pantoterato de calcio, piridoxina, ácido fólico:

Se disolvieron en 100 ml de alcohol etílico al 95% neutralizado 0,5 mg de ácido p-aminobenzoico, 0,5 mg de pantoterato de calcio, 10 mg de clorhidrato de piridoxina y 0,25 mg de ácido fólico. Se renovó cada 7 días.

Solución de tween 80 :

20 gr de tween 80 se disolvió en alcohol y se llevó a 200 ml. Esta solución se guardó sin tolueno y se conserva indefinidamente.

Solución de sales A :

10 gr de PO₄H₂ y 10 gr de PO₄H₂K se disolvieron en agua des-

tilada, se agregó 2 gotas de ClH y llevó a 200 ml.

Solución de sales B :

4 g de $SO_4 Mg \cdot 7H_2O$, 0,2 gr de ClNa, 0,2 gr de $SO_4 Fe \cdot 7H_2O$ y 0,2 gr $SO_4 Mn \cdot 4H_2O$ se disolvieron en 200 ml de agua, agregando 2 gotas de ClH.

Con dichas soluciones se preparó el medio basal indicado más arriba, tomando los volúmenes que se indican a continuación para preparar 500 ml de medio.

Solución de ácidos caseamínicos	50 ml
Solución cistina-triptófano	25 ml
Solución adenina, guanina, uracilo	10 ml
Solución mantina	5 ml
Solución riboflavina, biotina, tiamina, ácido nicotínico	20 ml
Solución ácido p-aminobenzoico, pantotemato de calcio, pánicozina, ácido fólico	20 ml
Solución de sales A.	10 ml
Solución de sales B	10 ml
Solución tween 80	10 ml
Dextrosa anhidra	20 gr
Acetato de sodio anhidro	10 gr

Se disolvió la dextrosa y el acetato de sodio en las soluciones previamente mezcladas. Se agregó unos 100 cc de agua y llevó a pH 6,8 con solución de NaOH 1M, se completó luego con agua destilada a un volumen de 500 ml.

e) Preparación del inóculo

Cuando se iniciaron las determinaciones se hicieron previamente 10 pasajes sucesivos del L. leichmannii en el agar usado para mantenerlo.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo stock de no más

de 4 días en heladera. El día anterior a una determinación se hizo un pasaje de dicho cultivo a un tubo con caldo inóculo cuya composición es la misma que la del agar de conservación. Se incubó a 37° C durante unas 20 hs. Al cabo de dicho tiempo se centrifugó a 2,000 R.P.M. durante 10'; decantó el sobrenadante y el residuo se lavó cuatro veces con 10 ml de suero fisiológico estéril, suspendiendo finalmente la masa bacteriana en 100 ml de S.F. estéril.

De esta esta suspensión se usó una gota para inocular los tubos en la determinación.

f) Preparación del standard de vitamina B₁₂

Se partió de una solución de vitamina B₁₂ cristalina de concentración conocida, proporcionada por los laboratorios Squibb & Sons, Argentina. Esta solución se conservó en heladera y su potencia se verificó por ensayo espectrofotométrico utilizando una longitud de onda de 361 m μ y aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{361}}{0,0207} \text{ g microgramos de Vit. B}_{12} / \text{ ml}$$

En el momento de su uso, se preparó a partir de ella una solución que contenía 0,02 milimicrogramos por ml, la cual se empleó en la obtención de la curva standard.

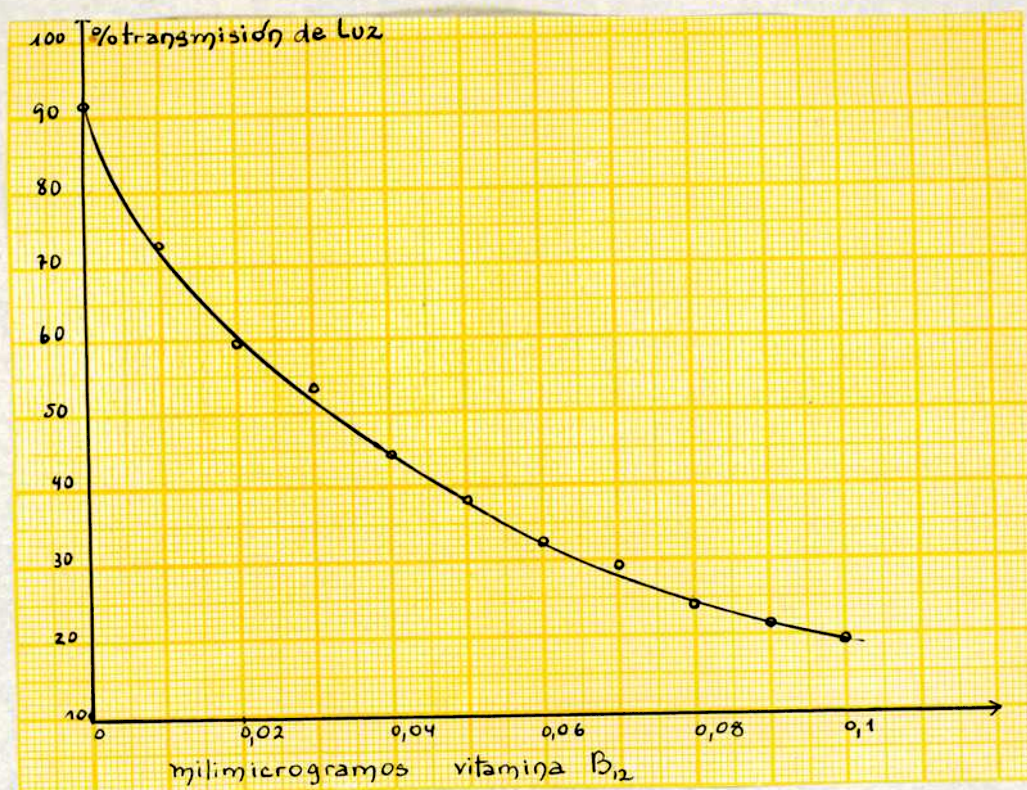
g) Obtención de la curva standard

A series tubos de ensayo se agregaron por triplicado 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 y 5,0 ml respectivamente de la solución standard de cianocobalamina. A continuación se agregó a cada tubo 5 ml de medio basal y se completó con agua destilada hasta 10 ml. Se prepararon además los tubos control conteniendo 5 ml de medio basal y 5 ml de agua destilada. Todos los tubos se taparon con tapas de aluminio y previo agitado de los mismos se esterilizaron en autoclave durante 5 minutos a 121°- 123°, llegándose a esta temperatura en un tiempo no mayor de 10 minutos.

Después de la esterilización los tubos se enfriaron rápidamente para evitar la formación de color debida a un sobrecalentamiento del medio. Una vez fríos y a excepción de los tubos control se inocularon asépticamente con una gota de inóculo, mediante una bureta esterilizada. Se incubaron en estufa a 37° C durante 19-20 hs. Después de la incubación se enfriaron los tubos a temperatura uniforme efectuándose las lecturas turbidimétricas en un Lemetrón usando el filtro N° 650. La turbidez se determinó leyendo directamente el porcentaje de transmisión de luz, previo ajuste del nefelómetro con los controles no inoculados a los que se hace corresponder 100 % de transmisión de luz.

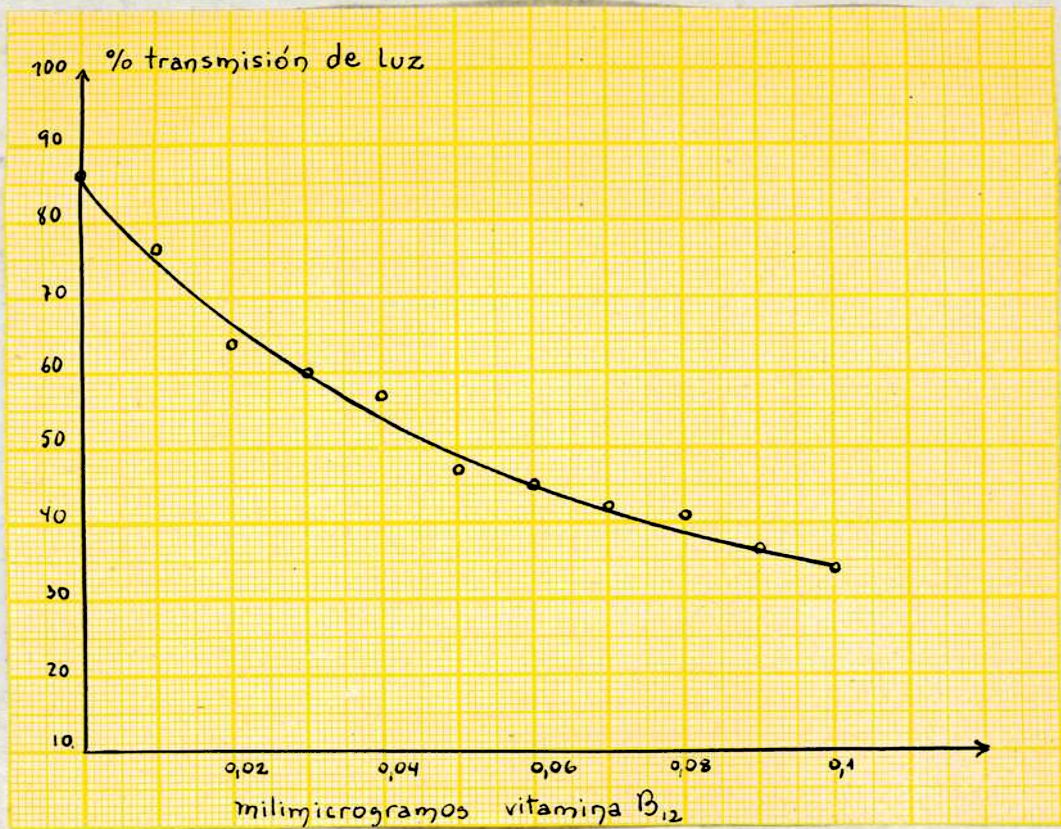
A continuación se indican algunos de los resultados obtenidos.

Determinación de la curva standard



miliµ vit. B ₁₂ por tubo	Transmisión de luz			
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Promedio
0,00	89,4	91,5	93,6	91,5
0,01	74,0	74,3	70,0	72,8
0,02	59,0	56,8	63,4	59,7
0,03	54,3	54,5	51,7	53,5
0,04	41,0	46,3	45,3	44,2
0,05	37,5	37,0	40,2	38,2
0,06	32,0	32,5	33,4	32,6
0,07	28,4	30,0	28,8	29,1
0,08	23,4	25,0	24,0	24,1
0,09	21,6	22,0	20,6	21,4
0,1	19,7	18,6	20,0	19,4

Determinación de la curva standard



milí γ vit. B ₁₂ por tubo	Transmisión de luz			
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Promedio
0,00	87,0	84,8	88,2	86,7
0,01	80,3	79,0	70,8	76,7
0,02	62,8	64,0	64,2	63,7
0,03	59,4	59,5	60,8	59,9
0,04	56,6	55,6	58,8	57,0
0,05	49,5	44,8	47,5	47,3
0,06	46,8	45,0	43,3	45,0
0,07	40,5	43,5	42,7	42,2
0,08	40,7	41,0	41,0	40,9
0,09	36,2	38,3	34,7	36,4
0,1	34,0	33,5	34,5	34,0

h) Muestras examinadas y tratamiento de las mismas

En el cuadro N° 15 figuran las muestras estudiadas con los tiempos de extracción de cada una a partir del momento de la extracción del líquido cloacal crudo. Esto se ha hecho con el objeto de seguir la evolución de un determinado líquido crudo a través de todo el proceso. Por otra parte, para que las muestras fueran lo más representativas posible, cada una es mezcla de otras cinco extraídas horaria y sucesivamente con los intervalos que se indican en el cuadro N° 15.

Cuadro N° 15

Muestras estudiadas y tiempos de extracción

Muestra N°	Tipo de muestra y sitio de extracción	Tiempo de extracción
1	Líquido crudo después de las rejjas	0 hs
2	Líquido decantado en el decantador primario	2,00 hs
3	Líquido de salida del biofiltro	2,05 hs
4	Líquido de salida del decantador secundario	4,00 hs
5	Barro del digester	1 vez por semana
6	Barro seco	

Recibidas las muestras sólidas y semisólidas (barros secos y barros del digester) se homogeneizaron las primeras por molido y las segundas mediante una licuadora. Para la extracción de la vitamina B₁₂ de las mismas se procedió según Hoover y col. (20). Se suspendieron 5 g de la muestra en 100 ml de solución Buffer de pH 8 4,5 que contenía por litro 126 g de ácido acético y 207 g de acetato de sodio. Esta suspensión se calentó durante 30 minutos a 100° C en autoclave abierto. Los extractos obtenidos, una vez filtrados, se guardaron en la heladera hasta el momento de ser usados.

Para evitar la posible interferencia debida a otras sustancias (desoxirribósidos) que pueden estar presentes en los líquidos cloacales, se aprovechó la propiedad de la mayoría de esos compuestos de ser estables en medio alcalino no ocurriendo lo mismo con la vitamina B₁₂. Se procedió entonces en la siguiente forma; una parte alícuota de los extractos se alcalinizó con solución de NaOH hasta una concentración final de 0,2 N y se calentó durante 30 minutos a 100° C. Es posible corregir así, el ensayo directo sobre los extrae-

tos convenientemente diluidos sustrayendo la actividad no específica determinada sobre las muestras alcalinizadas. Generalmente se obtuvieron valores despreciables de esta actividad no específica.

i) Dosaje de la vitamina B₁₂ en las distintas muestras.

Una vez obtenidos los extractos se llevaron a cabo las determinaciones sobre éstos y los líquidos cloacales crudos filtrados y convenientemente diluidos. Para ello se hicieron al comenzar los ensayos varias diluciones de las distintas muestras para probar con cual de ellas se obtenía un crecimiento cuya medida se podía interpedlar en la curva standard.

Se encontró que las diluciones más convenientes eran:

Muestra nº 1	1:10
" " 2	1:10
" " 3	1:10
" " 4	1:10
" " 5	1:500
" " 6	1:500

Solamente las muestras alcalinizadas se neutralizaron antes de ser usadas.

De cada una de las muestras diluidas se agregaron por triplicado volúmenes de 2 cc y 4 cc a tubos de ensayo conteniendo 8 cc de medio basal, completando luego a 10 cc con agua destilada. Se siguió la técnica de esterilización, inoculación e incubación de los tubos como se indicó para la curva standard que se incorporó toda vez que se llevó a cabo una determinación.

j) Determinaciones químicas

Sobre las distintas muestras se practicaron las siguientes determinaciones químicas siguiendo para ello las técnicas oficiales de O.S.M. (84).

- a) Residuo total por evaporación.
- b) Sólidos totales en suspensión.
- c) Sólidos sedimentables en 2 hs.

E - RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION

De acuerdo al objeto del trabajo se determinó vitamina B_{12} en barros cloacales digeridos provenientes de plantas que posee la Administración General de Obras Sanitarias de la Nación. Se comenzó por estudiar su presencia en los barros digeridos secos, conocida la cual, se investigó su distribución en las distintas etapas del proceso de digestión de los líquidos cloacales con el objeto de dilucidar si hay una formación biológica de la vitamina que incrementa la que se incorpora con el líquido cloacal crudo.

Las muestras ensayadas fueron remitidas desde la planta de digestión aerobia de Bazán (Pcia. de Buenos Aires) cuya descripción se realizó en (C - a).

En el cuadro N° 1' figuran los valores de las determinaciones químicas y el caudal medio horario del líquido crudo. En él puede observarse que sólo el 75 % de los sólidos sedimentables del líquido crudo ingresan al digestor. Esto debe tenerse en cuenta pues en lo que sigue se considera que todo el sedimentado pasa al digestor. El error introducido es sin embargo pequeño.

En el cuadro N° 17 figuran los resultados de la determinación de vitamina B_{12} en barros secos digeridos. Es de señalar que estos datos no reflejan con exactitud el contenido inicial de vitamina B_{12} ya que las piletas de secado son abiertas y por lo tanto aquélla está expuesta a la luz, a la cual es sensible y a las lluvias que pueden solubilizar parte de las vitaminas. Por lo tanto, si se quieren utilizar los barros para complemento de la dieta animal, habrá que probar otros métodos más eficaces de secado.

Cuadro Nº 16

Valores de las determinaciones efectuadas en el
líquido crudo y el decantado primario

Determinación	MUESTRA	
	1	2
Residuo total por evaporación mg/l	830 ⁺²⁶	827 ^{+57,6}
Sólidos totales en suspensión mg/l	127 ^{+19,7}	117 ^{+41,8}
Sólidos sedimenta- bles en 2 horas mg/l	82,0 ^{+10,4}	81,9 ^{+5,75}
Sólidos sedimenta- bles en 2 horas ml/l	5,4 ^{+0,86}	0,67 ^{+0,1}
Caudal horario medio m ³ /h	120 ^{+20,4}	-

Cuadro N° 17

Contenido de vitamina B₁₂ en distintas muestras de barro digeridos secos

Muestra n°	Vitamina B ₁₂ mg/Kg de barro seco	Humedad g %
1	0,64	52,1
2	0,49	54,7
3	0,26	56,2
4	0,20	57,3
5	0,40	47,1
6	0,42	61,0
7	0,33	40,3
8	0,23	31,0
9	0,14	60,8
10	0,11	43,17

El contenido de vitamina B₁₂ en las distintas etapas del proceso de depuración se indica en el cuadro N° 18. En él se puede observar que el valor encontrado para las distintas muestras es prácticamente constante, lo que se indicaría que la cantidad de vitamina B₁₂ que pasa con los sólidos sedimentables en 2 hs es casi nula. Sin embargo, aún poniéndonos en el caso más extremo, el barro del digestor no contendría más vitamina B₁₂ por m³ que la que existe en el líquido cloacal tratado. Pero por lo que podemos ver en el cuadro N° 19 la cantidad promedio encontrada supera en mucho a la presente en el líquido crudo. La diferencia es de 33,74 mg/m³ o sea mucho mayor que 3 desviaciones standard.

Esto se explicaría sólo admitiendo una formación biológica de la vitamina durante el proceso de la digestión.

Cuadro N° 18

Variación en el contenido de vitamina B₁₂ a través de las distintas etapas del proceso de depuración de los líquidos cloacales

M u e s t r a N°			
1	2	3	4
Vitamina B ₁₂ γ/m^3			
160	240	200	220
130	140	160	90
260	340	280	300
210	130	250	200
150	140	310	260
250	220	210	260
230	270	250	230
270	280	300	190
470	330	310	390
440	580	420	420
260 \pm 1,15	270 \pm 1,34	270 \pm 0,56	260 \pm 0,97

Cuadro N° 19

Concentración de vitamina B₁₂ en el barro del digestor

Vitamina B ₁₂ mg/m ³	Vitamina B ₁₂ mg/kg de barro	Vitamina B ₁₂ mg/kg de barro seco
14,8	14,88	3,66
50,8	61,50	4,32
64,3	64,80	4,02
45,0	40,70	0,30
47,0	45,20	0,37
77,5	77,60	0,58
65,8	70,50	0,82
28,0	28,10	0,80
28,5	53,80	0,63
31,5	31,20	0,52
22,7	25,00	0,22
3,5	3,50	0,52
8,5	3,60	0,92
34,8 ± 6,88	49,0 ± 22,1	1,04 ± 0,44

Hay que hacer notar que los datos un tanto dispares del cuadro N° 19 se deben a que en la última parte de este trabajo la planta comenzó a funcionar mal, debido al aporte de derivados del petróleo traídos por el líquido crudo de la zona del aeropuerto internacional. Esto debe haber influido en el proceso biológico y en realidad fue así pues se comprobó una disminución de la vitamina en el digestor. Por otra parte este proceso no se realiza en las mejores condiciones pues una digestión eficaz requiere una temperatura controlada de unos 30° y como ya se ha señalado, en la planta en estudio no se regula la

temperatura de la digestión.

Se llevaron a cabo también algunas determinaciones sobre muestras provenientes de una planta de depuración de líquidos cloacales de Córdoba.

Estas no pudieron continuarse pues la planta de digestión de barros dejó de funcionar. Los datos obtenidos que figuran en el cuadro N° 20 muestran la gran diferencia del contenido de vitamina B₁₂ en el barro crudo y en el barro digerido.

Esta diferencia indica que un 80 % de la vitamina B₁₂ presente en el barro digerido y calculada sobre residuo seco se formaría en la etapa misma de la digestión.

Cuadro N° 20

Concentración de vitamina B₁₂ en muestras de la planta de depuración de Córdoba

Muestra	Vitamina B ₁₂ γ / l	Vitamina B ₁₂ ng/kg	Humedad g %
Líquido crudo	0,51 0,41	—	—
Barro que entra al digestor	19,1 16,4	0,17 0,14	98,5 98
Barro del di- gestor	66,3 70,5	0,78 0,83	91,5 89

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto la técnica de determinación microbiológica de vitamina B₁₂ empleando el L. leichmannii ATCC, 4797

Mediante esa técnica se ha determinado dicha vitamina en barros activados secos de distinto origen encontrándose valores comprendidos entre 0,11 a 0,54 mg/Kg de barro seco.

Se ha tratado de aclarar el origen de dicho principio estudiando su evolución a través de las distintas etapas de digestión de una planta sita en la localidad de Basima (Pcia. de Buenos Aires).

Se menciona el caudal diario medio de líquido crudo tratado y valores químicos determinados en algunas de las etapas del proceso.

Figuran datos del contenido de vitamina B₁₂ en los distintos líquidos de la planta y de ellos surge mediante cierta hipótesis que durante el proceso de digestión se produce vitamina B₁₂.

Se han incluido datos parciales del contenido de vitamina B₁₂ en algunas etapas del proceso de digestión anaerobia de un digestor de la ciudad de Córdoba de los cuales surge que dicha vitamina se produce durante el proceso de digestión.

G) BIBLIOGRAFIA

- 1) G.R. Minot y W.P. Murphy - J. Amer. Med. Ass. 87, 470 (1926)
- 2) M.S. Shorb - J. Biol. Chem. 169, 455 (1947)
- 3) E.L. Rickes, N.G. Brink, E.R. Koninsky, T.R. Wood y K. Folkers - Science 107, 398 (1948)
- 4) E.L. Rickes, N.G. Brink, E.R. Koninsky, T.R. Wood y K. Folkers - Science 108, 634 (1948)
- 5) E.L. Smith - Nature 161, 638 (1948)
- 6) E.L. Smith - Nature 162, 144 (1948)
- 7) E.L. Smith - J. Pharm. Pharmacol. 1, 500 (1949)
- 8) N.G. Brink, D.E. Wolf, E. Kaeska, E.L. Rickes, F.R. Koninsky, T.R. Wood y K. Folkers - J. Amer. Chem. Soc. - 71, 1864 (1949)
- 9) G.H. Beaven, E.R. Holiday, E.A. Johnson, B. Ellis y V. Petrov - J. Pharm. Pharmacol. 2, 944 (1950)
- 10) G.H. Beaven, E.R. Holiday, E.A. Johnson, P. Manalis, E. Petrov y B. Sturgeon - J. Pharm. Pharmacol. 1, 957 (1949)
- 11) J.B. Armitage, J.R. Cannon, A.W. Johnson, L.J.F. Parker, E. Lester Smith, W.H. Stafford y A.R. Todd - J. Chem. Soc., 3949 (1953)
- 12) B. Ellis, V. Petrov y G.F. Snook - J. Pharm. Pharmacol. 1, 60 (1949)
- 13) B. Ellis, V. Petrov y G.F. Snook - J. Pharm. Pharmacol. 1, 950 (1949)
- 14) B. Ellis, V. Petrov y G.F. Snook - J. Pharm. Pharmacol. 1, 887 (1949)
- 15) J.R. Cannon, A.W. Johnson, A.R. Todd - Nature, Lond. 174, 1168 (1954)
- 16) C. Brink, D.C. Hodgkin, J. Lindsay, H. Pickworth, J.H. Robertson y J.G. White - Nature Lond. 174, 1169 (1954)
- 17) D.C. Hodgkin, J. Pickworth, J.H. Robertson, K.H. Trusbleed, R.J. Prosen, J.G. White - Nature Lond. 175, 325 (1955)
- 18) F.A. Kuhl, C.B. Shank y K. Folkers - J. Amer. Chem. Soc. 77, 251, (1955)
- 19) R. Bonnet, J.R. Cannon, A.W. Johnson, I. Sutherland, A.H. Todd, E. Lester Smith - Nature Lond. 176, 398 (1955)
- 20) U.S.P. Ed. XIII - Suplemento 2, (1950)
- 21) F. Harley, P. Stross, R.E. Stuckey - J. Pharm. Pharmacol. 2, 648 (1950)

- 22) T.J. Macek, B.A. Feller - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 41, 233 (1952)
- 23) E.A. Kaszka, D.K. Wolf y K. Folkers - J. Am. Chem. Soc. 71, 1514 (1949)
- 24) H.B. Woodruff y J. C. Foster - J. Biol. Chem. 183, 599 (1950)
- 25) J.V. Pierce, A.C. Page, E.L.R. Stockstad, T.H. Jukes - J. Am. Chem. Soc. 71, 2952 (1949)
- 26) E.L. R. Stockstad, T.H. Jukes, J. Pierce, A.C. Page y A.L. Franklin - J. Biol. Chem. 150, 647 (1949)
- 27) J.A. Brockman, J.V. Pierce, E.L.R. Stockstad, H.P. Broquist y T. H. Jukes - J. Amer. Chem. Soc. 72, 1042 (1950)
- 28) H.G. Brink, F.A. Kuhl y K. Folkers - Science 112, 354 (1950)
- 29) B. Ellis, V. Petrov, G. H. Beaven, E. R. Holiday, E.A. Johnson - J. Pharm. Pharmacol. 2, 735 (1950)
- 30) W.K. Anslow, S. Ball, W.B. Emery, K.H. Fantes, E.L. Smith y A.D. Walker - Chemistry & Industry 92, 574 (1950)
- 31) E. Lester Smith, S. Ball y D. M. Ireland - Bioch. J. 52, 395 (1952)
- 32) E.A. Kaszka, D.K. Wolf, F.A. Kuhl y K. Folkers - J. Am. Chem. Soc. 73, 3669 (1951)
- 33) F.B. Brown, J.C. Cain, D.M. Gant, L.F.J. Parker y E.L. Smith - Biochem. J. 59, 82 (1955)
- 34) S. K. Ken - Biochem. Soc. Symposia 13, 23, (1955)
- 35) J.E. Ford, S. K. Ken y J. W. G. Porter - Biochem. J. 50, IX, (1951)
- 36) J.E. Ford y J. W. G. Porter - Biochem. J. 51, V, (1952)
- 37) J.E. Ford, S.K. Ken y J.W.G. Porter - Biochem. J. 52, VIII (1952)
- 38) D.E. Gant, E.L. Smith y L.F.J. Parker - Biochem. J. 53, XXXIV (1954)
- 39) J.E. Ford, E.S. Holdsworth, S.K. Ken y J.W.G. Porter - Nature Lond. 171, 148 (1953)
- 40) H.W. Dion, D.G. Calkins y J.J. Pfiffner - J. Amer. Chem. Soc. 76, 948 (1954)
- 41) F.B. Brown, E.L. Smith - Biochem. J. 53 XXXIV (1954)
- 42) J.E. Ford y E.S. Holdsworth - Bioch. J. 56, XXV (1954)
- 43) Max H. Marsh y H. Kuzel - Anal. Chem. 33, 1773 (1961)
- 44) F. Hartley - J. Pharm. Pharmacol. 1, 710 (1949)
- 45) G.E. Bener y I.C. Rickards - Arch. Biochem. Biophys. 29, 75 (1950)

- 46) G.E. Boner y I.C. Richards - Arch. Biochem. Biophys. 30, 372-82-82 (1951)
- 47) F. Bacher, A. Boley, C. Shank - Analyt. Chem. 36, 1146 (1954)
- 48) C. Resenblum, D.T. Woodbury - J. Am. Pharm. Assoc. 41, 363 (1952)
- 49) M.E. Coates, G.F. Harrison y S.K. Ken - Analyst 76, 148 (1951)
- 50) W. F.J. Cuthbertson y D.M. Thornton - Brit. J. Nutr. 6, 170 (1952)
- 51) D.K. Bonshardt, W.J. Paul, K. O'Doherty, J.W. Huff y R.H. Barnes - J. Nutrit. 37, 21 (1949)
- 52) C.A. Denton, R.J. Lillie y J.R. Sigmon - Proc. 14th World's Poultry Congress, Edinburgh 152, (1954)
- 53) M.S. Shorb y G.M. Briggs - J. Biol. Chem. 178, 1463 (1948)
- 54) R.D. Greene, A.J. Brock y R.B. Mc. Connack - J. Biol. Chem. 178, 909 (1949)
- 55) H.C. Caswell, L. K. Keditzschek y D. Handlin - J. Biol. Chem. 180, 128 (1949)
- 56) J.C. Foster, J.A. Lally y H.B. Woodruff - Science 110, 507 (1949)
- 57) E. Kitay, W.S. Mc Nutt, E.E. Snell - J. Biol. Chem. 177, 993 (1949)
- 58) C.K. Hoffmann, E.L.R. Stokstad, B.L. Hutchings, A.C. Dornbush y T.H. Jukes - J. Biol. Chem. 181, 636 (1949)
- 59) H. Jacowitz, L.C. Morris y G.F. Heuser - Proc. Sec. Exptl. Biol. Med. 71, 372 (1949)
- 60) M.H. Sears y D. Handlin - J. Bact. 62, 15 (1951)
- 61) J.K. Ford - Brit. J. Nutr. 7, 299 (1953)
- 62) H.R. Skeggs, H.M. Nopple, K.A. Valentik, J.W. Huff, L.D. Wright - J. Biol. Chem. 182, 211 (1950)
- 63) B.F. Capps, H. L. Hobbs, S.H. Fox - J. Biol. Chem. 178, 517 (1949)
- 64) W.A. Winstein, E. Eigen - J. Biol. Chem. 181, 109 (1949)
- 65) U.S.P. Ed. XIV - suplemento 3
- 66) B.L. Davis y E. S. Mingoli - J. Bact. 60, 17 (1950)
- 67) J.M. Mc Laughlan, J.A. Clark, J.A. Campbell - Arch. Biochem. and Biophys. 46, 244 (1953)
- 68) J.S. Chiao, W.H. Peterson - Appl. Microbiology 1, 42 (1953)
- 69) S. Lambin, A. German, J. Brigeau - Compt. rend. soc. biol. 148, 1017 (1954)

FOTBA

- 70) F.J. Bandelin y V. Tuschoff - J. Am. Phara. Assoc. 43, 474 (1954)
- 71) W. Shive - N.Y. Acad. Sci. Symposium on autinotabolites (1949)
- 72) P.R. Burkholder - Science 114, 459 (1951)
- 73) S.H. Hutner, L. Proraso, E.L. R. Stokstad, C.L. Hoffmann, M. Belt, A.L. Franklin y T.H. Jukes - Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 70, 118 (1949)
- 74) G.I. H. Ross - Nature Lond. 166, 270 (1950)
- 75) G.I. H. Ross - J. Clin. Path. 5, 250 (1952)
- 76) S.H. Hutner, L. Proraso y J. Filfus - Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 252 (1953)
- 77) F.W. Barber, D.L. Baile, C.B. Troesch, C.H. Huhtanen - Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 363 (1953)
- 78) H.L. Coates y J.B. Ford - Biochem. Soc. Sym. 13, 40 (1955)
- 79) S.R. Hoover, L.B. Jasewicz, N. Porges - Science 114, 213 (1951)
- 80) S.R. Hoover, L.B. Jasewicz, J.B. Pepinsky, N. Porges - Sewage and Industrial wastes 24, 30, 44 (1952)
- 81) A.G.M. Sjöström, H. Y. Neujahr, H. Lundin - Acta Chirica Scandinavica 7, 1036 (1953)
- 82) O.S. Miner y B. Wolnak - U.S. Pat. 2,646,586 julio 21 de 1953
- 83) H.W. Loy - J.F. Haggerty y O.L. Kline - Arch. Biochem. 27, 451 (1950)
- 84) U.S.A. - Dirección de Laboratorios - Método para el examen de las aguas y los líquidos cloacales.

Fernand

R. M. de Ledesma