

Tesis de Posgrado

Comparación del punto del balance material de la glucosa de cepas de comportamiento intermedio con *Escherichia Coli* y *Aerobacter Aerogenes*

De la Serna, Carlos Santiago

1934

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:

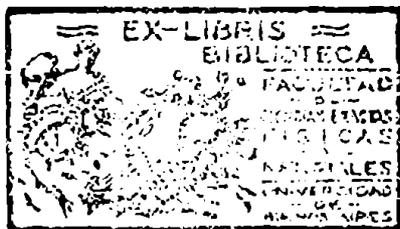
De la Serna, Carlos Santiago. (1934). Comparación del punto del balance material de la glucosa de cepas de comportamiento intermedio con *Escherichia Coli* y *Aerobacter Aerogenes*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0181_DelaSerna.pdf

Cita tipo Chicago:

De la Serna, Carlos Santiago. "Comparación del punto del balance material de la glucosa de cepas de comportamiento intermedio con *Escherichia Coli* y *Aerobacter Aerogenes*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1934.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0181_DelaSerna.pdf



Hoosis 181



I) INTRODUCCION.-FINALIDAD DEL TRABAJO.-

Me ha guiado ,para efectuar mi tesis sobre este tema, el propósito de iniciar, en esta Facultad, los estudios sobre el metabolismo de hidratos de carbono de las bacterias, y, contribuir con un pequeño aporte personal, al conocimiento del intercam bio hidrocarbonado de gérmenes de ubicación sistemática, no establecida aún.

Para poder desarrollar mi trabajo he contado, ante todo, con el oportuno consejo del Prof. Dr. Sordelli, y con la información traída de su viaje a Delft por el Ing. Santos Soriano. Cumple con un deber al citar aquí a mi condiscípula Srta. Delia Rosa Cánepa, pues estando ella trabajando en su Tesis sobre "Metabolismo de la glucosa de algunos miembros del género Aerobacter", hemos efectuado juntos la pesada tarea de búsqueda y ensayo de los métodos analíticos.

Respecto a las cepas intermedias del grupo coli-aerógenas, diré que, en el trabajo en que S. A. Koser hace un estudio de la correlación entre el desarrollo en el medio con citrato que lleva su nombre, y las características diferenciales de las cepas del grupo coli-aerógenas y el habitat, encuentra, que, en general, hay co correspondencia entre el desarrollo en el medio con citrato y las reacciones de Voges Proskauer y del rojo de metilo; es decir, los gérmenes aerobios que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, que son bastoncitos cortos no esporulados Gram negativos y que resultan V.P + M.R.- utilizan el radical citrato como única fuente

M.R.+ significa que en el medio glucosa, el germen produce a los 3 o 4 días un pH 7.2 (4.50 menos) que enrojece al rojo de metilo.
M.R.- el pH es tal que dicho indicador permanece amarillo

de carbono, luego son Koser + , en cambio, los que son V P - M R + no desarrollan en el medio de Koser. Pero, dicho autor, encontró algunas cepas de comportamiento anómalo tal como una cepa aislada de heces de conejo, que tenía propiedades similares al Aerobacter aerógenes y desarrollaba en citrato pero daba las reacciones M R y V P como el coli; esa cepa varió gradualmente hasta dar M R - V P + . En conclusión A. S. Koser se manifiesta de acuerdo con la sugestión que se encuentra en varias publicaciones de ese año (1924) de que algunos de los organismos M R (+) del grupo coli-aerógenes encontrados en el suelo y en el agua , puedan diferir de los gérmenes de tipo fecal M R (+) , V P (-) .

En 1928 Braak estudió la fermentación de la glicerina por organismos del grupo coli-aerógenes y consiguió aislar de agua de canal, un organismo que llamó Bacterium freundii que producía, al fermentar la glicerina, considerables cantidades de trimetileno glicol, substancia que el coli no produce. A ese organismo, dicho autor lo ubicó, entre los coli aerógenes.

En un estudio, que, en 1931, hacen Ruchhoft, Kallas, Chin y Coulter, sobre la diferenciación de coli aerógenes en los análisis de aguas, consideraron gran número de colonias de este grupo, encontrando, (al tener en cuenta las reacciones siguientes: Indol, Roje de metilo, Voges y Koser) un elevado porcentaje de gérmenes no típicos, es decir, que no eran ni coli ni aerógenes. Agregan que después de haber purificado las colonias, el número de coli típicos y de aerobacter típicos aumentó, debiendo atribuirse entonces, muchas de las irregularidades observadas a que las colonias

no eran puras. Pero comprobaron la existencia de gérmenes del grupo que (indicando las cuatro reacciones en el orden en que fueron citadas más arriba) son + + - + , otros - + - + , también + - - + y por último + + + + ; a los de los dos primeros grupos los llaman intermedios y a los de los otros atípicos.

En el año 1933, R. L. France manifiesta haber encontrado, especialmente en cepas aisladas de aguas (y pocas veces de heces), gérmenes en los cuales no concuerda el ensayo con citrato con las reacciones de V P y M R. Con anterioridad a esto, en 1932, C. H. Berkman y G. F. Guillen continuando el trabajo de Braak, buscaron, en heces de diversos animales y en suelos, gérmenes capaces de producir trimetilene glicol a partir de la glicerina, empleando un medio de enriquecimiento con glicerina. Comprobaron que los típicos Escherichia coli y Aerobacter aerógenos , no producen trimetilene glicol. Llegaron a la conclusión de que los productores de ese glicol eran gérmenes M R + V P - que no utilizan ácido úrico, pero sí citrato, es decir, eran intermedios. Los autores presentan entonces el interrogante de si dichos gérmenes deben considerarse como Escherichia o como Aerobacter, o si deberán ser agrupados aparte. Teniendo en cuenta que, empleando los métodos de diagnóstico de Escherichia y de Aerobacter, estos gérmenes resultan no pertenecer ni a uno ni a otro género por tener un comportamiento intermedio, propone darle el rango de género de la familia Bacteriaceae, a la par de Escherichia y Aerobacter. - A los gérmenes de este género los diagnostican así:

Bastones cortos de extremos redondeados, metil-red

positivos o intermedios ,Gram negativos.--No producen acetil metil carbinol de la glicerina y raramente,y solo en trazas de la glucosa;utilizan el radical citrato;reducen nitratos a nitritos;atacan,con producción de ácido y gas,a muchos hidratos de carbono,alcoholes y glucósidos ;utilizan como fuente de nitrógeno a las sales de amonio.Especie tipo:la especie tipo es Citrobacter freundii (Braak).

DETERMINACION DE LOS CARACTERES DE SIGNIFICACION SISTEMATICA/-

He efectuado, ante todo, para determinar cual de las cepas que me fueron entregadas era interesante para el estudio que me había propuesto, las reacciones del rojo de metilo y Voges Proskauer y ensayado el desarrollo en el medio de Koser. Después de ese ensayo quedaron a considerar dos cepas que resultaron V. P. - R. M. + y que desarrollaban en el medio de Koser. A continuación ensayé la producción de ácido y gas en glucosa para determinar si había entre ambas una diferencia de velocidad en ese sentido resultando que la que estaba identificada con el número 86 tenía una acción más rápida por lo que me decidí a considerarla en primer término para tener certeza de que no había asociación de gérmenes efectué una serie de aislamientos sucesivos de colonias comprobando después de ello que la cepa considerada conservaba sus propiedades.

Los gérmenes a estudiar son móviles y no producen indol.

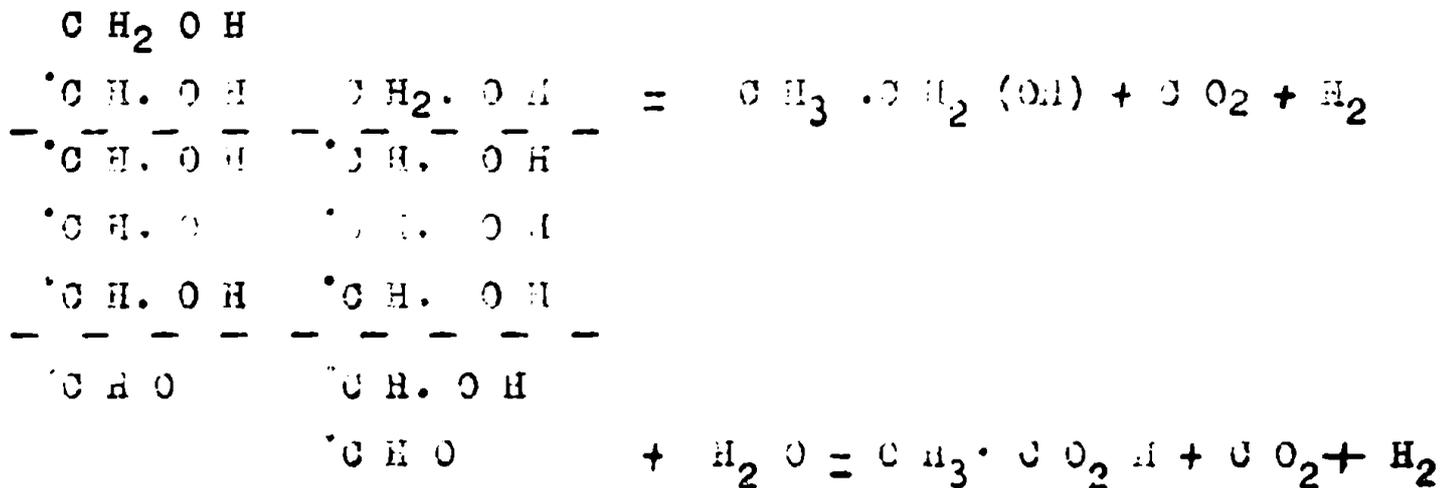
RESEÑA DE LOS ESTUDIOS DE METABOLISMO DE LA GLUCOSA DE BACTERIAS DEL GRUPO COLI-AEROGENES.

Entre los autores que se han ocupado de este asunto, citaré en primer lugar, al investigador inglés A. Harden, que en 1901 presentó un trabajo sobre metabolismo de los hidratos de carbono de gérmenes del grupo coli. Ensayó varios medios, encontrando que, entre ellos, el más conveniente era el agua de peptona. Cita, como producto de la fermentación de la glucosa a las siguientes : ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, alcohol etílico, ácido fórmico, anhídrido carbónico e hidrógeno; de ellas hizo determinaciones cuantitativas. Encontró, considerando las cantidades relativas de las diversas substancias, amplias variaciones aun al trabajar con el mismo germen en condiciones aparentemente iguales. En cuanto a la relación: volúmen de hidrógeno a volúmen de anhídrido carbónico, dice que no resultó exactamente igual a uno, pero que no se aparta mucho de esa cifra; aquí diré que, en los resultados que presenta, esa relación varía entre 1,03 y 1,3.

Harden hace notar que las proporciones en que aparecen los productos de fermentación indican que de los 6 átomos grammo de carbono en un mol de glucosa, de 2 a 3 aparecen como ácido láctico, 1 como alcohol etílico, 1 como ácido acético y menos de 1, pero nunca de $\frac{1}{2}$, como anhídrido carbónico; esos resultados lo inducen a suponer que la ecuación que representa la transformación es:

$$2 C_6 H_{12} O_6 + H_2 O = 2 C_3 H_6 O_3 + C_2 H_4 O_2 + C_2 H_6 O + 2 C O_2 + 2 H_2$$
 que, sin embargo, no coincide con lo obtenido experimentalmente por lo que supone que, además, tiene lugar un proceso secundario. La interpretación de Harden

es la siguiente:

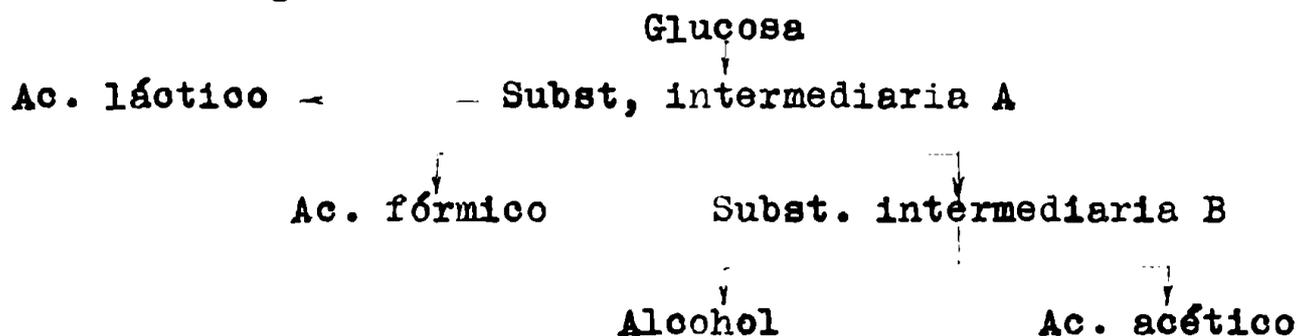


e indica que esos grupos °C H (OH) °C H (OH) °C H (OH) ° que quedan podrían, por una óxido reducción inter o intra-molecular, transformarse en ácido láctico pero también podrían originar otros compuestos, principalmente alcohol etílico, ácido acético, hidrógeno y ácido succínico, lo cual explicaría aquellos casos en que nota una disminución del ácido láctico y un aumento correspondiente de alcohol y ácido acético.

Un progreso en estos conocimientos se debe a E. O. Grey que efectuó entre los años 1914 y 1928 un estudio de las enzimas del Bacillus coli communis comparando la acción sobre manita y glucosa de cepas normales y de otras que, por cultivo en agar con cloroacetato de sodio habían sufrido una modificación tal que daban ácido, pero no gas, en glucosa. Empleaba como medio de cultivo agua con sulfato de potasio y creta; efectuaba dosages de los productos de la fermentación.

En las primeras experiencias sembraba los gérmenes, en las siguientes agregaba al medio de cultivo una emulsión de ellos obtenida precipitándolos con sulfato de potasio, hacía, además, variar la concentración de esta sal en el medio con lo que obtuvo cambios en las cantidades relativas de los

productos de transformación, también dosificaba los productos en distintos momentos de una misma fermentación. La consideración de las relaciones entre los pesos de las diversas sustancias, en las variadas condiciones experimentales, lo llevó primero a presentar el presente cuadro de la fermentación de la glucosa



El autor dice que la sustancia intermediaria A está probablemente relacionada con la aldehida pirúvica y que la sustancia intermediaria B es acetaldehida; agrega que el ácido fórmico en parte se descompone dando anhídrido carbónico e hidrógeno. Más adelante, por las relaciones que encuentra entre las cantidades de alcohol, ácido acético y ácido succínico, dice que las tres se deben originar de una misma sustancia intermediaria que es la acetaldehida.

A J. Kluyver dice que lo que Grey no ha explicado satisfactoriamente es el origen del ácido succínico.

El investigador holandés nombrado considera como posibles orígenes de esa última sustancia la condensación de dos moléculas de dos átomos de carbono y la división de una molécula de glucosa en una parte en cuatro carbonos y otra de dos. Destaca el hecho de que, en el primer caso, sería de esperar la formación de una cantidad equivalente de una sustancia de un átomo de carbono, tal como anhídrido carbónico o ácido fórmico, que se debe formar al dividirse las

Cuadro II

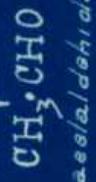
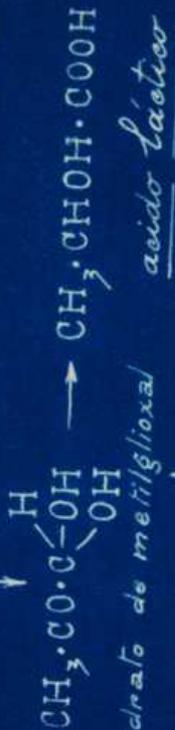
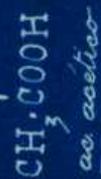
Esquema de la fermentación de la glucosa por el *B. coli*.



0



(El mecanismo interno de esta conversión es el indicado en el cuadro I.)



Proceso B

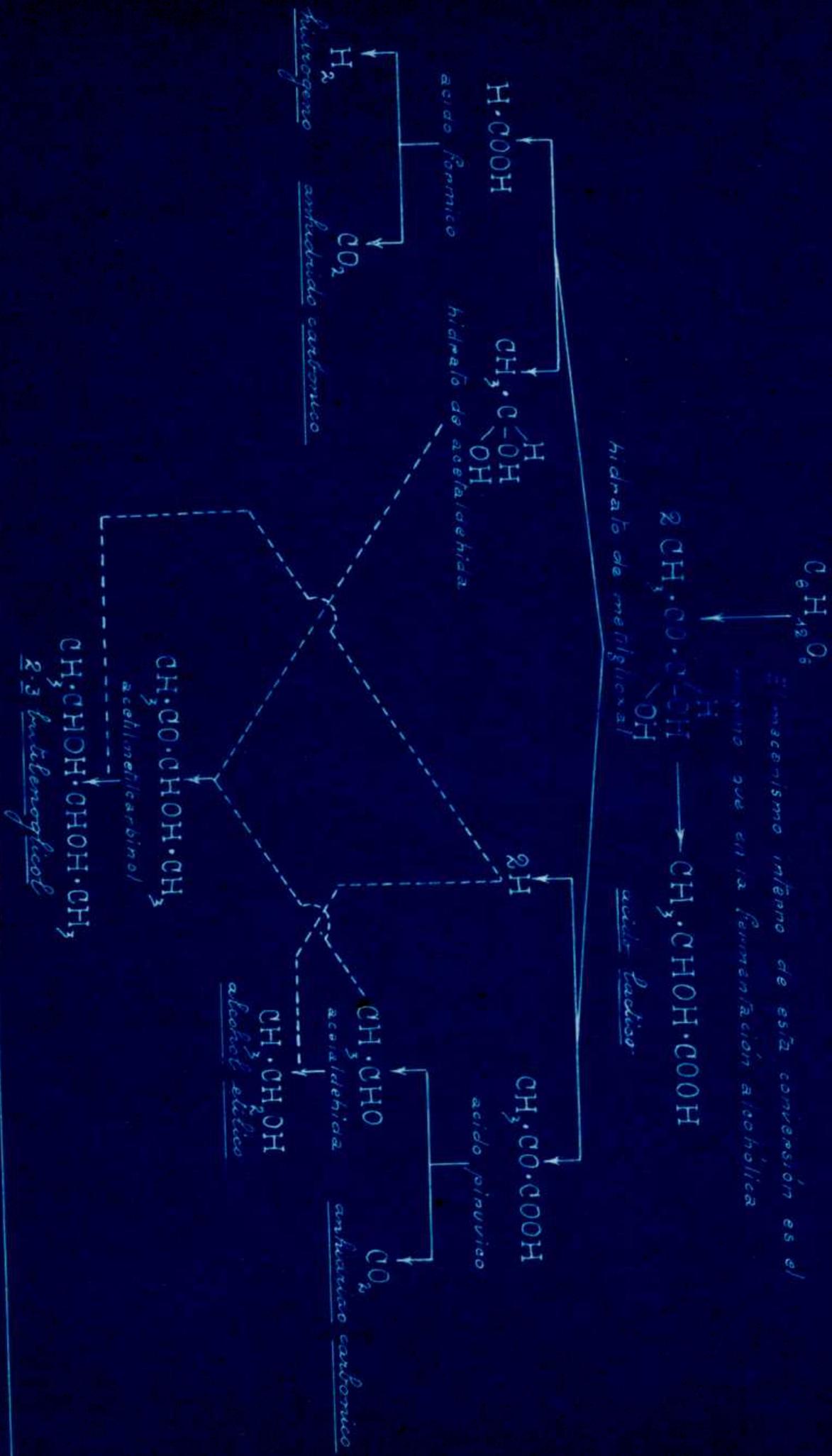
Proceso A

moléculas de tres carbonos, e indica que hay la posibilidad de probar ambas hipótesis haciendo el balance de la fermentación, lo que fué llevado a cabo por su discípulo Scheffer.

El mecanismo de la desmólisis en las fermentaciones fué detallado por Kluyver y Struick, al tratar de la fermentación de la glucosa por la levadura, en la forma que se puede ver en el cuadro I. Dicho proceso tiene lugar, según resulta de los trabajos efectuados en Delft, en todos los casos de fermentación de glucosa por las bacterias. El cuadro II es la representación que hace Kluyver del metabolismo de la glucosa del Bacterium coli. Venos que se ha decidido, al tratar el problema del origen del ácido succínico, por la división de las moléculas de glucosa en una molécula de cuatro carbonos y otra de dos. En esta decisión ha influido fundamentalmente el resultado de los balances de fermentación; en efecto, el balance cierra cuanto se considera que cada molécula de ácido succínico, que aparece entre los productos de desasimilación, representa a una molécula de glucosa que ha sufrido una transformación independiente del proceso en que se originan ácido láctico, ácido fórmico y anhídrido carbónico, no cerrando en cambio, si se supone que el ácido succínico es el resultado de la unión de dos moléculas de acetaldehida. Según Kluyver las moléculas de glucosa que se transforman en ácido succínico no han sufrido la fosforación. Esta teoría está en abierta contradicción con la generalmente admitida de que el único proceso por el cual puede fraccionarse la molécula de glucosa es la desmólisis.

En cuanto a las bacterias pertenecientes al grupo del Aerobacter aerógenes que son, como hemos visto, las otras

Esquema de la fermentacion de la glucosa por el *Streptococcus aerogenes*



intimamente relacionadas con los gérmenes que son objeto de éste estudio, diré que su metabolismo de la glucosa es más complicado. En efecto, Harden, en 1906, descubrió un nuevo producto de esta fermentación: el 2-3 butilene glicol; más tarde Harden y Norris comprobaron que dicha sustancia se originaba por hidrogenación del acetyl methyl carbinol, el cual, a su vez, resultaba de la condensación de la acetaldéhid. La interpretación que hizo Kluver de dicha fermentación que fué confirmada por los satisfactorios resultados de numerosos balances efectuados por Scheffer, es la que está representada en el cuadro III.

Como resultado de la consideración de la fermentación de la glucosa por distintas especies, Kluver llega a la conclusión de que en la utilización de la glucosa en forma anaerobia por las bacterias del grupo coli-aerógenes tienen lugar tres procesos diferentes: primero, la fermentación del azúcar no fosforada que dá ácido succínico; segundo, una verdadera fermentación alcohólica; tercero, la fermentación que dá acetaldéhid y ácido fórmico transformándose a su vez en este, en parte, en anhídrido carbónico e hidrógeno. El autor nombrado dice que de acuerdo a la especie considerada predomina uno u otro de esos procesos habiendo, además, como en el caso del Aerobacter aerógenes, reacciones secundarias entre sustancias que aparecen en dos de las transformaciones primarias.

Veamos ahora como se hace un balance de fermentación; para ello consideremos la fermentación de la glucosa por el Bacterium coli. Detallándolo por partes tenemos:

a) Balance del anhídrido carbónico.— De la obser-

vación de la representación de Kluver (cuadro II) resulta que de 50 moles de glucosa fermentada se deberían formar, si todo el proceso se desarrollara en un solo sentido y todos los productos intermedios se transformaran, 100 moles de anhídrido carbónico; esta cantidad aparece disminuida en un mol por cada uno de ácido fórmico que queda inalterado y en otro por cada uno de ácido láctico que aparece; además hay que recordar que cada molécula de ac. succínico que se encuentra representa a una molécula de glucosa que no siguió el proceso que lleva a anhídrido carbónico y, por lo tanto, reemplaza a dos moléculas de anhídrido carbónico. De lo dicho resulta que si la interpretación dada es fiel reflejo de lo que ocurre se debe verificar que : para 50 moles de glucosa fermentada (moles de anhídrido carbónico + moles de ácido fórmico + moles de ácido láctico + 2 veces moles de ácido succínico) = 100

b) Balace del hidrógeno..- En cuanto al hidrógeno diré que, resultando una molécula de hidrógeno por cada una de anhídrido carbónico que se produce y no habiendo ningún otro proceso que lo origine ni lo consume, también para esta substancia se deberá cumplir la relación:

moles de hidrógeno + moles de ácido fórmico + moles de ácido láctico + 2 veces moles de ácido succínico = 100

c) Balace de la acetaldehído..- Si solo tuviera lugar uno de los procesos de la desasimilación de la glucosa, el proceso A, de 50 moléculas de glucosa se originarían 100 moléculas de hidrato de metilglicoxal, cada una de las cuales puede dar o uno de ácido láctico o uno de acetalde-

hida. Suponiendo que la transformación se detiene ahí, la suma de moléculas de aldehído más las moléculas de ácido láctico debe ser 100, teniendo en cuenta que también tiene lugar el proceso β , según el cual de una molécula de glucosa se origina una de acetaldehído y una de ácido succínico, y considerando aquí también que la transformación no sigue, debemos tener que de 50 moléculas de glucosa se forman a moléculas de ac. láctico b moléculas de acetaldehído y c moléculas de ac. succínico siendo $a + b + c = 100$ pero las bacterias utilizan la aldehído original por cada dos moléculas una de alcohol y una de ácido acético. De todo lo anterior resulta que, para 50 moles de glucosa metabolizada debe comprobarse, de estar bien la interpretación Chuyver, que:

$$[\text{moles de ac. láctico} + \text{moles de ac. succínico} + \text{moles de ácido acético} + \text{moles de alcohol}] = 100 \quad .$$

En los capítulos siguientes detallo el dispositivo empleado y los métodos seguidos para efectuar el balance de fermentación de la glucosa.

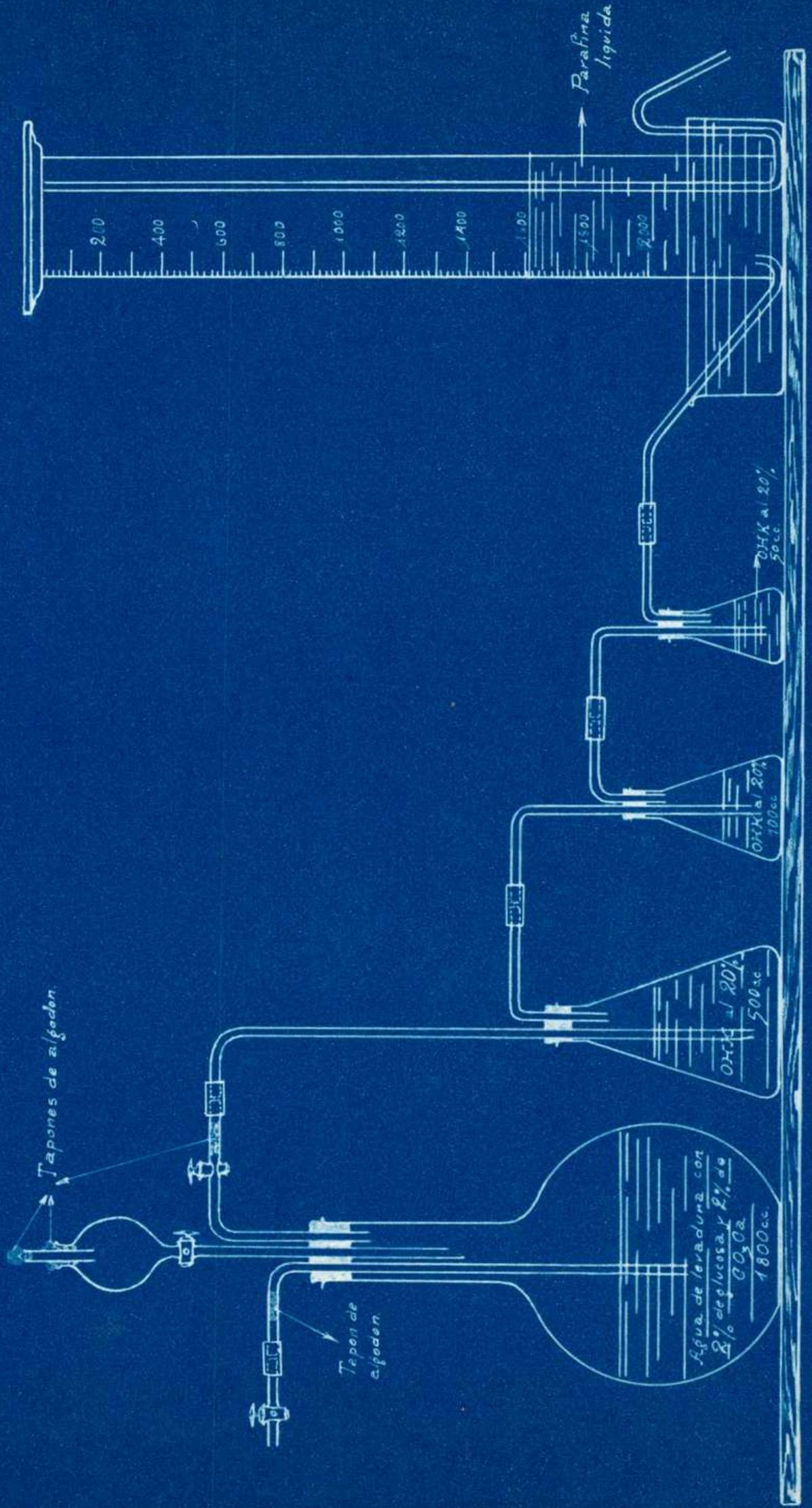
DISPOSITIVO EMPLEADO PARA LA FERMENTACION.

Hemos realizado en proceso de fermentación de acuerdo con las indicaciones dadas por M. A. Scheffer en su trabajo " De suikervergisting door bacterien der coli groep " con modificaciones que nos resultaron ventajosas del punto de vista práctico.

Se esterilizan en un balón de dos litros, durante 15 minutos a 120 grados, mas o menos 1800 c.c. de agua de levadura (la hemos preparado siguiendo la técnica de Beijerinck) con 2% de glucosa, 2% de creta y una gotita de ácido oleico para evitar la formación de espuma durante la fermentación.

Se saca el balón del autoclave lo mas caliente posible y agitando bien, para tener el carbonato de calcio en suspensión homogénea, se toma esterilmente una muestra del medio, de unos 50 c.c., con la cual se hace la determinación del anhídrido carbónico y de la glucosa antes de la fermentación, Se tapa luego el balón con un tapón de goma atravesado por un embudo de decantación y dos tubos (ver figura), conjunto que ha sido esterilizado previamente. Mientras el medio se enfria se hace burbujear en el nitrógeno lavado, en una espiral lavadora, con pirogalato alcalino, con el objeto de tener un ambiente anserobio. Cuando ha llegado a 15-18 grados se detiene la corriente de nitrógeno, se cierra el balón por medio de las llaves, y se lleva a la estufa donde se conecta con tres lavadores y una probeta constituyendo el conjunto un aparato como el de la figura, haciendo las uniones de vidrio sobre vidrio y con goma de vacio untada con grasa Ramsay para evitar toda pérdida de gas.

Al cabo de tres o cuatro horas todo el aparato es-



tá a la temperatura de la estufa y el nitrógeno ha desalojado el aire del primer frasco lavador por lo menos, evitándose así que, después, entre oxígeno por difusión, al balón. En estas condiciones se hace la siembra, por el tubo a bromo, de 1 a 2 c. c. de suspensión de un cultivo joven (12 a 15 horas).

El gas desprendido en la fermentación, después que burbujea en el hidróxido de potasio, se recoge sobre parafina líquida en una probeta de dos litros que se llena fácilmente aspirando por un tubo en U que llega hasta el fondo de la misma.

Terminado el proceso, que dura alrededor de dos días, se desalojan los gases del balón agregado, por el tubo de bromo, una cantidad medida de agua estéril, a 37 grados. Se hace burbujear después, durante mas o menos una hora, aire sin anhídrido carbónico para arrastrar la parte disuelta de este gas que así se fija en la potasa de los lavadores.

Es importante tener la certeza de que gérmenes extraños al estudiado no han actuado en el proceso, para lo cual se saca esterilmente una muestra, al destapar el balón, y se hace una coloración de Gram y una siembra en placa.

VALORACION DE LA GLUCOSA.

La diferencia entre las cantidades de glucosa en el medio, antes y después de la fermentación, nos da la cantidad de glucosa consumida por las bacterias.

A las valoraciones las hicimos con el método de reducción de ferricianuro propuesto por Hagedorn Jensen en 1923 para la determinación de glucosa en sangre, y modificado en las proporciones de los reactivos, por otros autores que extendieron el alcance del método a mayores cantidades de glucosa. Hanes en 1929 lo aplicó entre 0,2 y 3,8 mgr.. En 1931 Clarence Schmidt modificó los reactivos usados por Hanes de modo de no necesitar micro-buretes para la titulación, y lo aplicó a la determinación de glucosa en medios de cultivo. Según Schmidt la aproximación del método, tal como lo describe, es de aproximadamente 2% y presenta, desde luego, ventajas sobre el método comúnmente usado en trabajos bacteriológicos que es el micrométodo Shaffer y Hartmann (1920-1921), método volumétrico de reducción de cobre, que fue adaptada a la determinación de hidratos de carbono en medios de cultivo por Stiles, Peterson y Fred en 1926.

En 1930 Magge y Smith, estudiando los métodos de dosificación de azúcares reductores en medios de cultivo, de bacterias, concluyeron, que la valoración no es exacta, por el método de Shaffer y Hartman, tal como lo usaron Stiles, Peterson y Fred, sobre filtrados obtenidos defecando el medio con Subacetato de plomo; No encontraron mejores resultados con otros precipitantes de proteínas. Con el método colorimétrico de Benedict lograron solo datos poco satisfactorios y los menos variables los obtuvieron con el de Shaffer y Hartman aplicado

al medio sin previa clarificación, no teniendo, sin embargo, mayor aproximación que el 10%.

Merrill, en sus estudios sobre metabolismo de hidratos de carbono por organismos del género *mycobacterium*, dosificó la glucosa de acuerdo con las indicaciones de Stiles, Peterson y Fred y no obtuvo una exactitud mayor del 10%.

Por mi parte diré que hemos comprobado el método con los reactivos y la técnica de Schmidt teniendo buenos resultados.

Descripción del método.— En un baloncito aforado de 10 c.c. se defeca un (1) c.c. de muestra con 1 c.c. de solución de sulfato de zinc y 1 c.c. de hidróxido de sodio 0,5 N (método de Somogyi-1930) y se lleva a 10 c.c. con agua destilada, se agita y se filtra. A 1 c.c. de filtrado, medido exactamente en un tubo de 200 X 25 mm., se agregan 5 c.c. de solución alcalina de ferricianuro (4,2 % de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ y 10,6 % de $\text{C O}_3 \text{N a}_2$) y cuatro c.c. de agua destilada lavando las paredes del tubo; se hace, al mismo tiempo un ensayo en blanco con 5 c.c. de solución de ferricianuro y 5 c.c. de agua. Los tubos se calientan durante 15 minutos, en un baño maría hirviendo energicamente; después se enfrían por inmersión en agua. Se agregan 5 c.c. del reactivo de yoduro de potasio (1 K 25 gr. SO_4Zn 50 gr. ClNa 250 gr. y H_2O destilada hasta 2000 c.c.) y 5 c.c. de ácido acético al 5%. El yodo puesto en libertad se titula con hiposulfito $\frac{\text{N}}{200}$ usando tres o cuatro gotas de indicador de almidón. Clarence Schmidt, en su trabajo, ha dado una tabla de las cantidades de glucosa en función de la diferencia entre los volúmenes de hiposulfito gastados por el testigo y por la solución ensayada.

DOSIFICACION DE LOS PRODUCTOS.

a) Gases. Los gases que se producen en la fermentación son, como hemos visto, hidrógeno y anhídrido carbónico. Se dosificaron de la siguiente manera:

Hidrógeno: Cuando se detiene el proceso hay en el balón una mezcla de anhídrido carbónico, hidrógeno y nitrógeno, y del primer lavador se adelanta hidrógeno y nitrógeno; en estas condiciones el volumen que indica la probeta es la suma del hidrógeno y del anhídrido carbónico gaseoso no fijado aún. Al agregar el agua al balón los gases, desalojados, llegan a los lavadores donde se fija el anhídrido carbónico y el volumen de gas recogido en la probeta es, entonces, igual al volumen de hidrógeno producido en la fermentación más el volumen de agua añadida.

El peso de hidrógeno se tiene fácilmente sabiendo que un litro a 0° y 760 mm. pesa 0,0899 gr..

Anhídrido carbónico. La cantidad de anhídrido carbónico producido en la fermentación no se puede determinar dosificando lo que se ha desprendido y lo que ha quedado disuelto porque también se origina por asociación de los ácidos sobre la creta. La cantidad buscada está dada por la diferencia entre el anhídrido carbónico total sea libre o combinado antes y después de la fermentación.

Anhídrido carbónico total antes de la fermentación. Se determina sobre 25 cc. de medio de cultivo, secado en las condiciones ya indicadas. Se hace el ataque, con ácido sulfúrico al tercio, en caliente, en un dispositivo semejante al de Fresenius-Classen (Treadwell. Tratado de química analítica T. II pag. 353). Consta de un matraz de descomposición de

150-200 c.c. de cebida cuyo tapón está atravesado por un tubo de entrada que llega hasta el fondo, un embudo de llave y un refrigerante vertical conectado, a su vez, con dos tubos secadores, el primero con perlas de vidrio humedecidas en ácido sulfúrico y el segundo con cloruro de calcio escoriforme, a los que sigue un tubo de Mohr con solución de hidróxido de potasio al 20%, acoplado a un tubo secador y un tubo testigo con cloruro de calcio en una rama y cal sodada en la otra.

Después de hacer pasar, durante media hora, una corriente lenta de aire exento de anhídrido carbónico se conecta el tubo de Mohr y el testigo tarados, se deja caer la muestra en el matras de descomposición, se añade el ácido regulando la adición de modo que en el primer secador pasen de dos a tres burbujas por segundo. Cuando el ataque es ya muy lento se calienta con cuidado llevando hasta principio de ebullición. Cuando todo el anhídrido carbónico queda en libertad, lo que tarda unos tres cuartos de hora, se deja que siga pasando una corriente de aire sin carbónico hasta completar dos horas; después se pesan de nuevo el tubo de absorción y el testigo.

Anhídrido carbónico total después de la fermentación: Debido a la corriente de aire que se hace pasar antes de separar el balón de los levaduras, el anhídrido carbónico fijado por la potasa no es solo el desprendido durante la fermentación sino también la parte del disuelto en el medio. Si a esa cantidad se le suma el carbónico del medio de cultivo tenemos el anhídrido carbónico total después de la fermentación.

El anhídrido carbónico fijado por la potasa se determina por el método de Finkler, haciendo primero una titulación, sobre 5 c.c. de solución, con Cl H normal y usando metil-orange con lo que se tiene el valor del alcali total. Otros 5 c. c. son tratados con exceso de $\text{Cl}_2 \text{B}_g$ y titulados con Cl H usando Fenolftaleína, teniéndose así la cantidad de OH. K de la solución; la diferencia de las dos titulaciones da el anhídrido carbónico fijado.

Como al preparar la solución de potasa al 20%, no tuvimos las precauciones necesarias para que resultara exenta de carbonato, hubimos de hacer una determinación de OH. K y alcali total, antes de emplearla, y la diferencia entre este valor del OH. K y el obtenido para la solución después de la fermentación, nos da el carbónico fijado. La determinación de alcali total sirve de control, pues su valor debe permanecer constante.

El carbónico del líquido del balón se determina sobre 25 c. c. de muestra, tomados por vía agitación intensa, con el método descripto anteriormente. Se debe tener la precaución de hacer esta determinación inmediatamente después de haber eliminado el CO_2 disuelto del líquido del balón, pues, de no hacerlo así, como dicho líquido es ácido, continúa liberándose carbónico y la determinación resulta inexacta.

b) Ácidos volátiles y fijos. De 100 c.c. de muestra se elimina el carbonato de calcio por centrifugación y se colocan en un balón Kjeldahl de medio litro, acidificando con ácido sulfúrico. Para liberar totalmente los ácidos orgánicos y no añadir gran exceso de ácido mineral, que puede originar ácido fórmico de la glucosa residual, hemos

agregado ácido sulfúrico normal hasta alcanzar un pH de 1,8-1,7 procediendo por toque usando timol azul como indicador. Un valor aproximado de la cantidad de ácido necesaria, se tiene, considerando, que la diferencia entre el anhídrido carbónico del medio antes y después de la fermentación, de no quedar gas carbónico disuelto, indicará cuanto carbonato de calcio se ha combinado con los ácidos producidos en la fermentación.

Sobre la muestra acidificada, se hace un arrastre con vapor de agua exento de anhídrido carbónico, hasta tener un litro y medio de destilado, con lo cual se separan los ácidos volátiles (fórmico y acético) de los fijos (láctico y succínico). Como el líquido puede formar mucha espuma conviene intercalar un tubo Kjeldahl, entre el balón y el refrigerante.

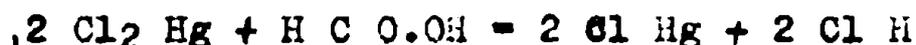
Nosotros, regulamos la destilación de manera que el volúmen del líquido del balón permanezca constante, y pasen 40-45 gotas por minuto.

Separación de ácidos fórmico y acético. En el destilado se valora la acidez total con OH. Na décimo normal usando fenolftaleína como indicador,. Dado el gran volúmen de líquido es necesario un exceso de álcali para obtener el viraje de indicador; encontramos que se puede hacer una valoración muy aproximada añadiendo álcali hasta coloración rosa, concentrando enseguida el líquido hasta 50 o 60 c.c.

y valorando el exceso de hidrato de sodio con Cl H décimo normal. Se observa mejor el viraje agregando exceso medido de ácido y luego llevando a neutralidad con OH. Na . Cuando el líquido está alcalino hay que evitar que la soda se carbo-

nate, esto se consigue tapando el frasco, mientras se enfría, con un tapón atravesado por un tubo largo doblado en U en la parte superior, con cal sodada.

El ácido fórmico se determina por el método de Fincke; el líquido concentrado neutro se pasa a un vaso de precipitación, se le añaden 10 c.c. de reactivo que contiene 10% de $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$, 3% de Cl Na y 3 a 5% de acetato de sodio, se calienta dos horas a b. m., se filtra y lava con agua y alcohol-éter, se seca a 100° , una hora. El peso del calomel da la cantidad de ácido fórmico, si se tiene en cuenta que la reacción es:



La cantidad de ac. acético resulta de la diferencia entre la acidez total y la correspondiente al ácido fórmico.

Acidos fijos. El residuo de la destilación por arrastre, que contiene los ácidos fijos, se concentra a b.m. hasta 50 o 60 c.c. y se seca con una mezcla de partes iguales de sulfato de sodio anhidro y arena calcinada. La masa endurecida se pulveriza y se extrae con éter en un Soxhlet durante ocho horas. Se evapora el éter del extracto y el residuo se disuelve en 50 c.c. de alcohol; de esta solución la mitad se titula con OH. Na décimo normal y fenolftaleína, teniendo en cuenta que el ácido láctico está en parte como éster lactil-láctico, por lo que hay que añadir exceso de álcali, calentar 5 minutos y volver a titular (G. Bertrand "Guía para las manipulaciones de Química biológica"). Los 25 c.c. restantes se colocan en un tubo grande de centrifuga, de vidrio Pirex, previamente tarado, y se calienta en

b. m.; cuando se ha evaporado el alcohol, sin sacar el tubo del baño, se disuelve el residuo en agua y se neutralizan los ácidos con solución saturada en frío de hidróxido de bario, que se deja caer gota a gota hasta la coloración roja con fenolftaleína. Se adapta en seguida al tubo de centrifuga un tapón atravesado por dos tubos, uno de entrada, en U, que llega casi hasta el nivel del líquido, y que lleva en el extremo libre un tubo con cal sodada; el otro, de salida que se conecta con la trompa de agua, obteniéndose así una rápida circulación de aire por el interior del tubo, lo que facilita la evaporación.

Cuando el líquido se ha reducido a $\frac{1}{2}$ c.c., se detiene la concentración, se agrega 1 c.c. de agua y 23 c.c. de alcohol de 96°, y se calienta a b.m.; el lactato de bario se disuelve y se separa luego del succinato de bario centrifugando durante 3 minutos. Se hacen dos extracciones más con alcohol de 92° y una con 10 c.c. de alcohol de 90°, después de lo cual, el succinato de bario se seca durante una hora en estufa a 100° y se pesa.

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

c) Determinación del alcohol etílico. Dosificamos el alcohol por el método piconométrico.

1600 c.c. del líquido fermentado se neutralizan cuidadosamente (llevando a pH 7 con bromotimol azul como indicador), y se destilan hasta recoger 800 c.c. que se vuelven a destilar recogiendo la mitad y así sucesivamente hasta tener 200 c.c.. La última fracción se rectifica con ayuda de un tubo de Vigreux hasta recoger 50 c.c. de líquido

del que se determina la densidad.

Como a pesar de haber neutralizado el líquido inicial, molestara la presencia de cierta substancia amoniacal muy volátil, que pasaba juntamente con el alcohol en el destilado, acidificamos el líquido con ácido sulfúrico diluido antes de proceder al fraccionamiento con el tubo de Vigreux.

d) Dosificación del acetil metil carbinol. Esta dosificación fué hecha siguiendo el método descrito por Van Niel, que es el siguiente: a una fracción de medio de cultivo fermentado, se le agrega exceso de solución de cloruro férrico, con lo cual se oxida el acetil metil carbinol a diacetilo, y se destila lentamente recogiendo en una mezcla que contenga para cada 100 mgr. de diacetilo 2 c.c. de solución de cloruro de hidroxilamina al 20%, 3-5 c.c. de solución de acetato de sodio al 20% y 1-2 c.c. de solución de cloruro de níquel al 10%.

Cuando se han recogido $\frac{3}{5}$ del líquido inicial, se cierra el frasco con el destilado y se coloca en b. m. a 80° durante una hora, después de lo cual se deja enfriar, se abre el frasco y se filtra, lava con agua caliente y se seca a 110° el precipitado de dimetilglioxima de níquel.

A pesar de ser la cepa estudiada Voges Proskauer negativa, he seguido este método para confirmar la no existencia de acetil metil carbinol aun en pequeñas cantidades.

RESULTADOS.

Siguiendo los métodos de valoración de las distintas sustancias descriptos en el capítulo anterior obtuve los siguientes resultados:

a) Determinaciones antes de la fermentación.

Volumen de líquido en el que se efectuará la fermentación:

$$1840 \text{ c.c.} - 80 \text{ c.c. (muestra)} = 1760 \text{ c.c.}$$

Determinación de CO₂

Peso del tubo de Mohr + OHK + CO₂ = 101,9970 gr.

Peso del tubo de Mohr + OHK = 101,7940 gr.

Peso del CO₂ = 0,2030 gr.

Peso del tubo testigo antes de la determinación 68,3596 gr.

Peso del tubo testigo despues de la determinación 68,3617 gr.

En 25 c.c. de muestra hay 0,205 gr.

En 1760 c.c. de líquido a emplear hay 14,43 gr.

Determinación de glucosa.

Título de la solución de S₂O₃Na₂ $\frac{0,971}{200}$ N.

Testigo.....12,47 c.c. de sol. de S₂O₃Na₂ N/200

Medio de cultivo.....1,36 c.c. " " " " "

11,21 c.c. " " " " "

Según tabla 11,21 c.c. de S O Na corresponden a 2,027 mgr. de glucosa.

En 1760 c.c. de líquido hay 35,7 gr. de glucosa.

b) Determinaciones después de la fermentación.

H₂O añadida 620 c.c.

Volumen total del líquido de fermentación 2320 c.c.

Medida del H₂

Presión.....776 mm.

Temperatura... 37°

Volumen de gas 1660 - 620 = 1040 c.c.

$$V_0 = \frac{776 \times 1040}{760 \times \left(1 + \frac{37}{273}\right)} = 935 \text{ c.c.}$$

Peso del H₂ desprendido en la fermentación $0,935 \times 0,0899 =$
0,086 gr.

Determinación del CO₂

1° .CO₂ en el líquido del balón

Peso del tubo de Mohr + OHK + CO₂ = 102,4653 gr.

Peso del tubo de Mohr + OHK = 102,3292 gr.

Peso del CO₂ = 0,1361 gr.

Tubo testigo antes de la determinación 68,3338 gr.

Tubo testigo después de la determinación 68,3639 gr.

En 25 c.c. de muestra hay 0,136 gr. de CO₂

En 2320 c.c. de líquido hay 13,62 gr. de CO₂

2° CO₂ fijado por la solución de OHK.

CO₂ de la solución inicial

alcali total 5c.c. de sol. gastan 14,9 c.c. de ClH N.

OHK 5 c.c. " " " 13,2 c.c. " " "

Solución del primer lavador

alcali total	5 c.c. de sol. gastan	14,9 c.c. de ClH N
OHK.....	5 c.c. " " "	11,65 c.c. " " "

Solución del segundo lavador

alcali total	5 c.c. de sol. gastan	14,9 c.c. de ClH N
OHK	5 c.c. " " "	13,2 c.c. " " "

13,2 - 11,65 = 1,55 c.c. de ClH N corresponden al CO₂ fijado por 5 c.c. de sol. de OHK.

CO₂ fijado por 500 c.c. de sol. de OHK = 3,41 gr.

12,62 + 3,41 - 14,43 = 1,6 gr. de CO₂ producido en la ferment.

Determinación de la glucosa no consumida.

Título de la solución de S₂O₃Na₂ $\frac{0,873}{200}$ N.

Testigo.....	12,75c.c. de S ₂ O ₃ Na ₂	= 12,41c.c. S ₂ O ₃ Na ₂ N
Medio de cultivo.....	7,17c.c. " "	= 6,88c.c. " "

12,41 - 6,88 = 5,53 c.c. de S₂O₃Na₂ N/200 que según tabla corresponden a 1 mgr. de glucosa

En 2320 c.c. de líquido hay 23,20 gr. de glucosa

35,7 - 23,2 = 12,5 gr. de glucosa fermentada

Determinación de alcohol.

Se partió de 1600 c.c. de líquido fermentado

Peso del picnómetro con dest. alcohólico a 15° 37,8826 gr.

" " " vacío 13,0347 gr.

Peso del dest. alcohólico 24,8579 gr.

Volumen del picnómetro a 15° 24,9815 c.c.

Densidad del destilado alcohólico 0,99505 que según tabla corresponde a una sol. con 3,32 % de alcohol en peso.

Se recogieron 50 c.c. de destilado alcohólico que pesan 49,75

En 1000 c.c. de líquido fermentado $\frac{49,75 \times 3,32}{100} = 1,1$ gr. de alcohol.

En 23300 c.c. de líquido hay 1,59 gr. de alcohol.

Determinación de ácidos volátiles.

A la acidez volátil total corresponden 14 c.c. de OHNa N/10

Peso del pp. de ClHg 0,0101 gr.

$0,0101 \times 0,0975 = 0,000985$ gr. de ácido fórmico en 100 c.c.

En 2330 c.c. hay 0,023 gr. de ácido fórmico.

0,023 mgr. de ácido fórmico corresponden a 0,3 c.c. de OHNa N/10

$14 - 0,3 = 13,7$ c.c. de OHNa N/10 corresp. a ac. acético

$13,7 \times 6 = 82,2$ mgr. de ac. acético en 100 c.c.

En 2320 c.c. hay 1,92 gr. de ácido acético.

Determinación de ácidos fijos.

A la acidez fija total corresponden 42 c.c. de OHNa N/10

Peso del succinato de bario 0,0589 gr.

$0,0589 \times 0,4664 = 0,0275$ gr. de ac. succinico en 25 c.c. de

extracto alcohólico que corresponden a 50 c.c. de líquido fermentado.

En 2320 c.c. hay 1,28 gr. de ácido succinico.

55 mgr. de ac. succinico corresp. a 9,3 c.c. de OHNa N/10

42 - 9,3 = 32,7 c.c. de OHNa N/10 corresp. a ac. láctico

32,7 x 9 = 294,3 mgr. de ac. láctico en 100 c.c.

En 2530 c.c. hay 6,83 gr. de ácido láctico.

Moles de sustancia producida por 50 moles de Glucosa.

$$\frac{50 \times \text{moles de sustancia producida}}{\text{moles de glucosa fermentada}} =$$

$$= \frac{50 \times \text{gr. de sust.} \times \text{P.M. de la glucosa}}{\text{gr. de glucosa} \times \text{P.M. de la sustancia}}$$

$$\frac{50 \times \text{P.M. de la gluc.}}{\text{gr. de glucosa}} = \frac{50 \times 180}{18,5} = 720$$

Moles de CO₂ por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{1,6}{44} = 26,2$

Moles de H por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{0,086}{2} = 31$

Moles de ac. fórmico por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{0,023}{46} = 0,4$

Moles de ac. acético por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{1,92}{80} = 23$

Moles de alcohol por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{1,59}{46} = 24,9$

Moles de ac. láctico por 50 moles de gluc. $720 \times \frac{6,83}{90} = 54,7$

Moles de ac. succinico por 50 mol. de gluc. $720 \times \frac{1,28}{118} = 7,8$

Por ciento del carbono de la glucosa fermentada.

$$\frac{100 \times \text{átomos-gramo de C. de la sustancia producida}}{\text{átomos-gramo de C. de la glucosa fermentada}} =$$

$$\frac{100 \times \text{moles de sustancia} \times \text{N}^\circ \text{ de átomos de C. de 1 molécula}}{\text{moles de glucosa fermentada} \times 6}$$

Anhidrido carbónico

$$\frac{0,0383 \times 1}{0,0694 \times 6} \times 100 = \frac{0,0383}{0,4164} \times 100 = 8,67$$

Acido fórmico

$$\dots\dots\dots \frac{0,0005 \times 1}{0,4164} \times 100 = 0,1$$

Acido acético

$$\dots\dots\dots \frac{0,032 \times 2}{0,4164} \times 100 = 15,3$$

Acido láctico

$$\dots\dots\dots \frac{0,076 \times 3}{0,4164} \times 100 = 54,7$$

Acido succinico

$$\dots\dots\dots \frac{0,0105 \times 4}{0,4164} \times 100 = 10,4$$

Alcohol

$$\dots\dots\dots \frac{0,0345 \times 2}{0,4164} \times 100 = 16,6$$

CUADRO DE RESULTADOS

Productos	Gramos	Por ciento del C. de la glucosa	Moles de sustancia por 50 moles de gluc.		
			CO ₂	H ₂	CH ₃ CHO
Glucosa añadida	35,7	100	—	—	—
Glucosa restante	23,2				
Glucosa consumida	12,5				
Hidrogeno	0,086	—	—	31	—
Anh. carbonico	1,6	8,7	26,2	—	—
Ac. fórmico	0,023	0,1	0,4	0,4	—
Ac. acético	1,92	15,3	—	—	23
Ac. láctico	6,83	54,7	54,7	54,7	54,7
Ac. succinico	1,28	10,4	15,6	15,6	7,8
Alcohol	1,59	16,6	—	—	24,9
Total		105,8	96,9	101,7	110,4

CUADRO N° 4

Productos	Gramos	Por ciento del C. de la glucosa	Moles de sustancia por 50 moles de gluc.		
			CO ₂	H ₂	CH ₃ CHO
Glucosa añadida	35,70				
Glucosa restante	18,80	100	—	—	—
Glucosa consumida	18,80				
Anh. carbonico	1,86	7,5	22,7	—	—
Hidrogeno	0,08	—	—	21,9	—
Ac. fórmico	0,09	0,3	1,1	1,1	—
Ac. acético	2,51	14,9	—	—	22,4
Ac. láctico	7,03	41,9	41,8	41,8	41,8
Ac. succinico	3,00	18,2	27,2	27,2	13,6
Alcohol etílico	1,91	14,8	—	—	22,2
Total		97,6	92,8	92,0	100,0

CONSIDERACION DE LOS RESULTADOS.-

De la comparación de los resultados consignados en el precedente cuadro, con los del cuadro IV que son los de uno de los balances, de fermentación anaerobia de la glucosa por Escherichia coli, efectuados por Scheffer se ve que el germen en estudio, que a pesar de desarrollarse en el medio de Koser, tiene muchas características del Escherichia Coli no presenta, en cuanto a su fermentación de la glucosa, diferencias, por lo menos considerables, con este germen.

De lo anterior parece resultar, que del punto de vista de la clasificación, es de mayor importancia la producción de acetyl metil carbinol y la elevación de la acidez en medio glucosado hasta pH 4,5 o menos que la capacidad de utilizar el radical citrato como única fuente de carbono.

Carlos Solís

BIBLIOGRAFIA

- Koser, S.A.- Correlation of citrate utilization by members of the colon-aerogenes group with others differential characteristics and with habitats.- Journ. Bact.- 9, 59, 1934
- Ruchhoft, C.C. , Kallas, J.G. , Chin, E. and Coulter, E.W.- Coli-aerogenes differentiation in water analysis.- Journ. Bact.- 21, 407, 1931.
- France, P.L.- Studies of Bacterium coli in privately owned rural water supplies.- Journ. Bact.- 25, 623, 1933.
- Werkman, C.H. and Guillen, G.F.- Bacteria producing trimethylene glycol.- Journ. Bact.- 23, 167, 1932.
- Leifson, E.- An improved reagent for the acetyl-methyl-carbinol test.- Journ. Bact.- 23, 353, 1932.
- Werkman, C.H.- An improved technic for the Voges-Proskauer test.- Journ. Bact.- 20, 121, 1930.
- Lindsey, G.A. and Meekler, C.M.- Two rapid methods for distinguishing between Escherichia coli and Aerobacter aerogenes.- Journ. Bact.- 25, 115, 1932.
- Harden, A.- The chemical action of B. coli communis and similar organisms on carbohydrates and allied compounds.- Journ. Chem. Soc.- 79, 610, 1901.

Harder, A. and Walpole, G. S.- The chemical action of B. lactis aere
genes Escherich on glucose and mannitol. Production of
2-3 butyleneglycol and acetyl-methyl-carbinol.-
Proc. Roy. Soc. B.- 84, 493, 1912.

Grey, E. C.-The enzymes which are concerned in the decomposition
of glucose and mannitol by Bacillus coli communis.-
Proc. Roy. Soc.-B.- 87, 472, 1914. ; The enzymes concern-
ed in the decomposition of glucose and mannitol by
Bacillus coli communis. Part II Experiment of short
duration on emulsion of the organism.-Proc. Roy. Soc.-
B.-90, 75, 1919. ; The enzymes concerned in the decom-
position of glucose and mannitol by Bacillus coli com-
munis. Part. III. Various phases of the decomposition
of glucose by an emulsion of the organism.-Idem B.-
90, 92, 1919. ; The enzymes of Bacillus coli communis
which are concerned in the decomposition of glucose
and mannitol, Part. IV, The fermentation of glucose in
the presence of formic acid.-Idem, B.-91, 294, 1920. ;
The enzymes of Bacillus coli communis, Part. V. Anaerobic
growth followed by anaerobic and aerobic fermentation
The effects of aeration during the fermentation.-Idem
B.-103, 312 1928.

Kluyver, A. J.-The chemical activities of micro-organisms. London
1931.

- Scheffer, M. A.- De suikervergisting door bacteriën der coli groep.-Diss Delft. (1928).
- Hanes, C. A.- An application of the method of Hagedorn and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars.-Biochem. Journ.- 20, 353
- Schmidt Jr, C. F.- Determination of carbohydrates in bacteriological culture media.- Journ. Bact.- 22, 36, 1931.
- Shaffer, P. A. and Hartman, A. F.- The iodimetric determination of copper and its use in sugar analyses. II Methods for the determination of reducing sugars on blood, urine, milk and others solutions.- Journ. Biol. Chem.-45, 365.
- Stiles, H. R. Peterson, W. H. and Fred, E. B.- A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures.-Journ. Bact.- 12, 427.
- Magee, M. C. and Smith, H. Gregg.- A study of methods for the determination of reducing sugars in bacteriological media.- Journ. Bact.- 19, 125.
- Merrill, M. H.- Carbohydrate metabolism of organisms of the genus mycobacterium.- Journ. Bact.- 20, 235.
- Somogyi, M.- A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar.- Journ. Biol. Chem.-86, 655

Treadwell.-Tratado de química analítica.Tomo II pag.353(Método de Fresenius-classen)

König, J.- Chemie der menschlichen Nahrungs-und Genussmittel.
Tomo III - 3^{era} parte- pag 457.(Metodo de Fincke)

Fürth, O.und Lieben, F.- Weitere Untersuchungen über Milchsäure-
zerstörung durch Hefe.- Bioch. Zeits.-133,165,1922.

Bertrand, G.- Guide pour les manipulations de chimie biologique
Paris. 1913.

van Niel, C.B.- Notiz über die quantitative Bestimmung von
Diacetyl und Acetylmethylcarbinol.-
Bioch. Zeits.- 187, 472, 1927

