

Tesis de Posgrado

estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas

Porcel, Matilde

1947

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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:

Porcel, Matilde. (1947). estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0514_Porcel.pdf

Cita tipo Chicago:

Porcel, Matilde. "estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de bacterias acéticas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1947. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0514_Porcel.pdf

ESTUDIO MORFOLOGICO, FISIOLOGICO Y BIOQUIMICO DE
BACTERIAS ACETICAS.

Tesis presentada a la
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
para optar al título de Dras. en Química
por

MATILDE PONCEL Y NOEMI PONCEL.

Buenos Aires - 1947 -

Tesis 514

T 514



Al Ing. Agr. SANTOS SORIANO

nuestra gratitud.

Matilde Ornel
Jaime Ornel

I- ANTECEDENTES.

Las bacterias acéticas, agrupadas en el género Acetobacter de la familia Acetobacteriaceae, según la clasificación de Bergey (1) se caracterizan por tomar la energía necesaria para su vida de la oxidación del alcohol etílico á ácido acético ó de la oxidación de otras sustancias, entre ellas diversas azúcares y alcoholes. Otra característica general es la de formar película en la superficie de los medios líquidos, aunque ésta falta en unas pocas especies. Son bastones más bien cortos, algunos cocobacilos, pero también pueden presentar formas alargadas, filamentosas (con ramificaciones) o en forma de clavos e hinchadas. Pueden ser móviles ó inmóviles. No dan endosporas. Como la mayor parte de las bacterias de oxidación son catalasa positivas, á excepción del Acetobacter peroxydans.

Tienen importancia industrial, en primer lugar, para la obtención del vinagre y además en la preparación de otros productos, como el ácido glucónico, 5-cetoglucónico y sus sales, dihidroxiacetona, sorbosa, perseulosa, levulosa, acetil-metil-carbinol ácido glicólico, etc., algunos de ellos de importancia farmacéutica y otros como materia prima para diversas industrias.

1.- HISTORIA

El conocimiento de este grupo de bacterias data de muy antiguo debido á su aplicación en la industria del vinagre aunque el empleo de las mismas para la obtención de sustancias orgánicas

(1) La bibliografía se cita al final del trabajo por orden alfabético.

es bastante reciente.

Según Butlin fué Persoon el primero que examinó la película que se formaba en los líquidos que sufren la llamada fermentación acética, y la denominó Mycoderma (1822), pero recién en 1837 Kützing declaró que estaba constituida por organismos vivientes; en 1868 Pasteur lo confirmó demostrando que dicho proceso era debido á la acción de una especie que llamó Mycoderma acetí.

En 1879 Hansen aisló de la cerveza dos organismos que llamó: Bacterium acetí (a) y Bact. pasteurianum (b). Los llamó Bacterium y los autores posteriores continuaron con esa nomenclatura para indicar un bastón no esporulado.

Boutroux (1878) describió la acción del fermento que crecía en un medio con glucosa y materia nitrogenada como una "fermentación láctica" y encontró que ese fermento también oxidaba el alcohol á ácido acético; concluyó que el fermento acético y el láctico eran un mismo organismo. En 1880 corrigió sus conclusiones y estableció que el ácido formado á partir de la glucosa era glucónico y no láctico y que el fermento responsable era el Mycoderma acetí. Brown en 1886 (a) repitió las experiencias de Boutroux usando en lugar de agua de levadura, solución mineral de Pasteur con glucosa y carbonato de calcio y encontró como único producto ácido glucónico, porque no reducía el Fehling y por el análisis elemental. El mismo investigador, poco después (b), reconoció que en la "madre del vinagre" había un organismo que difería del Bact. acetí y, por su propiedad característica de formar celulosa, lo llamó Bact. xylinum.

Hansen (1894) aisló de la cerveza una nueva especie á la que dió el nombre de Bacterium kützingianum.

Bertrand (1896) observó que la sorbosa que aparecía en los jugos de los frutos del serbal (Sorbus aucuparia L.), cuando se dejan espontáneamente al aire, era producida á partir de la sorbita que contenían por un microbio llevado por una mosca del vinagre (Drosophila cellaris). Ese organismo, al cual dió el nombre de bacteria de la sorbosa, se encuentra en el vinagre y es muy semejante al Bact. xylinum de Brown. En 1898 (a) estudió la producción de dioxiacetona por acción del mismo organismo sobre la glicerina y en 1904 realizó un estudio bioquímico completo del mismo, demostrando que no solamente coincide con el Bact. xylinum en las propiedades morfológicas, sino también en el comportamiento bioquímico.

En cuanto a la nomenclatura empleada para estos organismos, conviene puntualizar que Kützing en 1837 usó el término Ulvin y Naegeli en 1857, Umbina. Beijerinck es el primero que emplea la palabra Acetobacter para designar á varias especies aisladas por él: Acetobacter zeidlerii (1896), Acetobacter rancens (1898) y Ac. melanogenum (1911). En 1900 propone esa nomenclatura para todo el género, lo cual fué aceptado también por Fuhrmann en 1905 y otros. Ludwig en 1898 emplea Acetobacterium y Orla -Jensen en 1909 Acetimonas.

Henneberg aisló las siguientes especies: Bacterium oxydans y Bacterium acetosum (1897), Bact. acetigenum (1898)a, Bact. ascendens y Bact. industrium 1898 b), Bacterium shützenbachii, Bact. curvum, Bact. orleanense, Bact. vini acetati y Bact. xylinoides (1906). Fuhrmann (1906) aisló el Ac. plicatum y Shimwell (1913) el Ac. viscosum.

Al haberse descubierto un número relativamente grande de especies comenzaron los intentos para clasificarlas. En la sistemática de todas las bacterias que Orla-Jensen propuso en 1909, basándose en las propiedades bioquímicas, las bacterias acéticas constituían el 4º género de la familia de las Oxidobacteriaceae llamado Acetimonas, sin subdividir las.

Watermann (1913) las divide en termófilas y psicófilas. Estas últimas, es decir, las aisladas á bajas temperaturas, dan grandes cantidades de ácido glucurónico á partir de la glucosa, mientras las termófilas no lo dan o lo dan en pequeña cantidad. Unicamente las psicófilas invierten la sacarosa.

Janke (1925) hace una clasificación en: I Haplotrophos y II Symplotrophos, según que desarrollen ó no en el medio sintético de Beijerinck constituido por alcohol etílico y sales inorgánicas disueltas en agua destilada. Los del grupo I crecen en ese medio y se subdividen en A) Grupo del Bact. schützenbachii: no dan película mucosa ni filamentosa en los medios líquidos y B) Grupo hansenianum: dan película filamentosa o mucosa. Los del Grupo II, Symplotrophos, son los que no desarrollan en el citado medio y comprenden: el Grupo A) del Bact. rancens que dan película viscosa pero que no se colorea de azul con iodo. Este comprende a su vez los siguientes sub-grupos: a) sub-grupo del Bact. acetii de Hansen: dan película tenue que se rompe y son no móviles; B) del Bact. acetii de Brown: película que se rompe y móviles y c) subgrupo del Bact. albuminosum de Lindner que dan en cerveza película mucosa y filamentosa. Grupo B) del Bact. pasteurianum: da color azul con el iodo y se subdivide en: a) móviles y b) inmóviles. Grupo C) del Bact. xylinum de Brown da película gruesa y

tenaz.

Henneberg las clasifica según su habitat en: a) bacterias de los mostos: no se usan en la manufactura del vinagre porque producen poco ácido, se encuentran en las destilerías y fábricas de levaduras, son: el Bact. oxidans y el Bact. industrium; b) bacterias del vinagre de cerveza: Bact. aceti, Bact. pasteurianum y Bact. kützingianum, especies de Hansen, Bact. acetosum, Bact. rancens y Thermobacterium aceti de Zeidler; c) bacterias del vinagre de vino: cultivadas (Bact. xylinoides y Bact. orleanense) y silvestres (Bact. ascendens y Bac. xylinum); d) bacterias del vinagre rápido: son formas cultivadas y se encuentran en las virutas de los acetificadores: Bact. acetigenum, Bact. schützenbachii y Bac. curvum.

Kluyver y LeeW (1923) aislaron de la cerveza corrompida una nueva especie que llamaron Ac. suboxydans por su bajo poder de oxidación y que morfológicamente coincide con el Bact. rancens

En 1925 Visser't Hooft se basa en la formación de ácido á partir de glucosa y otras sustancias para clasificar el género. Estudió cinco especies conocidas e incluyó una nueva, el Ac. peroxydans, las que ordenó según el poder oxidativo decreciente. La única especie catalasa negativa es el Ac. peroxydans. Esta y el Ac. aceti desarrollan en el medio de Hoyer que es semejante al de Beijerinck. De las demás especies que no desarrollan en ese medio el Ac. rancens desarrolla ácido y carbonato de calcio en un medio de agar-levadura-alcohol-creta y en agar-levadura-glucosa-creta. El Ac. xylinum y el Ac. melanogenum dan sólo ácido en agar-alcohol-creta, mientras en agar-glucosa-creta dan ácido glucónico que se oxida a carbonato de calcio; se diferencian en que el primero for-

ma además película pesada y no pigmento y el segundo no da película y forma un pigmento oscuro. El Ac. suboxydans se diferencia de los anteriores en que da cristales de oxygluconato de calcio en agar-levadura-glucosa-creta.

En 1929 Hermann (a) aisló del llamado "Kombucha" (té azucarado y dejado fermentar) un nuevo organismo con propiedades de hongo que, por dar gran cantidad de ácido glucónico, lo llamó Bact. gluconicum.

En 1930 Takahashi y Asai (a) aislaron el Bact. hoshigaki variedad rosea que da pigmento rojo y que produce 80 a 100% de ácido glucónico en medios con glucosa. Poco después describen el Bact. industrium var. hoshigaki.

En 1935 Asai aisló de varios frutos 38 especies de bacterias de oxidación y las clasificó según la temperatura de crecimiento y multiplicación en: grupo I: se multiplican á 30-35° y crecen á 39-40° pero no a 7-9°. Grupo II: se multiplican á 25-30° y crecen a 7-9° pero no a 39-40°. El grupo I tiene un pH óptimo de multiplicación más alto que el II y asimila el ácido acético, mientras el grupo II no. El grupo I resiste hasta el 3-7% de ácido glucónico y el II más del 10%. Las bacterias que crecen á temperaturas altas oxidan la glucosa a ácido glucónico o glucurónico y el acético á CO₂ pero no oxidan manita ni glicerina. Las que crecen á temperaturas bajas no oxidan el ácido acético, oxidan la glucosa a ácido glucurónico o 5-cetoglucónico, la manita a levulosa, la glicerina a dioxiacetona y la levulosa á ácido kójico. El autor divide el género Acetobacter en dos subgéneros: Euacetobacter (no producen ácido glucónico) y Acetogluconobacter (oxidan el alcohol a ácido acético y la glucosa a glucónico o glucurónico.)

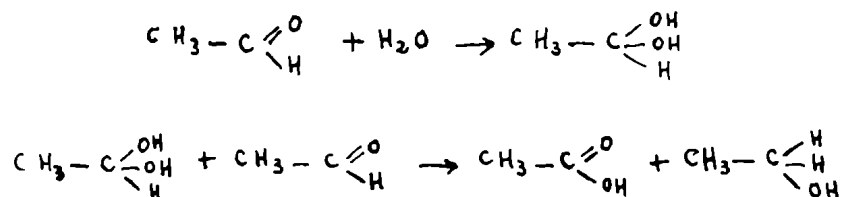
Tanaka en 1936 hace una nueva clasificación en base a los productos que dan cuando crecen en un medio con glucosa y alcohol: Los del grupo A producen sólo ácidos volátiles; los del grupo B producen ácidos volátiles y una vez que éstos se han oxidado, producen ácidos no volátiles; los del grupo C producen ácidos volátiles y cuando éstos alcanzan el máximo, producen ácidos no volátiles; los del grupo D producen ambos tipos de ácido al mismo tiempo. Los del grupo A no producen ácido glucónico; los del B producen trazas del mismo; los del C producen menos glucónico que acético y los del D dan más glucónico que acético.

Hermann y Neuschul en 1931 realizan un estudio sobre el comportamiento bioquímico de las bacterias acéticas estudiando 14 especies. Siguiendo la clasificación de Orla-Jensen, se incluye el género con el nombre de Acetimonas dentro de la familia de las Oxidobacteriaceae, dividiéndolas en dos grupos: bacterias acéticas cetógenas y acetógenas, según que formen o no cuerpos cetónicos en agua de levadura con glucosa, con glucosa y carbonato de calcio, con glicerina, eritrita y sorbita. Las cetógenas son: Bact. gluconicum, Bact. xylinum, Bact. xylinoides, Bact. orleanense y Bact. aceti de Hansen. Las acetógenas son Bact. acetosum, Bact. rancens, Bact. ascendens (Berlin) Bact. viniacetati, Bact. kützingianum y Bact. ascendens de Henneberg. El Bact. aceti de Henneberg y el Bact. pasteurianum formarían un grupo intermedio por la pequeña cantidad de cuerpos cetónicos que forman a partir de la glucosa.

En 1937 Utkin aísla del Kombucha una nueva especie, el Ac. ketogenum.

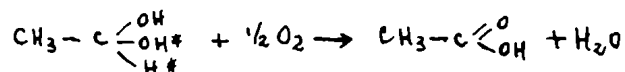
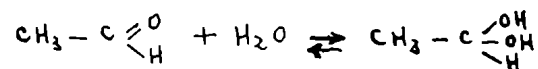
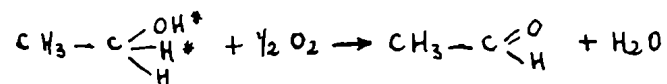
2. MECANISMO DE LA FERMENTACION ACÉTICA.

Según Butlin el primer investigador que demostró la presencia de acetaldehído en la oxidación del alcohol á ácido acético fué Hoyer en 1899; Neuberg y Nord lo confirmaron en 1919 fijando el aldehído con sulfito neutro de calcio. Según Neuberg y Windisch el aldehído formado por oxidación del alcohol, sufre una dismutación ó reacción de Cannizzaro pasando por las siguientes etapas.:



La reacción continúa así en forma alternada gracias a una buena aireación, hasta que todo el alcohol pasa á ácido acético. En este mismo trabajo los autores demostraron que partiendo de acetaldehído y por acción del Ac. ascendens, Ac. pasteurianum y Ac. xylinum se obtienen cantidades equimoleculares de alcohol y ácido. Usaron un medio con carbonato de calcio (pH 8,1) y privado de la acción del oxígeno por saturación con anhídrido carbónico: encontraron que la reacción también se produce en un medio ácido ó ligeramente alcalino.

Butlin (1936 a) en su estudio sobre las actividades bioquímicas de las bacterias acéticas, concluyó que el mecanismo no consistía en una dismutación sino en una deshidrogenación del aldehído. Para ello se basó en el trabajo de Bertho y Basu, quienes trabajando con el Bact. Pasteurianum en condiciones aeróbicas encontraron que la cantidad de alcohol formada era muy pequeña comparada con la que debía formarse si solamente hubiera dismutación. Las reacciones, entonces, son:



* átomos de hidrógeno activado.

H. Mosel en 1932 hizo un estudio de estas bacterias sobre el comportamiento en medios fluidos libres de azúcar para comprobar su acción sobre el alcohol etílico. Un medio adecuado resultó ser asparagina con 1-4% de alcohol. Con 8% de alcohol el crecimiento disminuye y el rendimiento en ácido se reduce al 50%. Cuando coexisten en un medio alcohol y ácido acético estos organismos utilizan primero el ácido acético por ser más fácilmente asimilable. La presencia de azúcar evita la sobreoxidación del ácido. No usan el metanol ni el alcohol isopropílico pero sí los ácidos propiónico, butírico e isobutírico.

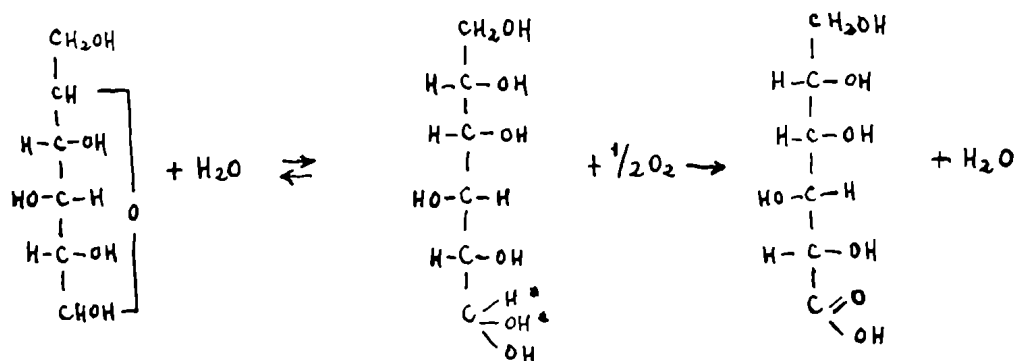
Janke y Kropacsy hicieron estudios con Bact. ascendens sobre el alcohol y demostraron que solo oxida el alcohol o aldehído a ácido acético. El pH óptimo para la deshidrogenación del alcohol es 5,57-6 para suspensiones jóvenes y de 5,93-6,71 para las viejas; para la dismutación del aldehído el óptimo más bajo es 8,4. La velocidad de deshidrogenación del alcohol es directamente proporcional al número total de células, usando la misma suspensión bacterial.

Dratvina estudió la influencia del pH y otras condiciones del medio sobre la oxidación del alcohol y ácido acético producida por estas bacterias y distinguió dos grupos: el I, con el

Bact. rancens, se caracteriza por la rápida oxidación del ácido acético, mientras que el II, con el Bact. vini acetati, lo oxida dificultosamente y sólo si está en pequeña concentración. Ambas se desarrollan y oxidan el acético en límites estrechos de acidéz: para el grupo I entre pH 3,0 y 4,8 y para el II 4,6-6,0. Al pH óptimo crecen sólo si la conc. de ácido no excede del 5%. El I es más resistente á una reacción ácida pero es más susceptible á la concentración ácida que el II que requiere un pH cercano á la neutralidad. Como á igual pH la velocidad de oxidación del alcohol es de 5 á 10 veces mayor que la del ácido acético, antes que este se oxide debe ser eliminado aquel. Si se elimina todo el alcohol contenido en un cultivo de Bact. vini acetati antes que el pH baje de 4,5 , todo el ácido es consumido; en cambio, si el pH baja de ese nivel, no habrá sobreoxidación. Para el Bact. rancens ese valor es 3,1 que nunca se alcanza con cultivos normales. Por consiguiente, aunque se haya consumido mucho alcohol, el ácido acético se sigue oxidando.

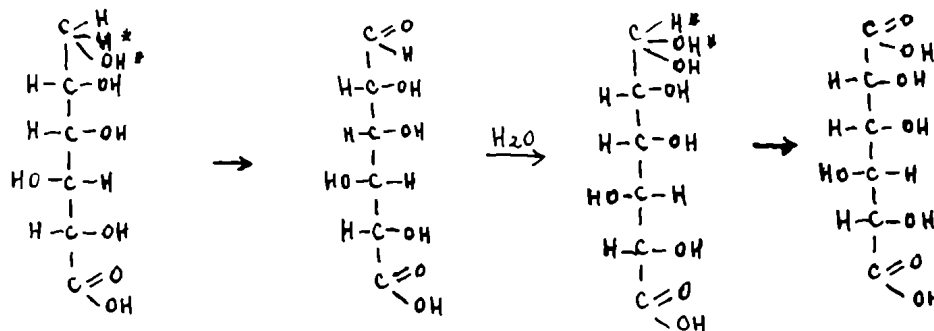
3. MECANISMO DE OXIDACION DE LA GLUCOSA.

Kluyver y Donker demostraron que las bacterias acéticas, al actuar sobre la glucosa en condiciones aeróbicas, forman ácido del modo siguiente:

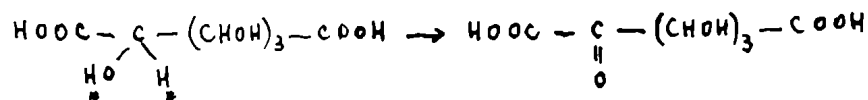


Debido á la capacidad de oxidación que poseen estas bac-

terias, es de esperar que la reacción de oxidación continúe, aunque esto dependerá de las condiciones del medio y de la configuración estérica del sustrato. En el caso de la d-glucosa, la etapa siguiente será la formación de ácido 6-aldehído glucónico (d-gulurónico) y luego la formación de ácido sacárico:

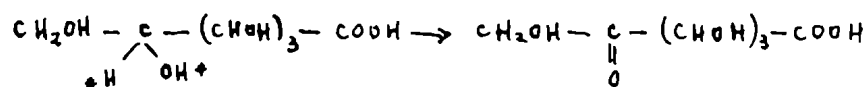


Luego se ataca el átomo de carbono en posición β dando el β -cetoácido:



y la deshidrogenación puede continuar hasta CO_2 y H_2O si la bacteria tiene suficiente poder oxidante.

Como Bertrand en 1896 había demostrado que su bacteria de la sorbosa produce sorbosa de la sorbita, es decir, oxida el grupo alcohólico secundario antes que el primario, y como la glucosa tiene igual configuración estérica, es de esperar que luego de la formación de ácido glucónico se pueda formar ácido 5-cetoglucónico:



Esto ha sido confirmado por muchos investigadores:

Bertrand (1898) Viser't Hooft, Hermann (1929b) Hermann y Neuschul, Bernhauer y Schön (1929) y Takahashi y Asai (1933 a)

Tanaka (1933) dedujo que por acción del Bact. acetii sobre la glucosa se produce sólo ácido glucónico, sin haber rotura de la

cadena de seis átomos de carbono, debido a que tales condiciones ^{en} el consumo de oxígeno era mayor que el desprendimiento de CO₂. Si hubiera descarboxilación de un β cetoácido se desprendería CO₂ sin consumo de oxígeno.

Bernhauer y Schöb (1929) demostraron que en un medio con glucosa en agua de levadura inoculado con Bact. xylinum se obtenía á los 30 días ácido glucónico y cetoglucónico. En un medio alcalino, especialmente, el glucónico pasa á cetoglucónico.

Butlin (1936 b) trabajando con suspensiones lavadas de Ac. suboxydans obtenidas de cultivos en agar mosto de maíz, obtuvo a partir de glucosa, únicamente ácido glucónico. En un medio con 2% de creta se obtienen colonias rosadas y la glucosa se oxida fácilmente a ácido glucónico y CO₂.

Bernhauer y Knobloch, sin embargo, encontraron que bajo condiciones especiales la glucosa es transformada por estas bacterias casi exclusivamente en ácido 2-cetoglucónico. Con Ac. suboxydans en glucosa con carbonato de calcio se forma 37% de cetogluconato de calcio insoluble. Usando gluconato de calcio se obtiene 76% de 2-cetogluconato aislado como sal de potasio y sólo trazas del 5-cetoácido. Se aíslan pequeñas cantidades de otro ácido reductor posiblemente 1-gulurónico. También se obtiene 2-cetoglucónico con Ac. dioxiaceticum, Ac. kefir, Ac. orleanense, Ac. ascendens y Ac. xylinoides.

Kluyver y Boezaardt trabajando con Ac. suboxydans en glucosa y carbonato de calcio comprueban la conversión cuantitativa de la glucosa en ácido cetoglucónico. Casi exactamente en el momento en que se ha consumido un átomo de oxígeno por molécula de glucosa, se produce un cambio significativo en la velocidad de con-

sumo de oxígeno, lo que revela que en primer lugar se forma ácido glucónico que luego pasa á cetoglucónico.

4.- ACCION SOBRE ALCOHOLES POLIVALENTES .-

Bertrand, después de haber estudiado la acción del bacterium de la sorbosa sobre la sorbita (1896) y sobre la glicerina (1898 a), estudió el comportamiento frente á otros polialcoholes (1898 b) y, como resultado de ello enunció la regla que lleva su nombre y que dice: 1) Sólo los grupos alcohólicos secundarios son atacados con formación de un grupo cetónico en posición β ; 2) La configuración estérica más favorable para la deshidrogenación es aquella en que el OH del tercer átomo de carbono está del mismo lado de la cadena que el OH del grupo -CHOH- en posición β . Así son deshidrogenadas: la glicerina, eritrita, l-arabita, d-sorbita, manita, perseíta y volemita y no son atacados el glicol, xilita, dulcita e idita.

Repitiendo las experiencias de Bertrand, Visser't Hooft (1925) encontró el mismo resultado a excepción de que el glicol es oxidado a glicólico y el butilen-glicol a acetil-metil-carbinol, lo que contraría aquella regla.

Virtanen y Bärlund estudiaron la transformación de glicerina en dioxiacetona por acción del Bact. xylinum y Bact. dioxiacetonicum (aislado del jugo de uvas) estableciendo como pH óptimo $\simeq 5,0$ y que el rendimiento era mayor con suministro de aire. Bernhauer y Schön (1928) establecieron las condiciones óptimas para una especie relacionada con el Ac. xylinum. El medio adecuado es 0,5 % de extracto de levadura con 5% de glicerina; tiempo 12 días; temperatura: 27 a 28° C.; pH, 4 á 4,8; profundidad del cultivo, 1-2 cms.

Hermann y Neuschul (1931) encontraron formación de dioxiacetona con: Bact. gluconicum, Bact. xylinum, Bact. xylinoides, Bact. orneañense y Bact. aceti de Hansen.

Otros trabajos sobre las condiciones óptimas para la obtención de dioxiacetona por medio de bacterias acéticas, son los de Cozic (1933), Virtanen y Nordlund (1933), Underkofler y Fulmer (1937) y Butlin (1938)

II- METODOS DE INVESTIGACION:-

A) Métodos bacteriológicos.

1) Conservación de las cepas.

Para conservar las cepas se siembran en tubos de agar-estría de agua de levadura glucosada preparada según el método de Kluyver: 200 grs. de levadura prensada se dejan 24 horas en estufa a 50° para autolizar, se agregan 1000 cc. de agua corriente, es -terilízase a 110° por 30 minutos, se deja decantar y al líquido decantado se le agregan 15 por mil de agar y 1% de glucosa. Se esteriliza a 110° por 30 minutos. Se resiembran todos los meses y se incuban a 28-30%.

2) Colonias en cajas.-

El medio anterior se distribuye en tubos de punción, se esteriliza y emplea para cajas. Se siembra, incuba, y estudia el aspecto de las colonias (macro y microscópicamente).

a) Cajas con agua de levadura-agar-alcohol-creta-

Se preparan tubos de punción con agar-agua de levadura y 2% de creta. Sobre una caja de Petri estéril se vierte estérilmente 1cc. de solución de alcohol al 35%, se agrega el agar fundido (unos 12 cc.), se mezcla bien y deja solidificarse. La concentración de alcohol en la caja es de 3%. Se siembra la cepa á investigar en un punto de la caja, obteniéndose así una colonia gigante. Al desarrollar ésta se observa la formación de un halo de mayor o menor extensión, lo que indica aparición de acidéz y en los casos en que hay sobreoxidación se observa alrededor de la colonia la ulterior formación de carbonato de calcio.

b) Cajas con agar-agua de levadura-glucosa-creta.-

Se vierte en la caja 1 cc. de una solución de glucosa al

12% y se agregan 12cc. del medio fundido, obteniéndose una concentración de glucosa de 1%. Se procede como en el caso anterior, haciéndose las mismas observaciones, con el agregado de que a veces aparecen cristales refringentes de cetogluconato de calcio.

3) Cultivos en agua de levadura con diversas sustancias disueltas.

Para estudiar el comportamiento de estas bacterias en medio líquido se hacen siembras en agua de levadura preparada por el método de Henneberg en la cual se disuelve la sustancia a investigar: Alcohol etílico al 2%, glicerina al 2%, glucosa al 2 ó 5% con o sin agregado de carbonato de calcio. Del medio líquido se distribuyen 25-30 cc. en Erlenmeyer cuando el sustrato es alcohol ó glicerina y 100 cc. en el caso de la glucosa. Se siembra ó incuba a 28° C. Se hacen observaciones sobre formación de película, turbidez, aro, cambio de coloración.

4) Desarrollo en vino diluído al 1/2 y al 1/3.

Se siembra en tubos con vino diluído y se observa la formación de película o turbidez. Los que no enturbian el vino se siembran en Erlenmeyer con vino diluído al $\frac{1}{2}$ y se titula, periódicamente, la acidez.

5) Resistencia al alcohol.

Se observa el crecimiento en tubos con 2-4-6-8-10 % de alcohol etílico en agua de levadura.

6) Resistencia al ácido. -

Se observa el crecimiento en tubos con 1-2-3% de ácido acético en agua de levadura.

7) Acidificación de sustancias hidrocarbonadas.-

El ensayo se efectúa en tubos de 12x1 cm. usando como medio básico agua de levadura autolizada al 20 %, con verde de

bromo cresol como indicador por ser el más apropiado; el pH se lleva á 5,5 .

Para facilitar el trabajo se siguió método práctico recomendado por Soriano: " Se separan tantos lotes de tubitos como el número de azúcares que se van á probar, cada uno compuesto por un número de tubitos igual al número de cepas que se van á sembrar en el día, más uno para el control de esterilidad de cada azúcar. Los tubitos de cada lote se marcan con una misma cifra romana indicadora de la sustancia que se ensaya. A continuación se reparten en estos tubitos los azúcares del ensayo. (0,1 cc. de solución al 10%) Al terminar de repartir los azúcares se vuelven á hacer otros lotes constituidos por un tubito de cada azúcar é indicando la nueva serie con otra cifra (por ejemplo con una cifra arábica que indicara el número de cada cultivo) al final de lo cual quedará sobrando un tubito de cada azúcar que se reunirán en otro lote y se usará para el control de azúcares. A cada uno de estos lotes se agrega un tubito más que servirá para el control del medio básico para probar el comportamiento de cada cultivo".

"El medio básico se distribuye en tantos tubos de ensayo como cepas se van a investigar, en la cantidad de tantos cc. por tubo como azúcares a ensayar más uno para el control. Cada tubo de medio básico se siembra con 5-6 gotas de una suspensión de la cepa que se ensaya, obtenida a partir de un cultivo fresco (en agar-agua de levadura glucosada). Se mezcla con pipeta graduada de 10 cc estéril y se distribuye en los tubitos a razón de 1 cc. por tubo."

La concentración de azúcar en el tubo es de 1%. Se incuba á 28-30° C. y se observa periódicamente la acidificación.

Se hicieron ensayos con: arabinosa, glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita y glicerina. Además, por ser característica principal de todas estas bacterias acidificar el alcohol etílico, se hicieron siembras en tubitos con alcohol á la concentración del 3%, en el mismo medio básico.

8) Temperatura óptima-

Se incuba una serie de cultivos de todas las cepas a 28-30°C. , otra serie á 37° y otra se deja á temperatura ambiente. Los resultados se observan periódicamente consignando la mayor o menor velocidad de desarrollos y el mayor o menor crecimiento a las distintas temperaturas. Se anota la temperatura óptima y si crece o no a 37° C.

9) Tinción con el iodo.-

Un trozo de la película obtenida en el medio líquido se trata en un portaobjetos con una solución concentrada de iodo en ioduro de potasio. Se deja actuar unos minutos, se lava y se toca con una varilla mojada con una solución al $\frac{1}{2}$ de ácido sulfúrico. Se observa el color obtenido con un pequeño aumento. La aparición de un color azul indica la formación de película celulósica.

10) Movilidad.-

Se hacen observaciones de movilidad en cultivos frescos obtenidos en agua de levadura con 1% de glucosa y en cerveza diluída al medio.

11) Observaciones morfológicas.-

Se estudia la morfología de las distintas cepas en preparados a la nigrosina obtenidos con cultivos frescos en agar-

agua de levadura glucosada.

12) Ensayo de catalasa.

Se hace el ensayo utilizando colonias crecidas en agar-estria de levadura glucosada y vertiendo sobre ellas unas gotas de agua oxigenada de 10 volúmenes.

B) Métodos químicos.-

En los medios líquidos ya indicados (agua de levadura con 2% de alcohol etílico, o de glicerina, o de glucosa, o con 5% de glucosa y 2% de carbonato de calcio), además de las observaciones físicas se hace el estudio de los cambios químicos producidos por las distintas cepas. Se toman porciones periódicas de muestra por medio de pipeta estéril. Se hacen los ensayos por duplicado y se consignan los resultados.

1) Agua de levadura con 2% de alcohol.-

En Erlenmeyer de 100-125 cc. se distribuyen 25-30 cc. de agua de levadura, se esteriliza a 110° C por 30 minutos y se agrega estérilmente el alcohol en la cantidad necesaria para que la concentración sea del 2%.

Para poder seguir la sobreoxidación del ácido acético formado, se extraen porciones de 5 cc. cada 5 días hasta llegar a los 50 días. Se determina la acidéz por titulación en caliente con HONa 0.1 N en presencia de fenolftaleína. Se expresan los resultados en g. de ácido acético por 100 cc. de solución. Se hace un ensayo en blanco para determinar la acidéz del medio de cultivo.

2) Agua de levadura con 2% de glucosa.-

En este caso los ensayos se hacen al mes y á los 3 meses. Se investiga la glucosa restante, el ácido 5-cetoglucónico y la acidéz fija y volátil.

a) Determinación de glucosa-

Se usa el método de Stiles, Peterson y Fred para determinar glucosa en líquidos con bacterias. Es una modificación del de Shaffer-Hartmann. El reactivo está formado por:

SO ₄ Cu. 5H ₂ O	5g/l
Acido tartárico	7,5 "
CO ₃ Na ₂ anhidro	40,0
IK	10,0
IO ₃ K	0,7
Oxalato de potasio.....	18,4

Se requieren además las siguientes soluciones:

SO₄H₂N
S₂O₃Na₂ 0,1 N, á partir de la cual se prepara la solución 0,005 N que dura pocos días, se standariza con solución de Cr₂O₇K₂.

Acetato básico de plomo al 33%.

PO₄HNa₂12H₂O al 10%.

Se toman 5 ml. del medio de cultivo en un frasco volumétrico de 50 ml., se agrega fenolftaleína y neutraliza con HONa; se agrega un ml. de acetato básico de plomo y 3 de fosfato disódico, se neutraliza y diluye a 50 ml. Se deja decantar y se toma un cc. en un tubo de Pyrex de 50 cc., se agregan 5 cc. del reactivo y diluye a 10 cc. Se hace un blanco con 5 cc. de agua y 5 de reactivo, se tapan y calientan 15 minutos a baño-maría. Se enfrían, agregan 5 cc. de H₂SO₄N, se agita, deja un minuto y titula con S₂O₃Na₂0,005 N. El final se establece con solución de almidón. Con las tablas modificadas por los autores se tienen directamente mg. de glucosa de la diferencia de titulación entre el blanco y la muestra.

b) Determinación de la acidéz fija y volátil.-

Se separan los ácidos fijos de los volátiles haciendo un arrastre con vapor de agua. En ambas porciones se determina la acidéz con HONa 0,1 N en presencia de fenolftaleína. La acidez volátil está constituida por ácido acético y se expresa como tal. La fija puede incluir los ácidos glucónico y cetoglucónico y se expresa en g. de ácido glucónico %. Se hace un ensayo en blanco en la misma forma.

c) Determinación de ácido 5-cetoglucónico.

Su presencia se reconoce por la coloración azul verdosa que da con la orcina en medio clorhídrico, como lo indica Neuberg (1901).

Como la coloración obtenida con el medio de agua de levadura era dudosa, se comparó el color con el obtenido con ácido 5-cetoglucónico preparado por vía química, según una modificación del método de Killiani, hecha por Barch. Este ácido se disolvió en agua de levadura, se le agregó igual volúmen de HCl conc., se hirvió y agregaron unos cristallitos de orcina. El color azul así obtenido era análogo al que daban algunas cepas tratadas en igual forma.

La determinación cuantitativa del ácido 5-cetoglucónico se hizo aprovechando su poder reductor, para lo cual debe eliminarse previamente la glucosa que pudo haber quedado sin transformar. Esto se logra dejando fermentar la glucosa por acción de la levadura durante 24 horas: se toman 5 ml. de medio de cultivo en un frasco volumétrico de 50 ml., se agrega una suspensión de levadura y se deja hasta el día siguiente. Se clarifica procediendo como en el caso anterior y se determina el poder reductor como antes. Este valor corresponde al ácido cetoglucónico.

Se hace un ensayo en blanco con la suspensión de levadura sola y clarificando en la misma forma. Para probar la eficacia de la levadura se hace otro ensayo en blanco utilizando solución de glucosa en agua de levadura de la misma concentración que la de los sustratos, comprobándose la desaparición del poder reductor.

La determinación cuantitativa se efectúa en la forma que se indica en el ejemplo adjunto, teniendo en cuenta que 1 cc. de $S O Na$ 0,005 N equivale a 0,318 mg. de Cu y que, según las tablas de Bernhauer y Schön (1929), 6,07 mg. de Cu equivalen a 3,95 mg. de ácido cetoglucónico:

cc. de $S_2 O_3 Na_2$ 0,005 N gastados antes de fermentar13,0

cc. de $S_2 O_3 Na_2$ 0,005 N " después de " 14,9

cc. de $S_2 O_3 Na_2$ 0,005 N " en el ensayo en blanco .. 20,2

14,9 - 13,0 1,9 cc. $S O Na$ 0,005 N correspondientes a glucosa según la tabla equivalen a 0,332 mg. de glucosa

$$\frac{0,332 \text{ mg.} \times 50 \times 100}{5} = 332 \text{ mg.} \% = 0,332 \text{ g.} \% \text{ glucosa}$$

20,2 - 14,9 = 5,3 cc. correspondientes á ácido cetoglucónico

$$\frac{5,3 \times 0,318 \text{ mg.} \times 3,95}{6,07} = 1,095 \text{ mg. de cetoglucónico}$$

$$\frac{1,095 \times 50 \times 100}{5 \times 1000} = 1,095 \text{ g} \% \text{ de ácido cetoglucónico}$$

cc. $HONa$ 0,1 N gastados para 5 cc. de muestra 7,2

cc. $HONa$ 0,1 N " en el ensayo en blanco 1,7

$$\frac{(7,2 - 1,7) \times 0,0196 \times 100}{5} = 2,14 \text{ g de ácidos glucónico y cetogluc.}$$

$$2,14 - 1,095 = 1,045 \text{ g} \% \text{ de ácido glucónico.}$$

3) Agua de levadura con 5% de glucosa y 2% de $CO_2 Ca$

En Erhenmeyer de 150 cc. se coloca 1g de $CO_2 Ca$, se tapa con tapón de algodón y se esteriliza. Se agrega a cada 50 cc. de

una solución al 5% de glucosa en agua de levadura y se esteriliza nuevamente. Se siembra e incuba a 28-30° C. Al mes de la siembra se filtra en caliente para que el cetogluconato de calcio que puede haber cristalizado pase a la solución, se lleva a 100 cc. y en partes alícuotas se determina la glucosa y el ácido cetogluconico como antes. En otra parte alícuota se hace una determinación de la sal de calcio soluble que corresponde a gluconato y cetogluconato usando el método permanganométrico después de precipitar el calcio como oxalato en la forma que indican Kolthoff y Sandell. Cuando se forma ácido cetogluconico se observan en la solución cristales refringentes de cetogluconato de calcio. En la solución se practica también la reacción de la orcina.

Del filtrado llevado a 100 cc. se tomaron 2 cc.; al clarificar se llevó a 50 y se tomó 1 cc. para determinar el poder reductor después de fermentar.

cc. de $S_2O_3Na_2O,005 N$ gastados antes de fermentar.....19,1
cc. de $S_2O_3Na_2O,005 N$ " despues de " 20,1
cc. de $S_2O_3Na_2O,005 N$ " en el ensayo en blanco 21,1
20,1 - 19,1 = 1,0 cc. según la tabla corresponde a 0,191 mg glucosa.

$$\frac{0,191 \text{ mg.} \times 50 \times 100 \times 2}{2} = 955 \text{ mg.} \% \text{ de glucosa} = 0,955 \text{ g\%}$$

Según las tablas de Bernhauer y Schön 6,07 mg. de Cu. equivalen a 4,36 mg. de cetogluconato de calcio.

$$21,1 - 20,1 = 1,0$$

$$\frac{1,0 \times 0,318 \times 4,36 \times 50 \times 100}{6,07 \times 1000} = 1,14 \text{ g\%} \text{ cetogluconato de calcio.}$$

En 25 cc. del filtrado se determina el calcio gastándose en uno de los casos 18,5 cc. de $MnO_4K 0,1 N$.

1 cc. de $MnO_4K 0,1 N$ equivale a 0,0215 g. de gluconato de calcio.

$$\frac{18,5 \times 0,0215 \times 100 \times 2}{25} = 3,176 \text{ g. de gluconato y cetogluconato de calcio}$$

3,176 - 1,14 = 2,036 g% de gluconato de calcio.

4) Agua de levadura con 2% de glicerina.-

El medio de cultivo, constituido por agua de levadura al 10 % con el agregado de 2% de glicerina en peso, se distribuye en la cantidad de 25-30 cc. en frascos de 100-125 cc. de capacidad. Se esteriliza, siembra e incuba. Al mes de la siembra, se investiga la posible formación de dioxiacetona por la aparición de un fuerte poder reductor del Fehling en frío, como lo señalaron Hermann y Neuschul. Para confirmarlo se hizo el ensayo del α naftol para grupos cetónicos, ideado por Turner, Kress y Harrison, que es positivo con dioxiacetona, ácido pirúvico y éster aceto acético: a 1 cc. de solución se agregan 0,5 cc. de solución de α naftol recién preparada y 0,2 de KOH al 40%, se calienta hasta aparición del color azul.

Para determinar cuantitativamente la dioxiacetona formada se usó el método de W. Campbell que es una adaptación del de Folin y Wu para el caso de la dioxiacetona.

Se requieren las siguientes soluciones:

Solución 0,2 N de MnO_4K : 6,324 g. de sal pura se disuelven en un litro de agua, se deja varios días. Se filtra y titula con una solución 0,1 N de oxalato de sodio con 5 cc. de H_2SO_4 conc. en un volumen de 150 cc., a 70° C. A partir de esta se obtiene la solución 0,01 N que se renueva diariamente.

Solución de fosfomolibdato: en un vaso de 1 litro conteniendo 35 g de ácido molibdico y 5 g. de tungstato de sodio se agregan 200 cc. de agua; y 200 cc. de HONa al 10%; se hierve por 20-40 minutos

y se enfría; se diluye aproximadamente a 350 cc. y agregan 125 cc. de ácido fosfórico concentrado (85 %). Se lleva á 500 cc.

Para hacer el ensayo se usan tubos de 15 cms. de largo y en el mismo se hace la titulación.

2 cc. de la solución convenientemente diluída se hierven 15 minutos con igual cantidad de la solución ácida de fosfomolibdato y enfría. La solución azul no diluída se reoxida con solución 0,01 N de permanganato de potasio medida en una bureta graduada al 1/50 cc.

1,14 cc. de $MnO_4 K$ 0,01 N equivalen a 1/5 mg. de dioxiacetona. Partiendo de 1 cc. de medio de cultivo se gastan 23,9 cc. de permanganato de potasio 0,01 N.

$$\frac{23,9 \times 0,2 \text{ mg} \times 100}{1,14} = 0,419 \text{ g. \% de dioxiacetona}$$

III - INVESTIGACIONES EFECTUADAS-

A) Investigaciones bacteriológicas-

Se han hecho las investigaciones indicadas anteriormente con 20 cepas de bacterias acéticas, facilitadas por el Ing. Soriano del Instituto Nacional de la Nutrición. (1)

Se han obtenido los resultados que, para cada cepa se indican a continuación, agrupándose las pertenecientes a la misma especie:

1) xilynum A- (proveniente de vino)

En agar-estría forma colonias aisladas, pequeñas, secas. se arrastran dificultosamente con el anza. Por transparencia son iridescentes. Desarrollo delgado, no friable.

En cajas de agar-levadura-glucosa da colonias circulares, con borde liso, grises, secas.

En cajas de agar-levadura,-creta-3% alcohol da ácido y forma una costra dura y blanca. Idem en cajas con glucosa y creta.

En medios líquidos (agua de levadura con alcohol, glucosa o glicerina) forma una película muy gruesa que se puede separar en capas cartilaginosas, de gran resistencia. Da reacción de celulosa positiva. No enturbia el medio y da pequeño sedimento.

En ~~media~~^{vino} diluido al $\frac{1}{2}$ y al $\frac{1}{3}$ crece dando película muy gruesa. En vino diluido al $\frac{1}{2}$ produce 1,86% ácido acético a la semana y al mes ese valor cae a 0.

Desarrolla en tubos con 2-4-6-8% de alcohol etílico en agua de levadura y en 1-2-3% de ácido acético.

Acidifica el alcohol etílico, la glucosa y arabinosa. No

(1) Gentileza que agradecemos sinceramente.

acidifica la galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

Temperatura óptima: Crece con igual intensidad á 24°C y a 28°C.

No crece a 37°C.

Morfología. Son bastones algo largos, simples o a pares. No móviles

Reacción de catalasa positiva.

2) xylinum B (proveniente de vino).

En agar-estria da colonias aisladas, pequeñas, secas, se arrastran dificultosamente con el anza. Desarrollo delgado, no friable.

En cajas con agar-levadura-glucosa forma colonias circulares, borde liso o ligeramente lobado, secas, marrones.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. Lo mismo en cajas con glucosa y creta.

En medios líquidos forma película gruesa, igual á la obtenida con la cepa anterior. Da color azul con el iodo.

En vino da película gruesa que cae sin romperse. En vino diluído al $\frac{1}{2}$ da 1,62% acético ala semana y 2,16 al mes.

Resiste hasta el 8% de alcohol y no crece en 3% de ácido.

Acidifica el alcohol, la glucosa y arabinosa; no acidifica la galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

La temperatura óptima es 28°C. Crece con menor intensidad a 24°C y menor aún a 37°C.

Son bastones largos, algo curvados, simples, a pares o en cadenas cortas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

3) Cepa No. 27 (proveniente de vinagre rápido)

En agar-estria da colonias aisladas, pequeñas, secas ó untuosas.

En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias circulares, muy pequeñas, borde liso, untuosas.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbónato. En cajas con glucosa da ácido.

En medios líquidos da película gruesa que cae sin enturbiar el medio. Da la reacción de celulosa.

En vino crece dando película bastante gruesa; mayor desarrollo al $\frac{1}{2}$.

Resiste hasta el 7% de alcohol y 3% de ácido acético.

Acidifica el alcohol etílico, glucosa y arabinosa; no acidifica galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

Temperatura óptima: 24°C . No crece a 37° C.

Son bastones delgados con extremos redondeados, algunos cocobacilos, algunos curvados, aislados o en diplos. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

4) Kombucha 2-5 (proveniente de Kombucha)

En agar-estriá da colonias aisladas, pequeñas, untuosas, o secas, por transparencia iridescentes, espesor delgado. En el agua condensada se forma película.

En cajas de agar-levadura-glucosa da colonias circulares, de borde liso, marrones, con el centro más oscuro, brillantes.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. En cajas con glucosa da ácido.

En medios líquidos da película blanquecina que se rompe en grandes flocos. A veces da película gruesa semejante a la de las cepas anteriores. Da reacción positiva de celulosa.

En vino da película discontinua y lo enturbia.

Desarrolla en tubos con 10% de alcohol y con 2,5% de ácido.

Acidifica el alcohol, glucosa, arabinosa y galactosa; no acidifica sacarosa, maltosa, lactosa, glicerina ni manita.

La temperatura óptima es 28° C. y crece lentamente a 37°C.

Son bastones pequeños, algunos curvados, a pares o en cadenas ramificadas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

5) Kombucha 3-4 (proveniente de Kombucha)

En agar-estría desarrolla en puntitos muy agrupados, rosados, iridescentes, viscosos. En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias circulares, pequeñas, con borde liso, granuladas y viscosas.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y pigmento rosado. En cajas con agar-levadura-creta-glucosa da cristales muy refringentes y ácido.

En medios líquidos crece sin dar película; enturbia.

No crece en agua de levadura con 10% de alcohol; crece con 3% de ácido.

Enturbia el vino y desarrolla mejor en el diluido á 1/3.

Produce ácido en alcohol, glucosa, arabinosa, galactosa, sacarosa, manita y glicerina; no acidifica maltosa ni lactosa.

Crece con igual intensidad a 24° C y a 28° C y algo menos a 37°C.

Son bastones cortos, sueltos, a pares, algunos cocobacilos, no móviles.

6) Cepa No. 8-1 (proveniente de vino)

En agar estría forma colonias pequeñas, aisladas, mucosas, iridescentes. En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias circulares, de borde liso, marrón oscuro, mucosas.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato de calcio. Lo mismo en cajas con agar-levadura-glucosa-creta.

En medios líquidos da película tenue que por agitación se rompe y enturbia el medio, sedimento y aro. La película no da la reacción de celulosa.

En vino da película que se rompe en grandes flocos y no enturbia, da sedimento. Produce 2,52 % de ácido a la semana y 1,608 al mes en vino diluido al $\frac{1}{2}$.

Resiste hasta el 10 % de alcohol y el 3% de ácido acético.

Produce ácido en alcohol etílico y glucosa; no lo produce en arabinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

La temperatura óptima es 28°C . Desarrolla bien a 37° C.

Son bastones cortos, sueltos o a pares. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

7) Cepa No. 2-1 (proveniente del vino)

En agar estría da colonias pequeñas, aisladas, untuosas. En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias pequeñas, circulares con borde liso o ligeramente dentado, grises, algo iridescentes, untuosas.

En cajas con agar-levadura-alcohol-creta da ácido y carbonato. Lo mismo en cajas con glucosa y creta.

En medios líquidos da película delgada, turbidez y aro,

No da reacción de celulosa.

En vino da película discontinua, enturbia y asciende algo por las paredes del recipiente. Desarrolla mejor al $\frac{1}{2}$.

La temperatura óptima es de 28°C. No crece a 37° C.

Desarrolla en tubos con 2-4-6 y 8% de alcohol y en 1-2 3% de ácido.

Acidifica el alcohol y la glucosa; no acidifica la arabinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

Son bastones cortos, casi cocos, sueltos y algunos en diplos. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

8) 9-2 (Proveniente de vino)

En agar estría el desarrollo es continuo y viscoso.

En cajas de agar agua de levadura glucosada se obtienen colonias aisladas, circulares, borde liso, con el centro mas oscuro, grises y mucosas.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da sólo ácido y lo mismo en cajas con glucosa.

En medios líquidos da película discontinua, turbidez y aro. No da reacción de celulosa. En vino la película es delgada, enturbia poco.

Crece hasta en 7% de alcohol y 3% de ácido.

Acidifica el alcohol etílico, la glucosa, arabinosa, galactosa, sacarosa, glicerina y manita. No acidifica la maltosa ni la lactosa.

Crece bien a 24° C. y a 28°C. No crece a 37° C.

Son bastones cortitos, sueltos, a pares o en cadenas

cortas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

9) Cepa No. 13-2 (proveniente de vino)

En agar estría el desarrollo es continuo, viscoso, voluminoso. En cajas con levadura y glucosa da colonias circulares, con el centro más oscuro, mucosas y húmedas, marrones.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. Con glucosa y creta da ácido.

En los medios líquidos da turbidez, película delgada como velo y aro. Da color amarillo con iodo. En vino forma película tenue, que se rompe y enturbia; asciende algo por las paredes.

Resiste hasta el 6% de alcohol y el 3% de ácido acético.

Acidifica el alcohol, la glucosa, arabinosa, sacarosa, manita y glicerina, y poco la galactosa. No acidifica la lactosa ni la maltosa.

La temperatura óptima es 28°C. No crece a 37° C.

Son bastones cortos, sueltos o a pares, no móviles.

Reacción de catalasa positiva.

10) Cepa No. 119 (proveniente de vino)

En agar estría da colonias aisladas pequeñas, húmedas, de espesor delgado; por transparencia iridescentes. En cajas de agar levadura glucosa forma colonias circulares, pequeñas con borde liso o ligeramente lobado.

En cajas con agar-levadura-alcohol-creta da ácido y carbonato. En cajas con glucosa no da ácido y forma un desarrollo espeso y cremoso.

En medios líquidos da película delgada que asciende mucho y enturbia el medio. No da la reacción de celulosa. En vino crece

dando película que asciende y enturbia.

Resiste hasta el 10% de alcohol y el 3% de ácido.

Acidifica solo el alcohol; no acidifica glucosa arabinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

La temperatura óptima es 24°C.; crece algo menos a 28°C. y menos a 37°C.

Son bastones cortos, a pares o en cadenas cortas, no móviles.

Reacción positiva de catalasa.

11) Cepa No. 121 (proveniente de vinagre rápido).

En agar estría las colonias son pequeñas, circulares, aisladas, untuosas. En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias circulares, ligeramente lobadas, húmedas, grises.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. Con glucosa da muy poco ácido.

En medios líquidos la película es delgada, se rompe y asciende. Da color amarillo con iodo. En vino diluido da película discontinua que asciende y enturbia el medio.

Resiste hasta el 10% de alcohol y 3% de ácido.

De los azúcares y alcoholes ensayados sólo acidifica el alcohol etílico.

La temperatura óptima es 28° C.

Son bastones pequeños, delgados, sueltos ó en cadenas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

12) Cepa No. 28 (proveniente de vinagre rápido)

En agar estría las colonias son aisladas, pequeñas, mu-

cosas, iridescentes. En cajas las colonias son circulares, con el borde ligeramente lobado, húmedas y mucosas.

En cajas con alcohol y creta da ácido y carbonato (colonias rosadas). Lo mismo con glucosa y creta.

En medios líquidos la película es tenue y enturbia el medio en forma de gruesos copos. La película se tiñe de amarillo con iodo.

En vino da película discontinua y enturbia; desarrolla mejor en el diluido al $\frac{1}{2}$ /.

Crece hasta en 6% de alcohol y en 2% de ácido.

Acidifica el alcohol, glucosa, galactosa, lactosa y glicerina; no acidifica sacarosa, maltosa ni manita.

La temperatura óptima es 24°C.

Son bastones largos, algunos curvados, sueltos o en cadenas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

13) Cepa No. 59 (proveniente de vinagre rápido)

En agar estría da colonias pequeñas, aisladas, secas, friables. En cajas de agar-levadura-glucosa da colonias circulares, con borde liso, secas, grises.

En cajas de agar-levadura-creta-alcohol forma ácido y carbonato. En el medio con glucosa da sólo ácido.

En medios líquidos da película muy delgada, en islas. No da reacción de celulosa. Sedimento en forma de gruesos copos. En vino se forma película discontinua, en islas; no lo enturbia.

Resiste hasta el 8% de alcohol y el 3% de ácido.

Acidifica el alcohol, la glucosa, arabinosa, galactosa,

glicerina y manita. No acidifica sacarosa, maltosa ni lactosa.

La temperatura óptima es 28°C. no crece a 37° C.

Son bastones largos, algo curvos, de extremos redondeados, simples, a pares o en cadenas cortas; no móviles.

Reacción de catalasa positiva.

14) Cepa M-5-1 (proveniente de vinagre rápido)

En agar estría da colonias pequeñas, aisladas, secas, de poco espesor. En cajas las colonias son circulares, de borde liso, marrón oscuro, secas,.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato (colonias rosadas); lo mismo en cajas con glucosa y creta

En medios líquidos la película es discontinua, rugosa, asciende; da color amarillo con iodo. En vino da película muy tenue, rugosa, asciende mucho. Se rompe en grandes trozos que caen pero no enturbian; desarrolla mejor en el diluido al $\frac{1}{2}$.

Crece hasta en 8% de alcohol y 2,5% de ácido.

Acidifica el alcohol, glucosa, arabinosa, glicerina, y poco la galactosa, No acidifica sacarosa, maltosa, lactosa, ni manita.

La temperatura óptima es 28° C; no crece a 37°C.

Son bastones largos, sueltos o en cadenas, predominan los curvos. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

15) Cepa N° 78-3 (proveniente de vino)

En agar estría da colonias pequeñas, aisladas, algo viscosas, iridescentes. En cajas con agar-levadura-glucosa las colonias son circulares, oscuras, mucosa, muy pequeñas.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. Lo mismo en cajas con creta y glucosa.

En medios líquidos forma película muy delgada, sedimento y aro.; enturbia el medio. Con iodo y ácido sulfúrico da color violeta. En vino la película es tenue, apenas visible; al agitar cae y enturbia.

La mayor concentración de alcohol tolerada es 8% y la mayor acidéz 2%.

Sólo acidifica el alcohol y la glucosa.

La temperatura óptima es 28°C. No crece a 37°C.

Son bastones cortos, gruesos, sueltos y algunos en cadena, algunos hipertróficos. No móviles.

Reacción positiva de catalasa.

Cepa Nº 10-2 (proveniente de vino)

En agar estría da colonias aisladas, pequeñas, untuosas. En cajas con agar-levadura-glucosa las colonias son circulares, con borde liso, grises.

En cajas con agar-levadura-creta-alcohol da ácido y carbonato. Lo mismo en cajas con creta y glucosa.

En medios líquidos da película continua y delgada que enturbia el medio. No da reacción de celulosa. En vino da película que cae en pequeños flocos y enturbia.

Crece en tubos hasta con 8% de alcohol y 3% de acidéz.

Acidifica sólo el alcohol, la glucosa y arabinosa.

La temperatura óptima es 28°C. no crece a 37°C.

Son bastones cortos, sueltos y otro formando cadenas de dos, tres ó cuatro células; formas de evolución muy alargadas y curvas. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

17) Cepa N^o. 38 (proveniente de vinagre rápido).

En agar estría da colonias en forma de desarrollo continuo y viscoso, no friable. En cajas con agar-levadura-glucosa- da colonias grandes, circulares o ligermanete ovaladas, oscuras, con borde liso, granuladas, viscosas y filantes.

En cajas con alcohol da poco ácido y en las de glucosa da mayor cantidad de ácido.

En los medios líquidos forma película discontinua, no enturbia; da color amarillo con el iodo. En vino da pequeña película que se rompe sin enturbiarlos y asciende algo por las paredes del frasco. Da pequeña acidez.

Resiste hasta el 10% de alcohol y el 2% de ácido.

Produce ácido en alcohol, glucosa y arabinosa; no lo produce en galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina.

La temperatura óptima es 24°C. No crece a 37°C.

Son bastones largos, delgados, sueltos y algunos en cadenas de 2 o 3 y otros de a pares, algunos curvados. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

18) Cepa No. 23 (proveniente de vinagre rápido)

En agar-estria da desarrollo continuo, viscoso, voluminoso. En cajas da colonias circulares, mucosas, mamelonadas.

En cajas con levadura-creta-alcohol da ácido lo mismo que en el medio con glucosa.

En medios líquidos da película delgada, turbidéz y aro.

La película no se tiñe con el iodo. En vino da pequeña película discontinua que lo enturbia.

Crece hasta en 8% de alcohol y 2% de ácido.

Acidifica el alcohol, la glucosa, arabinosa, y sacarosa. No acidifica la galactosa, maltosa, lactosa, glicerina ni manita.

La temperatura óptima es 28°C. A 24° C crece bien pero lentamente. No crece á 37° C.

Son bastones algo largos, simples o a pares. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

19) Col 2 (proveniente de vinagre rápido.)

En agar estría forma puntitos untuosos, iridescentes. En cajas con agar-levadura-glucosa da colonias pequeñas, circulares, húmedas y mucosas, borde liso o ligermanete lobado, grises, con el borde mas oscuro.

Cajas con agar-levadura-alcohol-creta da ácido y carbonato. Lo mismo en cajas con glucosa y creta.

En los medios líquidos da película discontinua y turbidez. No da color con iodo. En vino da película en islas, que se rompe; al mes da 2,18% de ácido acético.

Acidifica sólo la glucosa y el alcohol etílico.

La temperatura óptima es 28°C. No crece a 37° C.

Son bastones cortos, bastante gruesos, sueltos o a pares. No móviles.

Reacción de catalasa positiva.

20) Cepa Col. 7 (proveniente de vinagre rápido).

En agar estría da colonias aisladas, grandes, viscosas. En cajas con agar levadura glucosa da colonias circulares, de

borde liso, grandes, mucosas, muy adheridas al agar.

En cajas de agar levadura-creta-alcohol da ácido.

En glucosa y creta da mucho ácido (halo muy extendido)

En medios líquidos da película que se rompe; no da reacción de celulosa. En vino da película discontinua y no enturbia.

Crece en tubos hasta con 8% de alcohol y 3% de ácido.

Acidifica el alcohol y la glucosa; no acidifica la arabinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, glicerina ni manita.

La temperatura óptima es 28° C. No crece a 37°C.

Son bastones cortos, casi en forma de cocos, sueltos o a pares. No móviles.

Reacción positiva de catalasa.

B) INVESTIGACIONES QUÍMICAS -

Con las mismas cepas se han hecho las investigaciones químicas ya indicadas, llegándose á los resultados que se consignan en las planillas adjuntas.

1) Agua de levadura con 2 % de alcohol etílico.-

(los valores anotados eständ ya corregidos con el ensayo en blanco que gastó 0,4 cc. de HONa 0,1 N por cada 10 cc. muestra)

Cepa	Tiempo (días)	cc. HONa 0,1 N para 10 cc. muestra	G. ácido acético %
xylinum A	8	6,0	0,30
	13	24,2	1,45
	17	38,5	2,31
	24	33,2	1,99
	30	30,1	1,80
	36	31,0	1,86
	42	32,3	1,93
	50	33,1	1,99
xylinum B	8	6,0	0,36
	13	14,1	0,85
	17	24,4	1,46
	24	31,0	1,86
	30	26,2	1,57
	36	27,9	1,67
	42	27,0	1,62
	50	27,0	1,62
Nº. 27	8	4,6	0,27
	13	4,8	0,28
	17	33,6	2,01
	24	26,0	1,56
	30	4,5	0,27
	36	5,0	0,30
Kombucha 2-5	8	15,1	0,9
	13	43,0	2,58
	17	43,4	2,60
	24	43,3	2,59
	30	43,0	2,58
	36	43,0	2,58
	42	43,3	2,59

Cepa	Tiempo (días)	cc. HONa 0,1 N para 10 cc. muestra	g. ácido acético %
Kombucha 3-4	8	6,9	0,41
	13	5,3	0,32
	17	11,0	0,84
	24	21,5	1,29
	30	24,8	1,49
	36	27,9	1,67
	42	25,2	1,44
	50	23,2	1,41
Nº 8-1	8	4,6	0,27
	13	37,8	2,27
	17	36,0	2,16
	24	20,0	1,20
	30	22,7	1,36
	36	21,8	1,30
	42	19,2	1,15
	50	20,0	1,20
Nº 2-1	8	2,4	0,14
	13	5,6	0,33
	24	22,8	1,37
	30	28,0	1,68
	36	22,0	1,32
	42	16,0	0,96
	50	13,9	0,83
Nº 9-2	8	3,8	0,028
	13	3,0	0,18
	17	5,0	0,30
	24	6,0	0,36
	30	7,1	0,42
	36	7,0	0,42
Nº 13-2	8	4,4	0,284
	13	3,8	0,228
	17	5,0	0,3
	24	31,0	1,86
	30	7,0	0,42
Nº 119	8	7,0	0,42
	13	40,2	2,41
	17	43,0	2,60
	24	32,6	1,95
	30	31,4	1,88
	36	31,4	1,88
	42	33,1	1,98
	50	32,9	1,94

Cepa	Tiempo (días)	cc. HONa 0,1 N para 10 cc. muestra	g. ácido acético %
Nº. 121	8	12,0	0,72
	13	29,5	1,77
	17	37,4	2,24
	24	25,0	1,50
	30	22,7	1,36
	36	22,7	1,36
	42	25,3	1,52
	50	18,3	1,09
Nº. 28	13	5,2	0,31
	17	9,3	0,52
	24	11,2	0,67
	30	26,0	1,56
	36	27,0	1,62
	42	24,5	1,47
	50	21,8	1,31
Nº. 59	8	8,0	0,18
	13	3,1	0,186
	17	4,8	0,288
	24	17,0	1,02
	30	neutro	-
M-5-1	8	3,8	0,228
	13	3,8	0,228
	17	9,2	0,552
	24	8,0	0,480
	30	7,0	0,48
	35	11,0	0,66
	42	14,0	0,84
	50	15,0	0,90
Nº. 78-3	8	6,0	0,36
	13	5,4	0,324
	17	3,4	0,24
	24	5,3	0,32
	30	10,0	0,60
	35	11,0	0,66
	40	12,0	0,72
	50	11,0	0,66
Nº. 10-2	8	5,7	0,342
	13	7,0	0,42
	17	7,4	0,444
	24	13,5	0,81
	30	11,0	0,66

Cepa	Tiempo (días)	cc.HONa 0,1 N para 10 cc. muestra	g. ácido acético
Nº. 38	8	5,9	0,354
	13	2,2	0,132
	17	7,0	0,42
	24	7,0	0,42
	30	7,1	0,426
Nº. 23	8	4,6	0,276
	13	4,5	0,27
	17	7,4	0,444
	24	13,0	0,78
	30	18,0	1,08
	36	17,9	1,06
	42	22,0	1,32
Nº. Col 2	8	3,2	0,192
	13	2,6	0,156
	17	3,8	0,228
	24	10,0	0,6
	30	10,2	0,61
Col 7	7	3,3	0,198
	14	4,1	0,246
	20	8,0	0,48
	25	8,5	0,51
	30	8,5	0,51
	40	9,0	0,54

2) Agua de levadura con 2% de glucosa.

Cepa	Tiempo meses	Orcina	g. glucosa restante	G. ácido glucónico	g ác. ceto glucónico	g. ácido acético
xylinum A	1½	+	0	1,75	0,310	-
xylinum B	1	+	0,332	1,045	1,095	-
	3	+	0	0,12	2,85	-
Nº. 27	1	-	1,095	1,29	-	-
	3	+	0,067	0	1,88	-
Kombucha 2-5	1	-	0,332	2,038	-	-
	3	-	0,086	2,06	-	-
Kombucha 3-4	1	-	0,332	1,68	-	-
	3	-	0,125	0,91	-	-
Nº. 8-1	1½	→	0,105	1,64	-	0,4
Nº. 2-1	1	-	1,368	0,66	-	-
	3	-	0,263	1,11	0,682	-
Nº. 9-2	1	-	0,698	1,68	-	-
	3	+	0,067	1,146	0,774	-
Nº. 13-2	1	+	0,357	0,709	0,661	-
	3	+	0	1,209	0,581	-
Y						
Nº. 119	1	-	2,035	0	-	-
	3	-	2,022	0	-	-
Nº. 121	3	-	1,889	0	-	-
Nº. 28	1	-	0,622	1,68	-	-
	3	+	0	1,293	0,827	-
Nº. 59	1	+	0	1,96	0,620	-
M-5-1	1	-	0,493	1,96	-	-
	3	-	0,502	1,96	-	-
Nº. 78-3	1	-	1,084	0	-	-
	2	-	0,382	0,196	-	-
Nº. 10-2	1	-	1,813	0	-	-
Nº. 38	1	-	0,382	1,96	-	0,42
	3	-	0,173	2,038	-	-
Nº. 23	1	-	1,502	0,196	-	-
	3	+	0,558	0,163	0,537	-

Cepa	Tiempo meses	Orcina	G.glucosa restante	g. ácido glucónico	g.ac. ceto glucónico	g. ácido acético.
Col. 2	1	-	1,558	0,31	-	-
	3	-	1,224	0,43	-	-
Col. 7	1½	-	0,571	1,64	-	-

3) Agua de levadura con 5% de glucosa y 2% de CO₂Ca-

Los ensayos se hicieron al mes de la siembra, con excepción de las cepas Col 2 y Col 7 que se investigaron a los 2½ meses.

cepa	R. de Orcina	g.glucosa restante	g.gluconato de calcio	g.cetogluconato de calcio
xylinum A	+	0,955	2,036	1,14
xylinum B	+	0,71	0,81	2,28
Nº.27	-	1,66	3,51	-
<hr/>				
Kombucha 2-5	-	0,71	5,24	-
<hr/>				
Kombucha 3-4	+	1,23	2,895	1,025
<hr/>				
Nº. 8-1	-	0,625	4,902	-
Nº. 2-1	-	3,235	1,37	-
<hr/>				
Nº. 9-2	+	1,31	1,540	0,570
Nº.13-2	-	2,305	2,20	-
<hr/>				
Nº. 119	-	3,565	1,17	-
Nº. 121	-	2,17	0,326	-
<hr/>				
Nº. 28	-	1,05	4,61	-
<hr/>				
Nº. 59	+	1,66	2,517	1,25
Nº. 5-1	+	0,625	0,174	0,342
<hr/>				
Nº. 78-3	-	4,77	0,344	-
Nº. 10-2	-	3,49	0,31	-
<hr/>				
Nº. 38	±	0,71	4,61	-
<hr/>				
Nº. 23	+	0	0	2,16
<hr/>				
Col 2	+	1,47	1,441	0,799
Col 7	+	0,86	0	3,31

4) Agua de levadura con 2% de glicerina.-

Cepa	Tiempo meses	Reducción del Fehling	g. dioxiacetona
xylinum A	1½	+	0,419
xylinum B.	1½	-	-
Nº.27	1½	+	0,165
Kombucha 2-5	1½	-	-
Kombucha 3-4	4	+	0,524
Nº. 8-1	1½	-	-
Nº. 2-1	1½	-	0,49
Nº. 9-2	1½	+	0,212
Nº 13-2	1½	+	0,346
Nº.119	2	-	-
Nº.121	1½	-	-
Nº. 28	1½	+	0,438
M-5-1	1½	-	-
Nº. 59	1½	+	0,459
Nº.78-3	1½	-	-
Nº.10-2	1½	-	-
Nº. 38	1½	-	-
NO. 23	1½	+	0,396
Col 2	4	+	0,520
Col 7	4	+	0,412

C) IDENTIFICACION DE LOS CULTIVOS ESTUDIADOS. -

Como no existe una clave completa para la identificación de las especies de este género, se ha procedido en la siguiente forma:

Se han dividido en I) dan película gruesa y color con iodo: Ac. xylinum y en algunos casos el Ac. xylinoides.

II) Dan película delgada que cae y color con iodo: Ac. pasteurianum, Ac. kützingianum y Bact. acetigenum.

III) Da película firme y coherente y no se tiñe con iodo: Ac. orleanense.

IV) Da película delgada que asciende y enturbia: Ac. ascendens, Ac. oxydans, Ac. industrium y Thermobacterium acetii (Zeidler).

V) Dan película delgada, poco firme y no asciende: Ac. acetii, Ac. vini acetati, Ac. curvum, Ac. schützenbachii, Ac. suboxydans.

VI) No da película : Bact. gluconicum.

Dentro de estos grupos, se ha completado la identificación con la observación de los caracteres de cultivo, morfología, fermentación de azúcares y relaciones de temperatura.

Se han podido identificar así, las especies que figuran a continuación:

- 1) Acetobacter xylinum: Las cepas xylinum A y xylinum B y NO° 27 han sido identificadas con esta especie, a excepción de que no acidifica la galactosa, sacarosa, lactosa, glicerina ni manita y según Henneberg los debe acidificar, pero poco la manita. Sin embargo, Hermann y Neuschul encontraron que no acidifica la manita y acidifica poco la sacarosa y glicerina.

El Ac. xylinum fué aislado por Brown en 1886 obteniendo cultivos puros por combinación de los métodos de fraccionamiento de Keebs y de dilución de Nägeli, usando como medio nutritivo

vino rojo diluido con la mitad de su volúmen de agua y acidifican- do con 1% de ácido acético. Cuando el cultivo es puro Brown ob- servó que cuando empieza a crecer en un líquido favorable, aparece primero como una masa gelatinosa translúcida en la superficie del líquido, la membrana aumenta de espesor y puede alcanzaf a veces a 25 mm., es más pesada que el agua y cae por agitación, obser- vándose entonces la formación de otra capa arriba de la anterior; se pueden formar así 5 o 6 capas y cuando se observa lateralmente aparece estriada. Es blanca y translúcida y toma algo del color del líquido en soluciones coloreadas. Si se la intenta romper a través de su plano de crecimiento, se ve que es muy resistente, mientras que paralelamente a él es fácil dividirla en un número de capas que representan las etapas sucesivas de crecimiento.

Cuando crecen en gelatina sólida y mosto de malta se forman colonias esféricas sólo en la superficie o muy cerca de dl ella; Las colonias que crecen en la superficie gradualmente se desparraman en una película semejante a la que forman en los medios líquidos. No licúa la gelatina.

Variando la composición química de los medios de cultivo (100 medios diferentes) obtuvo siempre la misma forma membranosa mientras que con cultivos puros de Bact. acetí sólo obtuvo una película delgada que se rompe con la menor agitación y se desin- tegra con solución fría de potasa; la madre del vinagre puede ser hervida varias horas sin cambio apreciable. Esta última da la reacción de celulosa, es decir, se colorea de azul oscuro con iodo y ácido sulfúrico concentrado mientras que la del Bact. acetí no la da, demostrando que son dos organismos distintos.

Al microscopio se ve que la membrana está formada por

bastones de 2μ de largo y ordenados en línea recta, a menudo unidos entre sí por una capa transparente. En cultivos viejos se observan también micrococos de $0,5\mu$ de diámetro. Cuando crecen en agua de levadura forman cadenas de $10-50\mu$ de largo; no da formas hinchadas. La temperatura óptima es de 28°C ; a más de 36° se resiste a crecer pero sigue viviendo.

Estudió el comportamiento químico de la membrana y por las reacciones obtenidas y la composición centesimal encontró que era semejante a la celulosa del algodón.

Usando solución mineral de Pasteur con alcohol, glucosa, sacarosa ó almidón vió que la madre del vinagre solo desarrolla en la que contiene glucosa porque sólo puede sintetizar celulosa á partir de ella. En esto se diferencia de los demás organismos que sólo transforman la glucosa en ácido glucónico fijando el oxígeno del aire. Al mismo tiempo que crece la membrana celulósica se forma ácido glucónico.

Transforma el alcohol en ácido acético el cual es completamente quemado. Para comprobar si el alcohol toma parte en la formación de la membrana celulósica, sembró en agua de levadura sola y con 4% de alcohol, obteniéndose en ambos casos el mismo peso de celulosa; en la solución alcohólica se formó 1,20 g de ácido acético.

Posteriormente Barsha y Hibbert estudiaron las membranas sintetizadas por el Ac. xylinum en levulosa y glicerina y encontraron que daban los mismos productos de acetilación, metilación, acetólisis e hidrólisis que la celulosa del algodón l que también confirmaron analizando con rayos X las membranas formadas en medios con glucosa, levulosa, glicerina, sacarosa,

galactosa y manita.

Henneberg establece en sublibro que las colonias en agar mosto de malta son húmedas y brillantes, marrón, amarillentas, circulares con el centro levantado y la superficie algo granulada. Después de dos semanas á 30° se elevan 2 mm. En el agua condensada, en los tubos de agar estriá se forma una película blanquecina, tenaz. En cerveza gelatina sin azúcar, el crecimiento es amarillo, muy delgado y poco viscoso; agregando sacarina al 10% aumenta y es más viscoso.

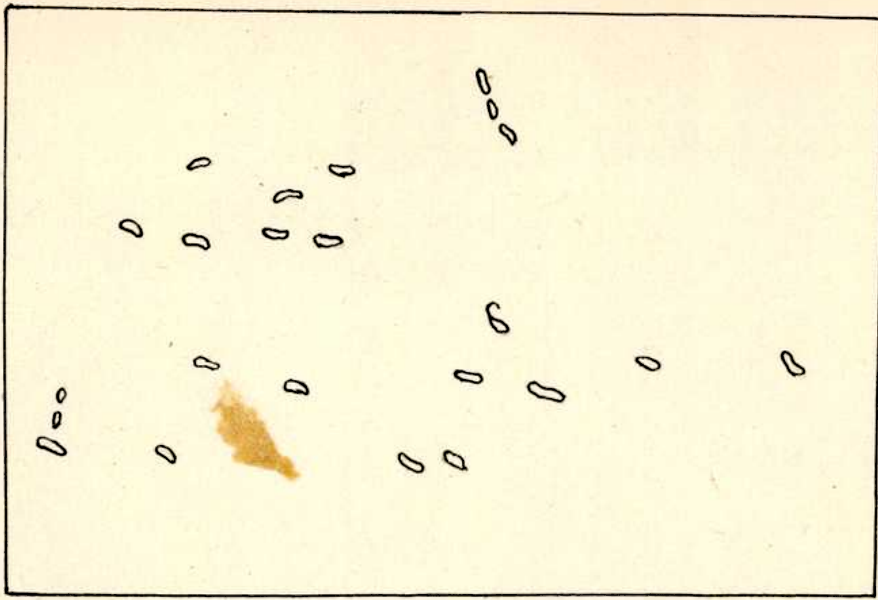
La descripción de la película coincide con la de Brown.

Las células son cortas, o bastones largos o como hilos. Una característica es la ordenación en espiral o en forma de filamentos ordenados irregularmente; también se encuentran cadenas de distinta longitud. En cultivos en gota pendiente de mosto de malta con alcohol se observan bastones largos y angostos, rectos o más o menos curvos, parecidos al Bac. Delbrüki. A veces filamentos largos y delgados en forma de paquete. No móviles.

En cuanto al comportamiento bioquímico, da 1,05% de ácido glucónico á partir de 12% de glucosa. Oxida en gran parte la manita; transforma la sorbita en sorbosa y la glicerina en glicerosa.

Según Hermann y Neuschul en agua de levadura con 5% de glucosa se forma a los 3½ meses, 0,10 g. de ácido acético, 3,26 de glucónico y 1,05 de cetoglucónico. Con alcohol en agua de levadura se forma ácido acético que luego se sobreoxida completamente.

Según Henneberg la mayor cantidad de alcohol que resiste es 6-7 % en volúmen y la mayor cantidad de acético formada es



Ac. xylinum (xylinum A) 1500 A



Ac. xylinoides (Kombucha 2-5) 1500 A

4,5%. Sólo si la formación de ácido es lenta, se produce sobreoxidación.

Fred, Peterson y Anderson encontraron que el ácido arabónico y xilónico que se forma a partir de las pentosas correspondientes, se transforma en CO₂, alcohol y acetona y que la cantidad de estos compuestos aumenta con la edad del cultivo.

No tiene importancia en la fabricación del vinagre por sobreoxidar el ácido acético y producir sustancias de olor desagradable.

Fué aislada también del Kombucha por Hermann en 1927.

-2) Ac. xylinoides: La cepa Kombucha 2-5 fué identificada con esta especie, con la diferencia de que el Kombucha 2-5 no acidifica la sacarosa, maltosa, lactosa, manita ni glicerina y el Ac. xylinoides según Henneberg acidifica poco la x lactosa y manita y mucho la sacarosa, maltosa y glicerina. Por otro lado Hermann y Neuschul no encontraron acidificación en maltosa y lactosa y poca acidificación en glicerina y manita.

Fué aislada del vinagre de vino por Henneberg quien la llamó Bact. xylinoides del griego: de madera. Posteriormente, en 1927 Hermann la asiló del Kombucha.

Aquel investigador obtuvo en malta gelatina colonias aisladas, transparentes, más oscuras en el centro; el crecimiento no es ni mucoso ni filamentoso, En estría de malta de gelatina es primero como gotas de agua y luego blanquecino. En cerveza gelatina con o sin sacarosa da crecimiento continuo, húmedo y brillante, marrón amarillento. Las colonias pueden variar desde muy secas hasta húmedas y viscosas, dependiendo de la temperatura.

La película también varía; puede ser muy delgada como

papel de seda ó voluminosa y viscosa o gruesa como la del Bact. xylinum; En este caso da la reacción de celulosa. La película semejante a la del Bact. xylinum se obtiene regularmente en agua de levadura con arabinosa, galactosa, levulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, o manita; a veces en cerveza y mosto de vinagre. En el borde del frasco ~~se~~ se forma a menudo un anillo ancho y blanco. A veces la película es tan poco coherente que enturbia el líquido.

Se distingue del Bact. xylinum por dar en colonias en agar mosto de malta una cubierta incolora, viscosa y en algunos puntos marrón amarillenta mientras aquél da una cubierta muy seca marrón amarillenta.

Las células pueden ser redondas de $0,5-0,8\mu$ o largas, de $0,5 \times 1,2\mu$, rectas o curvas, simples a pares o en cadenas en forma de huevo y pocas veces hinchadas. En agar mosto de malta las células son mas cortas, casi redondas; en cultivos de dos meses hay pequeñas células en forma de clavaz. No móviles .

La temperatura óptima es de 28° C; crece poco a 14° y 35°

En cuanto al comportamiento bioquímico, Hermann y Neuschul encontraron que en glucosa al 5% se forma 4,43 g. de ácido glucónico y 0,51 de cetoglucónico, mientras que en presencia de $\text{CO}_3 \text{Ca}$ se forma 2,7 g. de cetogluconato. Con 2% de alcohol se obtiene al mes 1,31 g. de acético que en tres meses y medio desciende a 0,5.

Como característica de esta especie, Takahashi y Asai (1933 b) obtuvieron pequeñas cantidades de ácido kójico a partir de levulosa y manita.

- 3) Acetobacter gluconicum: La cepa Kombucha 3-4 ha sido identificada como esta especie.

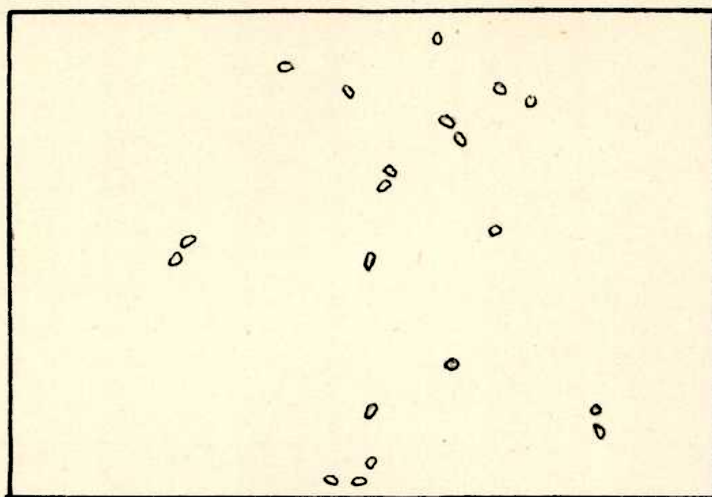
Fué aislada por Hermann del Kombucha y la llamó Bact. gluconicum por dar mucho más ácido glucónico que las demás especies. Las colonias en agar mosto de malta, agar cerveza, o en cerveza o malta gelatina son circulares, de 1 mm. de diámetro, untuosas y en algunos días se vuelven encarnadas. En medios líquidos no da película, y en el fondo se observa un sedimento encarnado.

Crece a temperatura ambiente y hasta un máximo de 37,5°.

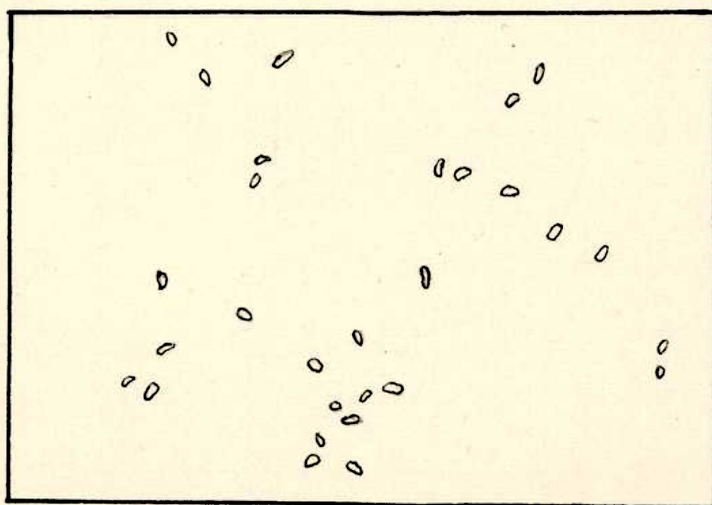
Al microscopio aparecen en diplos, a veces semejantes a diplococos. Miden 0,6-0,8 μ de largo. Son móviles. No se han observado formas de involución ni en cultivos crecidos a 4D,5° ni con agregado de sales, ni en cultivos viejos. Son Gram-. No dan esporas. Ni las células vivas ni las muertas, dan color con iodo.

Partiendo de una solución de 40% de glucosa obtuvo 23% de ácido glucónico. La especie que le sigue en la cantidad de ácido formada es el Bact. Industrium (16,6 g%). La mayor cantidad de ácido que forma en cerveza con alcohol, es 1,695 g%. La mayor cantidad de alcohol en mosto de malta que puede acidificar es 9 vol. por ciento.

En un trabajo posterior (1929 b) estudió las diferencias con el Ac. xylinum y el Ac. xylinoides que se encuentran también en el Kombucha. En agua de levadura con gluconato de calcio el Bact. gluconicum transforma el 70% en cetogluconato, mientras el Bact. xylinum sólo oxida el 16,5 %; éste no oxida el ácido glucónico libre, mientras aquél oxida hasta el 80% a cetoglucónico. Con levulosa el Bact. gluconicum forma mucho ácido acético, mientras el Bact. xylinum casi no la acidifica.



Ac. gluconicum (Kombucha 3-4)
1500 A



Ac. aceti (cepa № 8-1)
1500 A

Hermann y Neuschul (1931) partiendo de 5% de glucosa obtuvieron 3,54 g. de glucónico y 0,36 g. de cetoglucónico. En presencia de CO₃ Ca se obtenía 3,93 g % de cetoglucónico. Con 2% de glicerina se forma 1,25 g% de dioxiacetona.

Los mismos autores en 1934 observaron un aumento en la formación de ácido galactónico con inoculaciones sucesivas de Bact. gluconicum en galactosa: en la 1^a inoculación se formó 1% de ácido galactónico en una semana, en la 2^a., en las mismas condiciones 4,2% y el aumento continúa según una curva parabólica. Proponen este método para diferenciarlo de otras especies.

Bernhauer e Irrgang, inoculando Bact. gluconicum en gluconato de calcio con pequeña cantidad de 5cetogluconato, obtuvieron una sal de calcio soluble y reductora que por su reacción con naftoresorcinol clorhídrico coincidía con el d-aldehído gluconato de calcio.

Posteriormente Bernhauer y Gorlich encontraron que se formaba además ácido 2 cetoglucónico y lo aislaron como sal de potasio cristalizada y lo identificaron con el metil éster y el quinoxalin derivado.

- 4) Acetobacter aceti. Coinciden con la descripción de esta especie las cepas N^o. 8-1 y 2-1.

Ha sido descrito por varios autores, quienes le dieron diferentes nombres:

Kützing: Ulvina aceti (1837?); Thompson: Mycoderma aceti (1852)
Nägeli: Umbina aceti (1857?); Lanzi: Bacterium aceti (1876);
Saccardo: Torula aceti (1878); Trevisan: Bacteriopsis aceti;
Hansen: Bacterium aceti (1879); Maggi: Micrococcus aceti (1886)
Schröter: Bacillus aceti (1886) Flügge: Bacillus aceticus (1886)

del latín acetum, vinagre.

Fué aislado de la cerveza por Hansen (1879 a). Brown (1886 a), lo describe como un organismo de 2 de largo, estrechado en el centro en forma de ocho, a veces están divididos y parecen micrococos, pudiéndose encontrar ambas formas en la misma cadena; las cadenas son de la misma longitud. Estas formas se encuentran en la película que aparece en la superficie de los medios fluidos, pero en el fondo del vaso, especialmente en los cultivos viejos, se encuentran formas anormales, de 10 - 15 de largo y a veces aparecen hinchadas en distintos lugares de la cadena. Las formas normales son móviles y las anormales, no. La película se tiñe de amarillo con iodo y se desintegra con potasa cáustica diluída o ácido sulfúrico conc., es bastante grasienta y en cultivos jóvenes asciende por las paredes húmedas. En solución de Pasteur con glucosa es poco visible y en vino diluído es bastante gruesa y resistente; por agitación se rompe y cae enturbiando el líquido y si se deja en reposo forma mucho sedimento.

Según Henneberg la película es húmeda y viscosa, abundante jaspeada, con partes claras y oscuras que se cambian alternativamente. Por agitación se rompe. No asciende por las paredes.

El borde de las colonias en malta gelatina es finamente dentado. Las células pueden estar aisladas o en cadenas: miden 0,4-0,8 x 1,2 μ . No móviles. A 40° C se obtienen formas filamentosas y en cultivos viejos, en forma de pera. Hansen encontró formas ramificadas.

Brown partiendo de soluciones de alcohol etílico al 5% en agua de levadura a 28°C, obtuvo a los 10 días 1,025 g de ácido volátil, demostrando que era acético por transformación en sal

de bario. Con glucosa obtuvo como único producto ácido glucónico y lo reconoció por el análisis elemental..

Según Henneberg la mayor cantidad de ácido glucónico formada es 2,6% partiendo de glucosa al 10%. La mayor concentración de glucosa que resiste es 35% y la mayor concentración de alcohol, 11%, siendo 6,6 la mayor cantidad de ácido acético observada; sobreoxida al ácido.

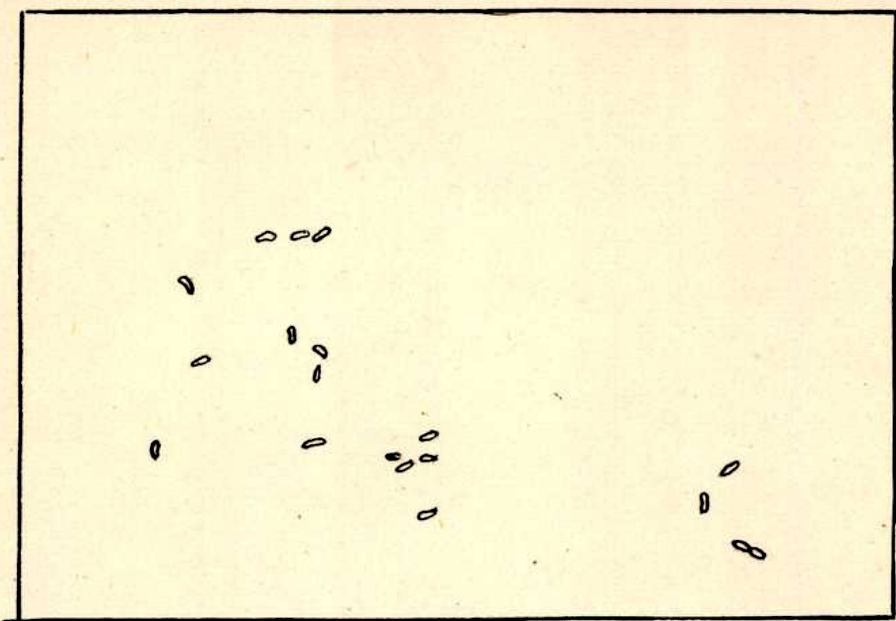
La temperatura óptima es de 34°C.; la máxima 42° y la mínima, 4° C.

Hermann y Neuschul (1931), encontraron que el Bact. acetii (Hansen) da 4,13 g.% de ácido glucónico y 0,27 de cetoglucónico, con una solución de glucosa al 5% ; en presencia de CO₃ Ca, 3,5 g% de cetogluconato de calcio. Con 2% de glicerina da 1,89 g% de dioxiacetona y acidifica la galactosa, mientras que el Bact. acetii (Henneberg) da muy poco cetoglucónico, no da dioxiacetona y no acidifica la galactosa.

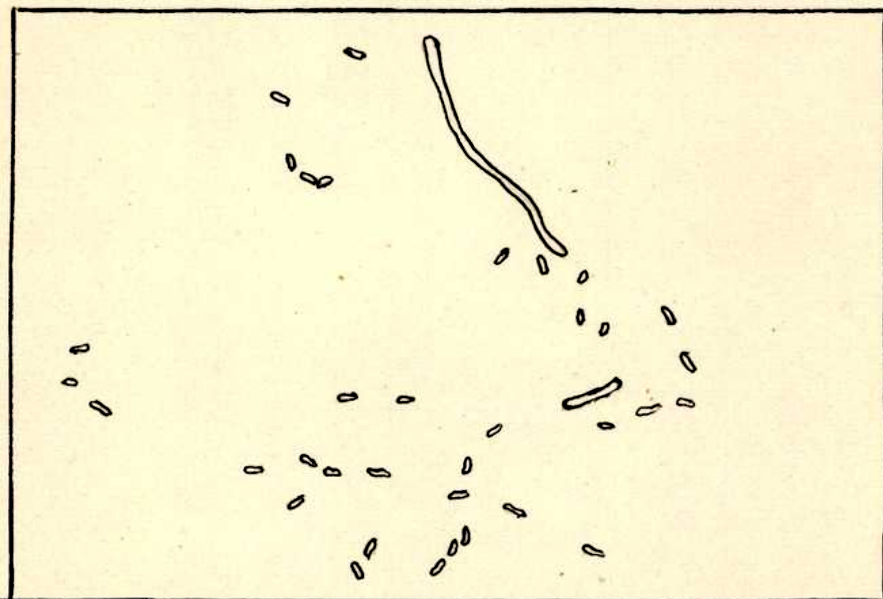
- 5) Acetobacter Vini acetati: Las cepas 9-2 y 13-2 coinciden con la descripción de esta especie.

Fué aislado por Henneberg en una fábrica de vinagre de Berlín y lo llamó Bact. vini acetati, del vinum, vino y acetum vinagre.

En gelatina o agar con mosto de malta las colonias son circulares, húmedas y brillantes, translúcidas y con sedimento blanquecino en el centro. En estria de mosto de malta-gelatina el crecimiento es continuo, transparente, luego aparece un sedimento blanquecino, después una masa blanca. En carne-gelatina es blanco, viscoso y transparente lo mismo que en cerveza-gelatina con o sin sacarosa.



Ac. vini acetati (cepa 13-2)
1500 A



Ac. ascendens (cepa № 119)
1500 A

La película es muy delgada y no muy coherente, cae como polvo al menor movimiento enturbiando el líquido. En malta con 3% de alcohol es grasienda, amarilla y muy fina. En agua de levadura con sacarosa da poca película y mucha turbidez. En los mostos de vinagre es primero muy delgada, marrón, húmeda y brillante y con el tiempo ennegrece; sube algo por las paredes.

Las células son redondas, cortas o en forma de huevo, rara vez son largas ($0,3-0,8\mu \times 0,8-2\mu$). Solas, a pares o en cadenas de 3 células. En cultivos viejos las células son redondas y pequeñas y en cerveza-gelatina con 10% de sacarosa tienen forma de huso. No hay formas hipertróficas características. No móviles. No se colorea con iodo.

Es menos usada que el Bact. xylinoides y el Bact orleanense para la fabricación del vinagre por la delgadez de la película.

Acidifica la arabinosa, levulosa, glucosa, galactosa, sacafosa, rafinosa, alcohol etílico, propílico, glicerina y manita. Por otro lado Hermann y Neuschul (1931) encontraron acidificación sólo en arabinosa, glucosa, galactosa, alcohol etílico y propílico. Con 5% de glucosa encontraron 1,96 g de ácido glucónico y en presencia de $CO_3 Na_3$ 5,87 g de gluconato de calcio. Sobreoxida el ácido acético y no da dioxiacetona con glicerina.

-6) Ac. ascendens (Las cepas N° 119 y 121 fueron identificadas con esa especie.

Fué aislada del vinagre turbio por Henneberg en 1898. Las colonias en mosto gelatina son circulares, blancas, bastante lisas. En estría son bastante secas y poco brillantes.

La película es muy delgada y sube mucho por las paredes

hasta 8 cm.; se rompe muy pronto, cae en flocos y enturbia. Es una enfermedad del vinagre.

En la película hay células aisladas o a pares y a veces en largas cadenas. Miden 1,8-2 x 1,2-1,6 μ . En agua de levadura se encuentran formas hipertróficas muy alargadas, a veces en forma de clavos anchos y con ramificaciones laterales. A 41°C., en agar, se encuentran formas de filamento. En cultivos viejos de gelatina y cerveza, células alargadas. No móviles. No se colorean con iodo.

Temperatura óptima: 31°C; máxima 44°C y mínima, 10°C.

Crece bien en cerveza, mosto con alcohol y vino. En medios sintéticos crece sólo con agregado de alcohol. Crece con 35% de glucosa en malta pero no la acidifica. Acidifica sólo el alcohol etílico, propílico y glicol.

La mayor cantidad de ácido observada es de 9% y la mayor concentración de alcohol a la que todavía oxida, 12%. Con poca cantidad de ácido se observa sobreoxidación.

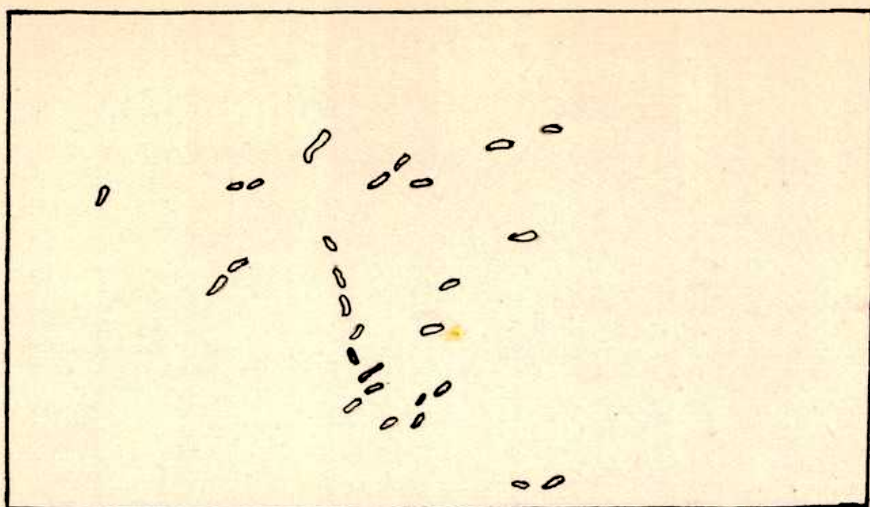
Hermann y Neuschul no encontraron acidificación en ningún azúcar ni formación de dioxiacetona a partir de glicerina.

Se encuentra en el vinagre y en el vino rojo. No se usa en la fabricación del vinagre por la turbidez que produce.

-7) Ac. schützenbachii: La cepa N° 28 ha sido identificada con esta especie.

Fue aislado por Henneberg del proceso del vinagre rápido y lo llamó Bact. schützenbachii por Schützenbach, el inventor del proceso rápido.

Las colonias en agar mosto de malta son circulares, brillantes, con el centro marrón amarillento, En carne gelatina



Ac. schutzenbachii (cepa N:28)
1500 A



Ac. curvum (cepa M-5-1)
1500 A

el crecimiento es abundante, brillante y húmedo. Las colonias en agar mosto de malta ó en cerveza son aisladas, pero pronto se reúnen en una sola masa.

En medios líquidos la película es casi siempre poco firme y coherente; se observan islas redondas y aisladas que luego se unen y caen como polvo. El comportamiento de la película varía con el cultivo, la temperatura y la edad. En malta con 3% de alcohol es bastante continua, grisácea; á veces se ven trozos de película coloreados en forma diferente (una película gris brillante al lado de otras blanquecinas ó amarillentas). En agua de levadura con sacarosa da muchas turbidez.

Las células son redondas, alargadas o en forma de huevo, solas, a pares o en cadenas. No móviles. No se colorean con iodo.

La temperatura óptima es de 25-27°C. Crece poco a 34-35° C. y á 13-15°C. No crece a 37° ni a 7,5°.

La mayor cantidad de ácido que puede producir es 11,5 %. Oxida el ácido acético a CO₂ y H₂O.

Acidifica arabinosa, levulosa, glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, alcohol etílico, propílico y glicerina y poco la sacarosa y rafinosa.

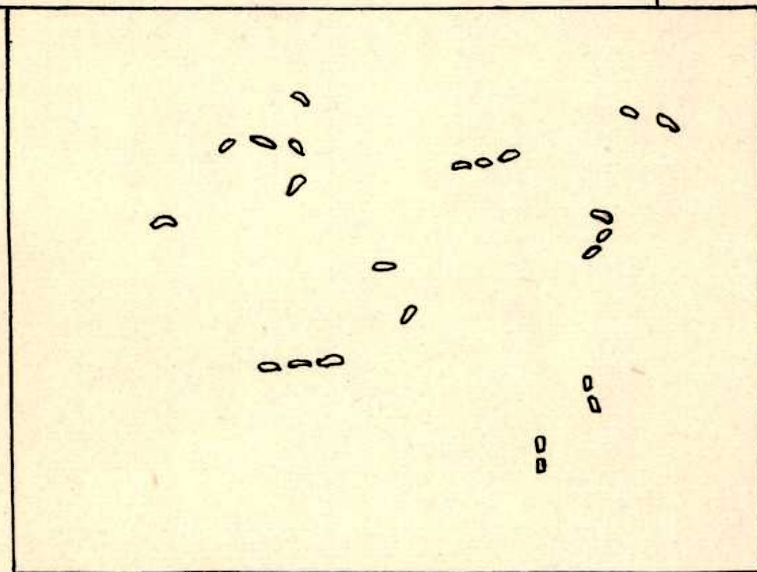
-8) Ac. Curvum: Las cepas N° 59 y M-5-1 coinciden con la descripción de esta especie difiriendo la M-5-1 en que no acidifica la manita.

Aislado por Henneberg del vinagre rápido en 1906, recibió el nombre de Bact. curvum, del latín curvum: curvo.

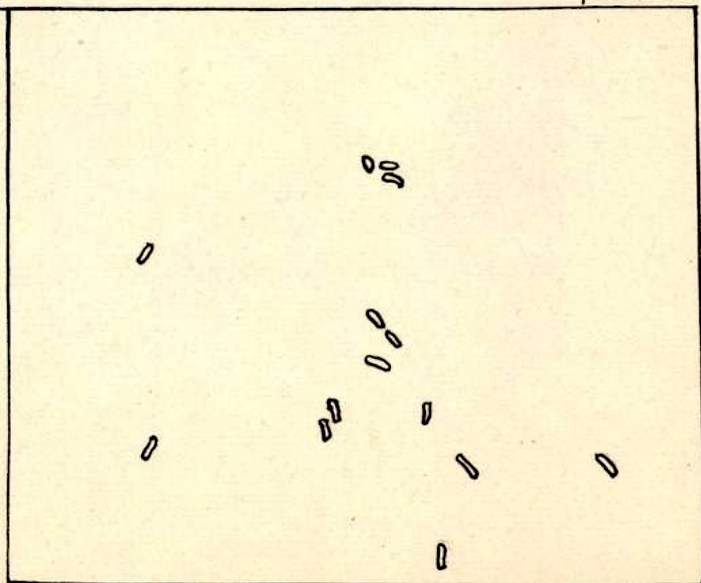
En malta gelatina da colonias circulares, transparentes, con el borde y el centro levantado, a veces blanquecinas y se cas. El crecimiento no es abundante, es blando y no tenaz. En cerveza-gelatina, son grises, algo granuladas, brillantes. En agar mosto



Сера № 10-2 1500 А



Сера № 23 - 1500 А



Сера № 38 - 1500 А.

de malta son húmedas o secas, como gotas de agua, blancas ó marrón amarillentas. Al mes se vuelven viscosas.

La película en medios líquidos muestra la poca coherencia característica de las bacterias del vinagre rápido. En malta con 3% de alcohol da islas blancas, aisladas redondas, las que al mover el frasco se adhieren a las paredes. En el nivel del líquido queda un anillo de bacterias. En cerveza da en dos semanas película delgada, brillante, blanquecina, sin coherencia y más tarde el espesor llega a 1 mm. y se hace homogénea y transparente.

Las células son redondas, en forma de huevo o alargadas con extremos redondos o en punta; miden 0,4-0,5 x 2-2,4 μ . Es característica la forma más o menos curvada de las células; entre las células cortas y las largas se encuentra toda la gama posible y también células en forma de filamentos, simples, de a 2 o más. Las células aisladas tienen color heterogéneo, a veces son muy oscuras y otras veces son sólo oscuras en el centro o en los extremos, lo que también se observa con el Ac. schüzembachii.

No son móviles, no se colorean con el iodo.

La temperatura óptima es 25°C á 30°C. Crece poco a 35° y a 16; no crece a 7-8° C ni a 39°C.

En los cuadros adjuntos se hace un resumen de las propiedades morfológicas y fisiológicas que la literatura atribuye á las especies conocidas.

Las cepas N° 78-3, 10-2, Col 2, Col 7, 23 y 38 no se han logrado ubicar en ninguna de las especies descritas en la literatura. Las cepas N° 78-3 y 10-2 podrían pertenecer a una misma especie por ser muy semejantes sus caracteres morfológicos y fisiológicos; lo mismo ocurre con las cepas Col 2 y Col 7.

Cuadro I - Caracteres de cultivo y morfología.

Cepa	Medios líquidos	Color c/ I ₂	Agar-estría	Colonias en cajas	Morfología	Temp.	Especie
xyli num A.	pel. muy gruesa no enturbia	azul	col. aislad. secas, espesor delg.	circulares lisas, grises, secas	bastones algo larg. simples • a pares	24-28°C no a 37°C	
xyli num B	idem	azul	idem	id, borde ligeramte. lobado	bastones largos, algo curvos dipl. • cortas cad.	28° no a 37°C	<u>Ac. xylinum</u>
Nº. 27	pel. gruesa, cae no enturbia	azul	colonias pequeñas, aisladas, secas • untuosas	circul. borde liso untuosas.	bast. delg. alg. cortos algo curvos simples • dipl.	24°C no a 37°C	
Kombucha 2-5	pel. blanca se rompe a veces pel. gruesa	azul	colonias pequeñas, aisladas, secas • untuosas	circul. b. liso con centro oscuro, brillante	bast. peq. en cad. ramif. algunos curv.	28° poco a 37°	<u>Ac xylinoides</u>
Komb 3-4	turbidez no da película	-	colonias pequeñas agrupadas, rosadas viscosas	circulares borde liso marrón rosado, granuladas	bast. cort. alg. cocob. simples • a pares	24-28°C poco a 37°	<u>Ac. gluconicum</u>
8-1	pel. tenue se rompe enturbia	No	colonias pequeñas aisl. mucos.	circulares b. liso marr. mucosas	bast. cort. simples o pares	28° crece a 37°	<u>Ac. acetii</u>
2-1	idem	No	col. untuosas	b. liso ó dentado, untuosas	id	28°C no a 37°C	
9-2	pel. discontinua turbidez	No	desarrollo continuo viscoso	b. liso circul. mucosas dentro más oscuro	bast. cort. sueltos diplos o cadenas cort.	28-24°	<u>Ac. vini acetati</u>
13-2	idem	No	idem	idem	bast. cort. sueltos ó diplos	28° no a 37°	
119	pel. delgada asciende mucho turbidez	No	col. aisl. peq. húmedas esp. delgado	circulares b. liso ligeramente lobado	bast. cort. diplos ó cadenas cortas	24°	<u>Ac. ascendens</u>
121	idem	No	idem untuosas	idem	bast. delgados sueltos.	28°	

cepa	Medios líquidos	Color c/ I ₂	Agar-estria	Colonias en cajas	Morfología	Temp	Especie
28	pel. tenue gruesos coños	No	Col. aisladas mucosas	circular b. lig. lobado mucosas	bast. largos algo curvos sueltos o en cad.	24°	<u>Ac. schüzzenbachi</u>
59	pel. muy delgada en islas	No	Col. aisladas pequeñas secas.	circul. b. liso secas grises	bast. largos algo curvos simples diplos o cadenas cortas	28°	<u>Ac. curvum</u>
M-5-1	pel. rugosa, ascendente	No	idem	idem	bast. largos muchos curvos.	24°	
78-3	pel. delg. turbidéz	No	col. aisladas pequeñas iridescentes	circul. mucosas oscuras	bast. gruesos sueltos o en cadenas cort. hipertróficos	28°	
10-2	pel. continua delgada	No	col. aisladas pequeñas untuosas	circul. b. liso grises	bast. cortos sueltos o en cadenas de 3 o 4 formas de invol. largas	28°	
38	pel. dis continua no enturbia	No	continua viscoso	circul. ovales viscosas filantes	bast. largos sueltos o de 2 o 3 algo curvos	24°	
23	pel. delgada enturbia	No	continua viscoso volumin.	circul. mucosas	bast. algo curvos simples o a pares	28°	
Col 2	pel. dis continua turbidéz	No	col. aisladas untuosas	circul. b. liso lobado	bast. cortos sueltos o en diplos	28°	
Col 7	pel. que rompe	No	col. aisladas gdes. viscosas	idem	idem	28°	

Cuadro II- Acidificación de sustancias hidrocarbonadas.

Cepa	A	gl	gal	sac	mal	lac	alc	man	gñi	Especie
xylinum A	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
xylinum B	+	+	-	-	-	-	+	-	-	<u>Ac. xylinum</u>
Nº.27	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
Kombucha 2-5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	<u>Ac. xylinoides</u>
Kombucha 3-4	+	+	+	+	-	-	+	+	+	<u>Ac. gluconicum</u>
Nº 8-1	-	+	-	--	-	-	+	-	-	<u>Ac. acetii</u>
Nº 2-1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Nº 9-2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
Nº13-2	+	+	+	(+)	-	-	+	+	+	<u>Ac. vini acetati</u>
Nº 119	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<u>Ac. asecendens</u>
Nº 121	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Nº 28	+	+	+	-	-	-	+	+	+	<u>Ac. schützenbachii</u>
Nº 59	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
M-5-1	+	+	(+)	-	-	-	+	+	-	<u>Ac. curvum</u>
Nº 78-3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Nº 10-2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
Nº 38	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
Nº 23	+	+	-	+	-	-	+	-	-	
Col 2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Col 7	-	+	-	-	-	-	+	-	-	

ABREVIATURAS:

A: arabinosa
 gl: glucosa
 sac: sacarosa
 mal: maltosa
 gal: galactosa

Lac: lactosa
 alc: alc. etílico
 man: manita
 glí: glicerina

+ : acidifica
 (+): poca acidificación
 - : no acidifica

Cuadro III - Caracteres de cultivo y morfología.

Especie	Colonias en cajas	Medios líquidos	Movilidad	Color c/ I ₂	Morfología	Temp. ópt.
<u>Ac. oxydans</u>	circulares b. lobado viscosas	pel. muy delg. sube se rompe enturbia	Sí, no a 30°C	no	a pares o en cadenas Formas hipertróficas	18-21°
<u>Ac. Industum</u>	circulares planas grises filamentosas	pel. espesa cae en flocos enturbia	si	no	esféricas o en huso distr. irregularmente	23°C
<u>Thermobacterium aceti</u>	-	pel. muy delg. se rompe asc. enturbia	si	no	aisladas o en cadenas cel. hipertróficas	33°C
<u>Ac. Aceti</u>	pequeñas amarillas b. dentado	pel. viscosa moteada se rompe	no	no	aisladas o en cadenas	34°C
<u>Ac. acetosum</u>	untuosas puntiformes	pel. continua blanquecina se pliega sube poco.	no	no	largas cadenas paralelas	28°C.
<u>Ac. pasteurianum</u>	borde liso sup. rizada	1ª húmeda luego seca fina, cae no enturbia	no	azul	cortos, anchos en cadenas cel. hinchadas	30°C
<u>Ac. kitzingianum</u>	planas de borde liso	pel. muy delg. viscosa, sube sedimento	no	azul	pequeñas y aisladas	34°C
<u>Ac. rancens</u>	viscosas continuas	pel. seca plegada asciende no enturbia	no	no	bast. cortos en largas cadenas	-
<u>Ac. xylinoides</u>	grandes aisladas transp. centro oscuro	pel. muy delgada o gruesa.	no	azul	redondas o largas solas a pares o en cadenas	28°C.
<u>Ac. orleanense</u>	irregulares blanquec. viscosas elevadas.	pel. firme coherente líq. claro	no	no	cortas clavadas o largas rectas o curvas	
<u>Ac. xylinum</u>	húmedas o secas	pel. muy gruesa	no	azul	cortas, largas o como hilo	28°C

Especie	Colonias en cajas	Medios líquidos	Movilidad	Color c/ I ₂	Morfología	Temp. ópt.
<u>Ac. ascendens</u>	circulares blancas lisas	pel. muy delgada sube mucho, se rompe enturbia.	no	no	aisladas a pares o en largas cadenas.	31°C
<u>Ac. vini acetati</u>	húmedas brillantes sedimento blanquec.	pel. muy delgada no coherente enturbia	no	no	solas de a dos o tres redondas bast. cortos o en forma de huevo.	28-33°
<u>Ac. curvum</u>	transp. secas	poco coherente, en islas	no	no	redondas como huevo o largas solas o en cadenas	30°
<u>Ac. schilzerbachii</u>	redondas brillantes centro marrón amarillento	pel. poco firme en islas cae como polvo	no	no	redondas como huevo o largas solas o en cadenas	25-27°
<u>Ac. acetigenum</u>	mucosas abovedadas	pel. bastante firme continua, cae	si	azul	redondas distr. irregularm. o a pares.	33°
<u>Ac. gluconicum</u>	circulares untuosas rojizas	no da pel. sedim. rojizo	si	no	pequeñas simples o a pares.	-
<u>Ac. hoshigaki</u>	circulares blancas granuladas		no	no	simples a pares o en cadenas	30-35°
<u>Ac. suboxydans</u>		pel. muy delgada poco visible	no	no	bast. cortos simples o en cadenas.	30°

Cuadro IV- Propiedades bioquímicas.

Espece	Medios con glucosa	Medios con alcohol	Medios con ácido acético
<u>Ac. oxydans</u>	8% de ácido glucónico en 25% de glucosa.	crece en 7%	Resiste 2% no sobreoxida
<u>Ac. industrium</u>	16,6% de ác. glucónico en 40% de glucosa	resiste 6-7%	no sobreoxida
<u>Ac. Aceti</u>	2,6% de glucónico en 10% de glucosa	resiste 11%	Sobreoxida resiste 6,5%
<u>Thermobacterium aceti</u>	2,5% de glucónico en 8% de glucosa	resiste 9% da 6% de acético	si hay poco ácido lo sobreoxida
<u>Ac. acetosum</u>	4,6 de glucónico en 25% de glucosa		es poco sobreoxidado.
<u>Ac. pasteurianum</u>	0,5% de glucónico en 35% de glucosa	resiste 9,5%	resiste 6,6% sobreoxida con poco ácido
<u>Ac. kützingianum</u>	0,8% de glucónico en 15% de glucosa	resiste 9,5% da 1,5% de acético en 2% de alcohol	resiste 6,6% sobreoxida si hay poco ácido
<u>Ac. rancens</u>	4,17 g. ácido glucónico en 5 de glucosa	da 1,11 de acético en 2% alcohol, No sobreoxida	-
<u>Ac. xylinoides</u>	4,43 de glucónico 0,51 de cetogluc. en 5% de glucosa	en 2% alcohol da 1,31 acético al mes y 0,43 - 3 mes.	sobreoxida
<u>Ac. orleanense</u>	2,62 de glucónico 0,52 de cetogluc. en 5% de glucosa	0,92 g, acético en 2% alcohol	sobreoxida si hay poco ácido.
<u>Ac. xylinum</u>	1,5 de glucónico con 12% glucosa (Henneberg) da cetoglucónico (Hermann Neuschul)	resiste 6-7%	resiste 4,5% sobreoxida si se forma lentamente
<u>Ac. ascendans</u>	crece en 35% pero no acidifica	resiste 12% da 0,68 acético en 2% alc.	resiste 9% sobreoxida si hay poco ácido

Especie	Medios con glucosa	Medios con alcohol	Medios con ácido acético
<u>Ac. vini acetati</u>	1,96 de glucónico en 5% de glucosa	1,87 g ácido a los 3 meses 0,24, 11 meses	-
<u>Ac. curvum</u>	-	-	-
<u>Ac. schützenbachii</u>	-	-	sobreoxida
<u>Ac. acetigenum</u>	1,9% glucónico resiste 25%	resiste 7%	resiste 3,5% sobreoxida
<u>Ac. gluconicum</u>	3,54% de glucónico 0,32 cetogluconico en 5% de glucosa	1,13% acético en 2% alcohol	-
<u>Ac. hoshigaki</u>	da ácido glucónico	-	-
<u>Ac. suboxydans</u>	da glucónico. con CO ₃ Ca da cetogluconico.	-	-

Cuadro V Acidificación de sustancias hidrocarbonadas (Henneberg)

Especie	A	Lev	gl	gal	sac	mal	lac	raf	alc	a.pr.	gli	man
<u>B. industrium</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. Oxydans</u>	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
<u>Thermobact. aceti</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. aceti</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. acetosum</u>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. kiltzingianum</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. pasteurianum</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. acetigenum</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. ascendens</u>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>B. schützenbachi</u>	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+	-
<u>B. curvum</u>	+	(+)	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	(+)
<u>B. orleanense</u>	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. xylineoides</u>	+	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	(+)
<u>B. xylinum</u>	+	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	(+)
<u>B. vini acetati</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abreviaturas: A.: arabinesa

+: acidifica

Lev : levulosa

(+): poca acidificación

gl : glucosa

- : no acidifica

gal: galactosa

mal: maltosa

lac: lactosa

alc: alcohol etílico

a.Pr: alcohol propílico

raf: rafinosa

gli: glicerina

man: manita

IV- CONCLUSIONES-

- 1) Como resultado del estudio bioquímico realizado se han encontrado cepas de bacterias acéticas que forman cuerpos cetónicos en medios que contienen glucosa y glicerina y otras que no los dan, análogamente a lo encontrado por Hermann y Neuschul (1931).
- 2) Se ha encontrado que el agregado de CO_3Ca a los medios con glucosa no eleva en forma sensible el porcentaje de cetoácido formado.
- 3) En cuanto al comportamiento frente al alcohol etílico se ha encontrado que seis de las cepas estudiadas lo acidifican muy poco y lentamente, enturbiando además el medio. Las demás lo acidifican en forma normal.
- 4) De las 14 cepas identificadas sólo cuatro se pueden aplicar en la fabricación del vinagre correspondiendo dos de ellas a Ac. curvum, una a Ac. schützenbachii y otra a Ac. xylinoides. Las demás no son utilizables por enturbiar el medio o por sobreoxidar mucho el ácido acético producido.
- 5) Dos cepas provenientes del proceso del vinagre rápido, se han identificado como especies no pertenecientes a dicho proceso: una de ellas se identificó como Ac. ascendens y la otra como Ac. xylum, siendo el habitat de ambas el vino.

V- RESUMEN:

Se ha revisado la bibliografía referente al aislamiento, la morfología y fisiología de las bacterias acéticas.

Se ha realizado un estudio bacteriológico sobre 20 cepas pertenecientes al género Acetobacter, con el objeto de identificarlas encontrándose ciertas dificultades, debido a que la literatura no es del todo completa y uniforme, puesto que en la descripción de algunas especies se consignan datos que no lo están en la de otras. Sin embargo, se han logrado identificar 14 de las cepas en estudio, aunque en algunos casos se han encontrado ciertas discrepancias que se indican en el texto.

Se ha estudiado además, el comportamiento bioquímico de las mismas cepas, usando como sustrato agua de levadura con alcohol, glucosa ó glicerina, investigándose la formación de ácidos y cuerpos cetónicos.

Matilde Pascal
Cecilia Puel

VI- BIBLIOGRAFIA-

Asai T : "Systematic study of alcohol and carbohydrate oxidizing bacteria isolated from fruits and a new classification of oxidizing bacteria". J. Agr. Chem. Soc. Japan 11: 331-40, 377-90, 499-513, 610-20, 674-708 (1935).

Barch: "The oxidation of 5-ketogluconic acid with nitric acid in the presence of vanadium". J. Am. Chem. Soc. 55: 3653-8 (1933)

Barsha and Hibbert : Reactions relating to carbohydrates and poly saccharides XLVI. Estructure of the cellulose synthesized by the actions of Ac. xylinus on fructose and glycerol. Can. J. Research 10: 170-9 (1934)

Beijerinck: "Thermobacterium acetii Zeidler" Cent. f. Bact. II Abt. 2: 739 (1896)

_____ : "Bacterium rancens" Cent. f. Bakt. II Abt., 4: 211 (1898)

_____ : "Proc. Kon. Akad. v. Wetenschapp, Amsterdam, 2: 495 (1900-).

_____ : "Acetobacter melanogenum" . Cent. f. Bakt. II Abt. 29: 175 (1911).

Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology, 5th. ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1939), pág. 222-32.

Bernhauer K. und Görlich B. "Oxydationen mittels Essigbakterien IV Über die Bildung von 2 ketongluconsäure durch Bact. gluconicum Biochem. Z. 280: 367-74 (1935)

Bernhauer K. und Irrgang: "Oxydationen mittels Essigbakterien III Über die Bildung von einen reduzierenden Zuckercarbonsäure (Aldehyd gluconsäure) neben 5 ketongluconsäure". Biochem Z. 280: 360-6 (1935)

Bernhauer und Knobloch: "Zerteilung der Dextrose durch Ac. suboxy-

B. O. N. B. A.

dans" Naturwissenschaften" 26: 819 (1938)

Bernhauer und Schön:"Oxydationen mittels Bact. xylinum I Die Bildung von Dioxyaceton aus Glycerin. Zeit physiol. Chem. 177: 107-24 (1928)

_____ : "II Die Bildung von gluconsäure und 5 keto-gluconsäure, Zeit. physiol. Chem. 180: 232-40 (1928)

Bertho A. und Basu K.:"Die Bedeutung der Aldehyd-Dismutation für die Essiggärung". Liebig's Annalen der Chemie. 485: 26-42 (1931)

Bertrand B. .:"Preparation biochimique du sorbose". Bull. soc. chim. III 15: 627-31 (1896).

_____ .: a) "Sur la préparation biochimique de la dioxyacetone (propanediolone)." Bull. soc. chim. III 19: 502-7 (1898)

_____ .:b) "Sur la produit d'oxidation de la glycerine para la bactérie de la sorbose". Compt. rend. 126: 842 (1898)

_____ .: "Etude biochimique de la bactérie" Ann. chim. phys. VIII 3: 181-288 (1904).

Boutroux L. Compt. rend. 605 (1878)

_____ : "Sur une fermentation nouvelle du glucose" Compt. rend. 91: 236 (1880).

Brown A. : a) "The chemical action of pure cultivations of Bact. aceti". J. Chem. Soc. London 49: 172-87 (1886)

_____ : b) "On an acetic ferment which forms cellulose". J. Chem. Soc. London 49: 432-9 (1886)

Butlin K. : a) "Survey of the biochemical activities of the acetic acid bacteria" . Chemistry Research, Special Report 2, H.M. Stationery Office, London (1936)

_____ : b) "Aerobic breakdown of glucose by Bact. suboxydans"

F O R N A

Biochem. J. 30: 1870-7 (1936).

_____ : "The biological production of dihydroxyacetone".

J. Soc. Chem. Ind. 57: 463-4 (1938)

Campbell W. "Determination of dihydroxyacetone" J. Biol. Chem. 67: 59-69 (1926).

Cozic M. : "Etude biochimique de Bact. xylinum". Thesis André Lesot, Nemours, (1933).

Dratvina : "Dependence of alcohol and acetic acid oxidation by acetic acid bacteria on the pH and another conditions of the medium" Microbiology (U.S.S.R.) 6:468-80 (1937)

Fred Peterson and Anderson : "The fermentation of arabinose and xylose by certain aerobic bacteria" J. Bact. 8:277-86 (1923)

Fuhrmann : Beiheftz. Bot. Centralbl., Orig. 19:8 (1905)

_____ : "Ac. plicatum" Centr. f. Bakt. II Abt. 15:377 (1906)

Hansen (a) : "Bact. acetii" Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet 2, 1879

_____ (b) : "Bact. pasteurianum". Compt. rend. des trav. de Lab. de Carlsberg 96 (1879).-

_____ : "Bact. kützingianum". Compt. rend. des trav. de Lab. de Carlsberg 3:191 (1894).

Henneberg W. "Bact. oxydans y Bact. acetosum" Centr. f. Bakt. II Abt. 3: 223 (1897)

_____ : a) "Bact. acetigenum" Centr. f. Bakt. II Abt. 4:14 (1898)

_____ : b) "Bact. ascendens y Bact. industrium" Centr. f. Bakt. II Abt. 4: 933 (1898)

_____ : "Bact. schützenbachii, Bact. curvum, Bact. orleanense, Bact. vini acetati y Bact. xylinoides" Centr. f. Bakt. II Abt. 17: 790 (1906).

- _____ : "Handbuch der Gärungsbakteriologie" II. Abt., 2 bände.
P. Parey, Berlin(1926) Pág. 190
- Hermann S. "Über die sogenannten Kombucha" Biochem. Z. 192: 176-87
- _____ : (a) Bact. gluconicum ein in der sogenannten Kombucha (japanischer od. indischer Teepilz) vorkommender Spaltpilz" Biochem. Z. 205: 297-305 (1929)
- _____ : (b): "Über die Bildung von Gluconsäure und Ketogluconsäure durch Bact. gluconicum, Bact. xylinum und Bact. xylinoides". Biochem. Z. 214: 357 (1929) .
- Hermann S und Neuschul P. "Zur Biochemie der Essigbakterien zugleich ein Vorschlag für eine neue Systematik". Biochem. Z. 233: 129-216 (1931) .
- _____ : "Über einen charakteristischen Unterschied de Bact. gluconicum gegenüber anderen Essigbakterien bei der Einwirkung auf Galaktose". Biochem. Z. 270: 6-14 (1934)
- Janke A.: Centr. f. Bakt. II Abt. 64: 253 (1925)
- Janke A. und Kropacsy S. : "Beiträge zur Kenntnis des Mechanismus der Essigsäuregärung" Biochem. Z. 278: 37-59 (1935)
- Jensen O.: "The general lines of a natural classification of bacteria" Cent. Bakt. Parasitenk. II Abt. 22: 305-46 (1909).
- Kluyver A and Boezaardt A. : " On the oxidation of glucose by Ae. suboxydans". Rec. trav. chim. 57: 609-15 (1938)
- Kluyver and Donker: "The unity in the chemistry of the fermentative sugar dissimilation processes of microbes" . Proc. Akad. Sci. Amsterdam. 28: 297-313 (1925).^a
- Kluyver and de Leww F.: "Ae. suboxydans, a new acetic bacteria". Tijdsehr. Vergelijk. Geneeskunde 10: 170-82 (1924)
- Kolthoff Y. and Sandell E. : "Textbook of quantitative inorganic

analysis". Mac Millan Co., New York, 1941. pag. 576.

Kützing: Algae aquae dulcis 11^a década 1837?

Lanzi: N. Giorn. bot. ital. 257 (1876)

Ludwig: Cent. f. Bakt. II Abt. 4: 867 (1898)

Mosel H.: "Untersuchungen über Essiggärung und Oxydation höherer Alkohole in zuckerfreien Nährlösung" Cent. f. Bakt. II Abt. 87: 193-229 (1932).

Naegeli: "Bericht über die Verhandlungen der bot. Section der 33 Versammlung deutscher Naturforscher und Artzten" Bot. Ztg. 760 (1857)?

Neuberg C.: Zeits. Physiol. chemie. 31: 564 (1901).

Neuberg C. und Nord F.: Application of the fixation method in bacterial fermentation II The establishment of an aldehyde stage in acetic acid fermentation". Biochem. Z. 96: 158-175 (1919).

Neuberg C. und Windisch F.: "Über die Essiggärung und die schemischen Leistungen der Essigbakterien". Biochem. Z. 166: 454 (1925).

Saccardo: Atti Soc. Ven. Tent. 5: 315 (1878) .

Shinwell: "Ag. viscosum" Centr. f. Bakt. II Abt. 36: 433 (1913)

Soriano S. "Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la chicha". Rev. Inst. Bact. (D.N.H.) 8:231 (1938)

Stiles, Peterson and Fred.: "A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures". J. Bact. 12: 427-39 (1926.)

Takahashi T. and Asai T.: a) Gluconic acid fermentation I Bact. hoshigaki var. rosea nov. spec. J. Agr. Chem. Soc. Japan 6: 223-41 (1930)

_____ : b) " III Bact. industrium var. hoshigaki". J. Agr. Chem. Soc. Japan 6:526-37 (1930)

_____ : a) Gluconic acid fermentation. J. Agr. Chem. Soc. Japan 9: 351-60 (1933)

_____ : b) "The formation of fructose and kojic acid by acetic acid bacteria". Centr. F. Bakt. II Abt. 88:286-95 (1933).

Tanaka K. : "Zur Physiologie der Essigbakterien I Über die Gluconsäuregärung der Essigbakterien." Acta Phytochim. Japan 7:265-97 (1933).

_____ : "Classification of acetic acid bacteria". J. Agr. Soc. Japan 12: 726-44 (1936).

Thompson: Ann. de Chem. u. Pharmacie 83: 89 (1852)

Trevisan : Atti della Accademia Fisio-Medico-Statistica in Milano Ser. 4: 103

Turner, Kress and Harrison " naftol colour test for the hydroxiacetone and hydroxymaleic acid". J. Bact. 44: 249-50 (1942)

Underkofler L. and Fulmer I. : "The production of dihydroxyacetone by the action of Ac. suboxydans upon glycerol". J. A. Chem. Soc. 59: 301 (1937).

Utkin L. : "Ac. ketogenum" Microbiology (U.S.S.R.) 6:433-4 (1937)

Virtanen A. und Bärlund M. : "Die Oxydation des Glycerins zu Dyoxyacetone durch Bakterien". Biochem Z. 169: 169-77 (1926).

Virtanen A. and Nordund M. : "An improved method for the preparation of dihydroxyacetone" . Biochem. J. 27:442 (1933).

Visset't Hooft F. : "Biochemische onderzoekingen over het geslacht Acetobacter" Thesis, Technische Hoogeschool Delft. (1925.)

Waterman H. : "Zur Physiologie der Essigbakterien" Centr. Bakt. Parasitenk. II Abt. 38: 461-2 (1913).