

Tesis de Posgrado

Estudio del proceso de acetificación por el método rápido

Prechel, Walter

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:

Prechel, Walter. (1947). Estudio del proceso de acetificación por el método rápido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0516_Prechel.pdf

Cita tipo Chicago:

Prechel, Walter. "Estudio del proceso de acetificación por el método rápido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1947.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0516_Prechel.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIO DEL PROCESO DE ACETIFICACION POR EL METODO RAPIDO

por

WALTER PRECHEL

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL TITULO DE
DOCTOR EN QUIMICA
EN LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

— o —

1947

-Tesis 516

T 516

REDACTED

A M'S PADRES

A mi padrino de tesis Ingeniero Agrónomo Santo Soriano, cuyo experimentado consejo oído gentilmente a cada instante resultó una guía de incomparable valor, mi gratitud.

Al Doctor Alfredo Sordelli, maestro que me iniciara en la especialidad, mi agradecimiento por la eficaz colaboración con que me distinguió permanentemente.

A las autoridades de la Oficina Química Nacional dejo constancia de mi reconocimiento por las facilidades que me acordaron para la realización del trabajo experimental.

W.P.

SUMARIO

PRIMERA PARTE:

ANTECEDENTES

- Capítulo I: Introducción
Capítulo II: Antecedentes bibliográficos

SEGUNDA PARTE:

ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS

- Capítulo I: Métodos de investigación
1: Procedimientos para el aislamiento.
2: Procedimientos para la descripción en cultivo puro.
- Capítulo II: Investigaciones efectuadas
1: Aislamientos
2: Purificación y comparación de las colonias obtenidas
3: Estudio de los cultivos
4: Discusión de los resultados
5: Clasificación de las bacterias estudiadas.

TERCERA PARTE:

OPERACION DE UNA PLANTA PILOTO

- Capítulo I: Construcción de una planta piloto para la elaboración de vinagre por método rápido.
- Capítulo II: Conducción de la planta piloto
- Capítulo III: Ensayos de acetificación en la planta piloto.
- Capítulo IV: Discusión de los resultados de los ensayos de acetificación.

CUARTA PARTE:

CONCLUSIONES Y RESUMEN

PRIMERA PARTE

PRIMERA PARTE

ANTECEDENTES

CAPITULO I **DEFINICION**

INTRODUCCION

Dentro del vasto panorama que las industrias ofrecen al futuro profesional como campo de aplicación de los conocimientos más bien teóricos que prácticos, adquiridos durante su formación universitaria, resultó factible para el autor de este trabajo, que se dirigieran sus miras hacia la fabricación del vinagre, cuyos problemas, por una circunstancia especial, había tenido oportunidad de conocer y valorar.

Plantado el deseo de contribuir, aunque modestamente al esclarecimiento de los mismos, surgió enseguida la necesidad de justificar la labor a desarrollar, porque la amplitud de la literatura ya existente sobre el particular hace difícil la tarea de hallar ese saldo positivo que diere categoría, al esfuerzo realizado como para hacerse merecedor, por su intermedio, a optar el título de universitario máximo.

Empero, espera su realización entre nosotros, en lo que al proceso de acotificación se refiere, todo aquello que en países de mayor tradición industrial es ya un problema encarado desde casi todos los puntos de enfoque imaginables.

En otros términos, la verificación en nuestro ambiente de esas conclusiones y la puntualización y resolución parcial o total de las dificultades (constaba su existencia) que se plantearon durante su aplicación representaban por si solos un programa de trabajo suficientemente extenso, tanto, que podría llegar a escapar a las posibilidades de quien debía forjar aún sus primeras armas para la investigación.

En efecto los fabricantes argentinos que utilizan ya sea el método alemán rápido clásico o bien sus modificaciones desconocen los gérmenes que han enriquecido en sus transformaciones y no se tiene conocimiento de que se haya intentado intro-

ducir cultivos puros; menos aún, criar variedades especialmente aclimatadas a nuestro medio. Por otra parte el criterio de conducción de las plantas industriales es en la mayoría de los casos empírico, lo que unido al hermetismo tan generalizado en nuestro ambiente industrial hace que no se conozcan, por un lado, los adelantos logrados por los distintos industriales y por el otro, los inconvenientes que se les han presentado.

Una de las consecuencias de esta situación es por ejemplo el hecho de que no se aproveche toda la capacidad de producción de las instalaciones: las escasas referencias que se han podido recoger coinciden en que los equipos elaboran en general aproximadamente la mitad del máximo posible observado por Wüstenfeld (1), a igualdad de concentración final de ácido acético.

Se ha llegado así a señalar uno de los principales móviles y al mismo tiempo objetivos de la tarea a realizar; dar el primer paso, por pequeño que fuera, hacia la racionalización de esta industria.

Ello significaba ante todo: conocer los microorganismos activos, tomando material de un acetificador en pleno funcionamiento y luego estudiar las posibilidades de reproducir en pequeña escala el procedimiento alemán rápido clásico del cual se deducen las ideas básicas de gran parte de los procesos actualmente en uso.

Las consideraciones precedentes han llevado a la concepción del plan de trabajo que se detalla a continuación:

- 1) Estudio de las bacterias activas en el proceso de acetificación rápida.
 - a) Enriquecimientos por siembras en diversos medios de cultivo, partiendo de virutas provenientes de transformadores en actividad normal.

- b) Aislamientos en diferentes medios de cultivo favorables.
 - c) Estudio en cultivo puro de las bacterias aisladas.
 - d) Ubicación sistemática de los cultivos estudiados.
- 2) Ensayo de acetificación en escala de laboratorio por siembra con vinagre de fabricación rápida.
- 3) Estudio de las condiciones ambientales sobre la actividad de las bacterias en los transformadores experimentales; influencia de:
- a) Temperatura.
 - b) Concentración de ácido acético y de alcohol etílico.
 - c) Sustancias nutritivas minerales y orgánicas.

CAPITULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La transformación de los líquidos alcohólicos expuestos al aire y al calor, en vinagre se conoce desde la antigüedad: egipcios, babilonios, hebreos, griegos y romanos lo preparaban por ese mismo camino. Fué el ácido por excelencia de aquellas épocas, según Luckow (1) se confundían ambos conceptos: la palabra griega para vinagre se traduce en la actualidad por ácido, por involucrar también esa acepción.-

Si bien ya Hipócrates (siglo V a J.C.) y Dioscórides (siglo I) ambos naturalistas griegos, citaron al vinagre como remedio eficaz para toda suerte de malestares, es a Plinio el antiguo (23-79) a quién se debe la primera referencia bibliográfica en el libro 22 de su "Historia Naturalis" se describen recetas en las que el vinagre interviene como componente fundamental.

Desde un principio preocupó a los investigadores el conocimiento y la explicación del fenómeno de la acetificación. En el desarrollo de los estudios pueden distinguirse tres grandes etapas:

- 1) **Inicial**, comprendiendo la industrialización de la obtención del vinagre, el hallazgo y aplicación de los métodos básicos de fabricación así como el descubrimiento de la intervención del aire, de la necesidad de la transformación alcohólica previa y por sobre todo, del carácter transmisible de la acetificación.
- 2) **Microbiológica**, a partir del descubrimiento de Kützing, pasando por los estudios de Pasteur, para llegar al reconocimiento y aislamiento de microorganismos activos hacia fin del siglo pasado y comienzo de éste.

3) Etapa definida por el descubrimiento de las enzimas por Buchner en 1903, que señala nuevos rumbos para el estudio de la naturaleza del fenómeno.

La fabricación se convierte en gran industria, se introducen los transformadores gigantes como última evolución del método rápido.

Los primeros intentos conocidos en dilucidar el problema se remontan al siglo VII de nuestra era, época en la que el alquimista Geber de la escuela árabe de Sevilla, realizó ensayos de concentración y purificación del vinagre, lo que dice que más bien procuró dar con la naturaleza de los componentes del mismo, que abordar la explicación de la acetificación en sí.

Recién diez siglos más tarde se avanzó decididamente en estas investigaciones. En su obra "Physica Subterranea" (1669) comunicó J.J. Becher (1635-1682) su observación de que la presencia del aire era necesaria para la transformación. De la misma época data el "Manual", del que figura como autor el Magister Coler y en el que se describe la obtención del vinagre.

Se desprende del mismo que si bien se trabajaba en mayor escala, no se había modificado todavía el procedimiento: consistía en estacionar vino en recipientes de madera y exponerlo al aire hasta obtener una acidez conveniente.

Se llega al tiempo de apogeo de la teoría del flogisto de G. E. Stahl (1660-1734) y su escuela, no pudiendo faltar una interpretación por parte de la misma:

"el fermento" se halla en estado de movilidad interna "que determina descomposición, actuando sobre los cuerpos fermentescibles transmitiéndoles ese movimiento".-

Un contemporáneo de Stahl, Herman Boerhaave (1668-1738), profesor de medicina y química de Leyden, encontró que la a-

oetificación requerida además de la presencia de aire y calor de las sustancias provenientes de la fermentación alcohólica.

Las observaciones de mayor importancia empero consistieron en la referencia de una cantidad de elementos capaces de transmitir la acetificación y entre ellos las sustancias de consistencia pastosa que se separan en el fondo de los recipientes, o las películas que sobrenadan en los líquidos en transformación. Luckow (1) se hizo eco de la opinión de Schrober en el sentido que tales observaciones deben ser consideradas como las primeras manifestaciones de la participación de seres vivos en este proceso, precediendo a las similares de Chaptal (1756-1832). Se debe recordar aquí que Boerhaave nunca previó la verdadera naturaleza de esas formaciones, más aún, demasiado influenciado por la hipótesis de Stahl negó categóricamente que pudiera tratarse de seres vivos al afirmar que eran: "disposiciones simétricas de las moléculas de la materia que responden más bien a las sencillas leyes de la afinidad que a las de la vida".

Se le atribuye también la paternidad del método de inmersión para la fabricación de vinagre, conocido bajo su nombre si bien el propio Boerhaarve admitió en su obra "Elementa Chemia" que tal mérito corresponde a Glauber.

El descubrimiento del oxígeno por Scheele y Priestley (1773) unido a la comprobación experimental de la necesidad de la presencia del aire por Roxier en (1786) llevó a Lavoisier a ampliar el último concepto en el sentido de llamar al oxígeno agente causante de la acetificación.

Resulta interesante consignar que el mismo Scheele descubrió según Parmentier un procedimiento para la conservación del vinagre cuyo principio se confundía con el de la esterilización que se difundió ampliamente recién después de los "trabajos de Pasteur".

Todos los estudios del final de la primera época señala-

da, se orientaron hacia el esclarecimiento del problema desde el punto de vista químico no faltando quién, como Parmen-
tier que todavía en 1801 se apoyó en las teorías de Stahl pa
ra . interpretar el fenómeno.

El francés Saussure consiguió establecer la fórmula mo-
lecular del alcohol etílico en 1814, año también en el que
Berzelius determinó definitivamente la del ácido acético.

La creencia errónea de Lavoisier se arraigó aún más
cuando Davy descubrió en 1820 la oxidación del
alcohol en presencia de negro de platino a baja temperatura
y cuando como consecuencia, estableció Döbereiner en 1821 la
ecuación estequiométrica de la oxidación del alcohol etílico
a ácido acético, encontrando además la formación intermedio
de aldehído etílico.

No resulta extraño entonces que se buscara la sustancia
que suplía al platino durante el proceso de la acetificación.

Pero la idea de resolver el problema siguiendo un crite
rio puramente químico no podía ser fructífera. Reconociendo
lo lejos que se encontraba la ciencia de la verdad, llamó la
Societé de Pharmacie de Paris en 1826 a concurso para respon
der a las siguientes preguntas:

- 1) cuál es la fenomenología de la acetificación?.
- 2) es necesaria la presencia del alcohol?.-
- 3) cuáles son los fermentos necesarios?.-
- 4)Cuál es la influencia del aire?.
- 5) cuál de las teorías de la acetificación es la cierta?.-

Poco satisfactorias debieron ser las respuestas para
que no se distribuyera ningún premio, aún después de repeti-
do dos veces el llamado.

El descubrimiento en 1823 del procedimiento rápido por
J. S. Schüzembach (1793-1869) citado por primera vez por Din-
gler (1) en 1831 activó la búsqueda en ese sentido, y no po-
día ser de otra manera: ese método por el cual el alcohol en
ausencia de "madre de vinagre" y por simple circulación so-

bre las virutas de madera se transforma en vinagre de mayor concentración ácida que los conocidos en tiempo menor, invitaba a la explicación puramente química.

Así lo hacen J. von Liebig y J. J. Berzelius, químicos de mayor renombre en aquella época, para los que se trató de un fenómeno puramente catalítico, desempeñando la viruta el papel de agente de contacto.

Como consecuencia del descubrimiento de los agentes causantes de la fermentación alcohólica realizado simultánea e independientemente por F. Kützing, Ch. Cagniard, Latour y F. Schwann extendió el primero de los nombrados en 1837, (1) sus observaciones a las películas y sedimentos que se formaban en los líquidos alcohólicos en acetificación. Las describió formadas por la agrupación de células esféricas de un diámetro de 1,1 a 1,4 micrones, unidas muchas veces para formar cadenas, estando los grupos celulares envueltos en vainas mucosas.

Kützing llamó a estos microorganismos Ulvina aceti y los ubicó desde el punto de vista sistemático entre las algas.

En su trabajo negó además cualquier relación entre la oxidación química del alcohol etílico con catalizador platino y la acetificación.-

Estos conceptos que marcaban nuevos rumbos a la investigación fueron rechazados por el mundo científico contemporáneo, demasiado grande era el prestigio de Berzelius y de Liebig.

El último en una comunicación posterior no aceptó la vinculación entre aquellos microorganismos y la acetificación debido a que no pudo comprobar microscópicamente la presencia de los mismos sobre virutas extraídas de generados rápidos.

En cuanto a las "madres del vinagre" fueron por él con-

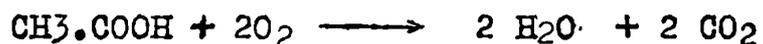
sideradas como materia orgánica muerta de naturaleza proteica, que actuaba como catalizador.

Recién L. Pasteur al comienzo de la segunda mitad del siglo XIX recogió las observaciones de Kützing. Conocía los trabajos de éste, lo admitió en sus comunicaciones y su mérito residió en haber demostrado de un modo indubitable la certeza de aquellas hipótesis. Comenzó sus estudios en 1857, y hasta 1864 no se había librado todavía totalmente de la hipótesis química; escribía sobre microorganismos que "actuaban al modo de la esponja de platino".

Pasteur designó a las películas Mycoderma aceti; rechazando la observación de Hack (1863) de que se trataba de bacterias.

El sabio francés desechó con el tiempo en forma absoluta la interpretación química y en 1872, contestando un escrito de Liebig, en que este aceptaba las hipótesis de Pasteur en lo que se refiere al método orleans y se resistía a las mismas para el método rápido, estableció la comparación con los glóbulos rojos, admitió la naturaleza eminentemente biológica del fenómeno.

Reconoció también a la sobreoxidación y estableció su ecuación:



Grandes también fueron sus éxitos en la industria del vinagre de vino donde introdujo la siembra en líquidos estériles y con material ya acondicionado, sentando de esta manera la base para el empleo de cultivos puros en las operaciones industriales.

Las investigaciones ya se habían orientado netamente hacia el campo de la microbiología. El mismo Pasteur consiguió hacer desarrollar su Mycoderma aceti en medios minerales.

En 1872 Knierim y Mayer señalan la posibilidad de que el cultivo de Pasteur debía estar constituido por más de un

tipo de microorganismos a los que Zopf junto con los citados había reconocido definitivamente como bacterias.

En 1879 reconoció E. C. Hansen (1) dos especies que llamó Mycoderma aceti y Mycoderma Pasterianum denominación que cambió más tarde por Bacterium. A ellos se unió en 1893 B. Kützingianum, (2).-

Mientras tanto había aislado Brown el B. xylinum (1) y su B. aceti (2) que se diferencia esencialmente del homónimo de Hansen por la movilidad.

Hacia la terminación de la época de la evolución histórica de los estudios sobre la acetificación, que se designó como microbiológica se observa una sucesión de descubrimientos de ese orden:

en 1896 A. Zeidler (1) aisló Thermobacterium aceti. Henneberg en 1897 (2) B. oxydans y B. acetosum, en 1898 (3) B. acetigenum, B. industrium y B. ascendens, en 1906 (5) B. Schützenbachii, B. curvum, B. orleanense, B. xylinoides y B. vini acetati.

En 1903 Buchner y Meissenheimer (1) obtuvieron por extracción acetónica de células muertas y desechas un preparado capaz de oxidar al alcohol etílico in vitro. Posteriormente el mismo Buchner en colaboración con Gaunt (1) logró identificar al cuerpo responsable de aquella reacción, alcoholoxidasa enzima de la célula del germen acetificante. Con esto se habían actualizado nuevamente los puntos de vista de Liebig, por más que no se debe ir tan lejos como lo hizo A. Schroche (1) al afirmar que el naturalista alemán estaba más cerca de la verdad que Pasteur; ambas hipótesis fueron según Luckow, (1) igualmente fructíferas para el estudio de la acetificación.

Quedaron así explicadas las causas del fenómeno y a partir de ese momento los investigadores dirigieron sus miras hacia tres objetivos relativamente independientes entre sí:

por un lado, el conocimiento del mecanismo de la acetificación para obtener las ecuaciones que la representaran de un modo más completo que las de Döbereiner, reconocidas como insuficientes ya por Pasteur; por otro el conocimiento de los microorganismos activos para llegar a establecer su sistemática como también sus cualidades sobresalientes; finalmente, el estudio de los procedimientos de fabricación con especial atención sobre la aplicación a ellos de cultivos seleccionados.

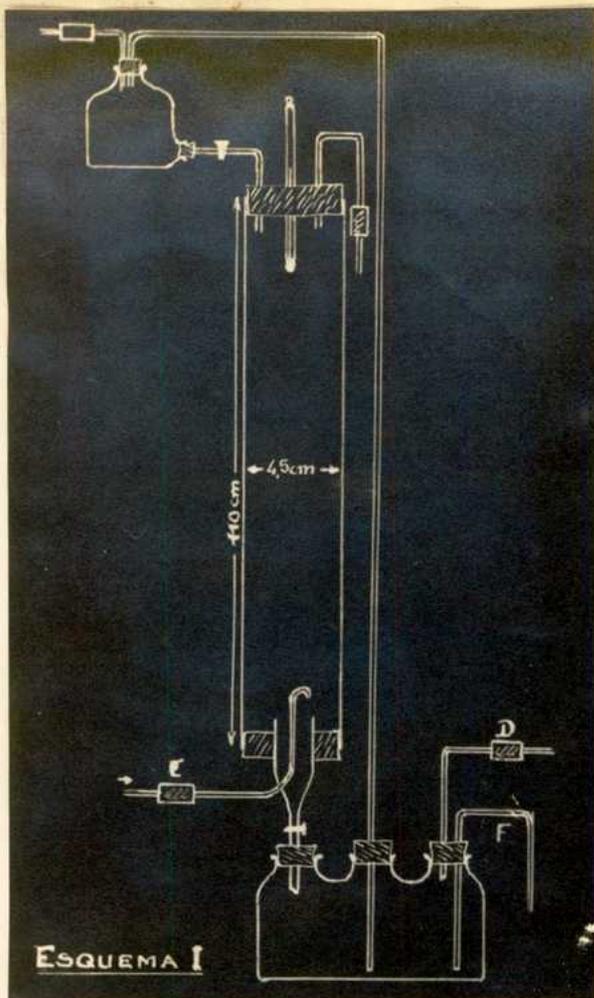
En particular, dentro de los límites del presente trabajo, interesa lo realizado hasta la fecha con referencia al método rápido de fabricación y a la sistemática y descripción de los gérmenes que en él intervienen.

Escasos son los antecedentes sobre ensayos de acetificación en instalaciones en escala de planta piloto; hasta la fecha se ha tendido a trabajar con los generadores industriales.

Tan es así, que prácticamente todas las conclusiones referentes a las condiciones de funcionamiento de equipos industriales provienen de estudios realizados directamente en esa escala.

Se tienen referencias de algunos ensayos de aplicabilidad de cultivos puros a la acetificación, llevados a cabo por Rothembach (2) primero y Henneberg (5) después, en aparatos de esa magnitud. En principio ambos son idénticos: se emplearon tubos de vidrio de respectivamente 96 cms y 110 cms. de longitud con un diámetro interior aproximado de 5 cms, cargados con virutas y lana de madera de haya y provistos de termóstatos que permitían la mantención a temperaturas adecuadas,

El de Henneberg poseía un sistema que permitía la recirculación de líquidos no terminados desde el recipiente de carga C por inyección de aire (D) en el frasco de Wulf colector (B), así como una entrada (E) para insuflar aire en contracor-



rriente. El mismo aparato de Henneberg fué empleado más tarde por Hermann (2) de cuyo trabajo se tomó el esquema adjunto, para determinar la capacidad de producción de ácido glucónico del B. gluconicum por él aislado, con miras a una posible industrialización.

En todos los casos una carga de líquido alcohólico (azucarado) necesitaba varios días para su transformación completa, pues la acidez del producto resultante aumentaba a los 0,4 - 0,5% diarios, expresados en ácido acético o ácido glucónico respectivamente.

Es decir, estos dispositivos no representaban a los equipos normales por de pronto, por no respetarse la condición de obtener producto terminado sin necesidad de recirculación. Por otra parte el mismo Henneberg observa que cualquier modificación de composición de los líquidos de carga perturbaba el proceso al punto de llegar a detener la transformación.

Hermann que había prescindido de termóstato en la construcción de su aparato, dejó constancia del inconveniente de las variaciones de temperatura.

Además de los trabajos señalados, solo se tiene conocimiento de experiencias realizadas por Janke y Bauer (2) para comprobar la eficacia de modificaciones en la construcción de los transformadores, por él propuestas a raíz de sus investigaciones sobre la marcha de la acetificación en el interior de aquellos (1).

Entre las distintas variantes sugeridas, ensayó en escala reducida, aquella consistente en la instalación de un contrafondo cónico. Esperaba suprimir de esta manera, la ma-

sa de material de relleno situada debajo de la superficie engendrada por la rotación de la curva determinada por los puntos de máxima acidez dentro del transformador, alrededor del eje vertical del mismo.

De acuerdo con la comunicación respectiva, este tipo constructivo resultó inadecuado debido a la inconstancia de la transformación, probablemente causada por la pequeña cantidad de material de relleno.

Hasta aquí el material bibliográfico en lo respectivo a los equipos de tamaño reducido.

Pasando ahora al aspecto microbiológico, además de los gérmenes ya nombrados se han sido aislado y describiendo otras especies de microorganismos acéticos de los más diversos materiales:

Bacterium rancens (Beijerinck) (1) de virutas de transformadores rápidos -Acetobacter plicatum Fukmann (1)) de vino -Acetobacter melanogenum (Beijerinck (2)) de cerveza -Bacterium aceti-viscosum (Day y Baker (1)) de cerveza y mostos -Acetobacter suboxydans (Klyver y de Lecuy) (1)) de cerveza alterada -Acetobacter peroxydans (Visser Hooft (1)) -Acetobacter hoshigaki (Takahashi y Asai (1) de mosto de nísperos -Bacterium gluconicum (Hermann (1) de kombucha -Bacterium acetigenoideum (Krehan (1) de vinagre de frutas -Acetobacter capsulatum (Shimwell (1) de cerveza -Acetobacter ketogenum (L.M.Utkin (1) de kombucha -Acetobacter turbidans (Cosbie, Tósić y Walker (1) de cerveza -Acetobacter mobile (Tósić y Walker (2)) de cerveza.

En conjunto las "acetobacterias", así llamadas por primera vez por Beijerinck (3) en 1898, son agrupadas dentro de la familia IV del orden Eubacteriales en la clasificación de los Schizomycetes de Bergey (1), teniendo en cuenta su capacidad de oxidar el alcohol etílico a ácido acético.

La caracterización y sistemática de las mismas tropieza

con grandes dificultades y en la actualidad sigue en pie el estado "caótico" en que ya lo encontró Krehan (1) en 1930.

Los inconvenientes se plantearon desde un principio. La comunicación del aislamiento del B. oxydans por Henneberg (2) determinó una observación de Zeidler (2) por considerar que tal especie era semejante, sino idéntica a su Termobacter acetii: Se necesitó de los ensayos paralelos efectuados por Henneberg (3) para reconocer que tales gérmenes debían considerarse distintos.

Pasando por alto la clasificación de Hansen, primera en su género, pero que reúne pocos microorganismos, se encuentra la Beijerinck (1) en la que ya se deja de lado la morfología y la movilidad de los gérmenes por su marcada dependencia de las condiciones de cultivo. Una de las principales características diferenciales es para él la facultad de formar o no películas en las superficies de determinados substratos.

Distingue cuatro grupos:

1) Bacterias rápidas: gérmenes que se encuentran sobre las virutas de transformadores rápidos. Incluye a los cultivos de Pasteur que por sus características considera fueron bacterias rápidas, no así los B. acetii de Hansen y de Brown, dado que esos investigadores no conocieron según él, los microorganismos de Pasteur.

Ubica también en este grupo, si bien con algunas diferencias al Termobacterium acetii de Zeidler.

2) grupo de Bacterium rancens con sus variedades, de las que consigna Henneberg (1) zythi, celiac, agile y muciparum todas descritas por Hoyer. Considera a B. oxydans y B. acetosum como variedades del germen por él aislado. Clasifica aquí a los B. acetii de Hansen y de Brown.

3) grupo del Bacterium Pasteurianum, bacterias de la cerveza que se colorean azul con solución de iodo, comprendiendo a B. Pasteurianum, B. Kützingianum y las variedades de los mismos, citando Henneberg (1) de las del B. Pasteurianum variabile, agile, colorium esta última incapaz de formar película.

Beijerinck separó estas bacterias de las del grupo anterior únicamente por su propiedad de tomar color azul con iodo, puesto que el comportamiento general es, según sus observaciones, idéntico al del B. rancens; más aún, algunas variedades del último difieren más de éste, que el propio B. Pasteurianum.

4) grupo del Bacterium xylinum. Provocan sobreoxidación y forman películas consistentes.

La sistemática de Hoyer (1) de iguales principios que la anterior, reúne los dos grupos de bacterias de la cerveza anulando una separación que ya discutía el propio Beijerinck.

Clasifica a la bacteria de Zeidler entre los de la cerveza incluyendo entre los gérmenes rápidos a B. ascedens y B. acetigenum. El tercer grupo comprende al B. xylinum.

En la misma época (año 1898) propone Henneberg (4) su clasificación basada en el "habitat" natural de los gérmenes: clasificación que mantiene y completa en la segunda edición de su obra (1) por considerar que: "no se puede hablar de una clasificación científica mientras no se establezcan los límites de variación de las distintas especies".

Justifica sus sistema con la consideración de que la presencia de gérmenes en determinados medios está ligada la mayoría de las veces, muy íntimamente con algunas propiedades características. Distingue:

1) Bacterias de los mostos, con pequeña capacidad de producción de ácido acético. Acidifican los mostos de cereales.

les aún en ausencia de alcohol etílico. Comprende: B.oxydans, B.industrium.

2) Bacterias de la cerveza, adaptadas especialmente a los medios lupulados, pobres formadores de ácido acético, óptimo de temperatura bajo. Reune: Termobacterium acetii, Bacterium acetii de Hansen, B.acetosum, B.Pasteurianum y sus variedades, B.Kützingianum, B.rancens y sus variedades.

3) Bacterias del vino, resistentes a mayores concentraciones de alcohol etílico y ácidos orgánicos, con capacidad de formar películas y cantidades relativamente grandes de ácido acético; agrupa: B.ascendens, B.vini acetati, B.xylinoides, B.xylinum, Acetobacter plicatum y también B.orleanense que a pesar de haber sido aislado de un transformador rápido debe considerarse bacteria del vino. Dentro de estas especies son típicas B.xylinoides y B.orleanense, mientras que las restantes deben contemplarse como no aprovechables para la obtención de vino.

4) Bacterias rápidas, muy resistentes a elevadas concentraciones de alcohol etílico y ácido acético, poco exigentes en los que respecta a la nutrición, forman sobre medios líquidos películas no cerradas y muy tenues.

Los representantes típicos son: B.Schützenbachii y B.curvum debiendo agruparse con estos B.acetigenum por sus escasas exigencias nutritivas.

A lo largo de sus descripciones comenta Henneberg (1) con mucha cautela la posibilidad de diferencias variedades o razas dentro de una misma especie, como lo han hecho Hoyer y Beijerinck, también por la falta de referencias experimentales sobre la variabilidad de las cepas originales de las especies descriptas.

Su esquema es indudablemente la base del sistema de Rothenbach (1) y el de Lafar (1) tanto como de la tabla de ca-

racterización morfológica de Wüstenfeld (1). De estos el más interesante es probablemente el de Rothenbach (1) en el que se contempla por primera vez la posibilidad de modificar dentro de ciertos límites, las características de otras bacterias acéticas para adaptarlas a las condiciones de vida de las rápidas y vice-versa "degenerar" algunas de las descritas como rápidas, al punto de hacerlas no identificables con su condición primitiva.

Define este autor como bacteria rápida, aquella capaz de producir en corto plazo tanto ácido acético como el que se produce en los transformadores rápidos, debiendo ser además y en razón de "habitat", muy resistentes a las elevadas concentraciones de alcohol etílico y ácido acético que reinan en aquellos.

De acuerdo con esto, muchas de las especies o variedades aisladas de generadores rápidos por otros investigadores no pueden ser consideradas especies típicamente rápidas y su presencia en los aparatos podría explicarse por las numerosas posibilidades de infección durante el manipuleo, así como en los períodos de baja acidez propios de la puesta en marcha de las instalaciones como de las épocas de trastornos ya sean térmicos, nutritivos, etc.

Así por ejemplo, de las especies estudiadas por Hennelberg en 1897 y 1898 solo el B. acetigenum es capaz de desarrollarse con 3% de acidez acética, lo que unido a la lentitud de formación de ácido lo hace incomparable con las verdaderas bacterias rápidas, que producen en corto plazo de mezclas de 3 a 4 % de ácido y 6 a 7 % de alcohol etílico, vinagres de 8 a 9 % de acidez acética.

Ahora bien, Rothenbach considera a esos gérmenes no típicos que se hallaron en los equipos rápidos, como aclimatados a esas condiciones de vida especiales, tomando como pruebas de esa hipótesis los múltiples ensayos efectuados

con éxito, para acondicionar diversos gérmenes a la producción de vinagres de alta acidez según el método de Schützenbach.-

No todas las bacterias acéticas se prestan para esa adaptación; sólo los buenos acetificadores de líquidos en reposo y al mismo tiempo poco exigentes en la nutrición, han dado resultados satisfactorios.

De acuerdo con Henneberg (5) las bacterias rápidas forman películas, aunque tenues, sobre los substratos. Observa Rothenbach en ese sentido que todos los microorganismos por él aislados de generadores rápidos capaces de formar películas, eran relativamente malos acetificadores. Por otra parte vió que sembrando mezcla alcohólica de elevada suma alcohol-ácido con vinagre rápido de obtención reciente, es decir, colocándose en las condiciones en que solo podía producirse desarrollo de las bacterias rápidas había multiplicación de la flora microbiana, pero no formación de película, aún después de meses de incubación. Por esa razón las especies que muestran formación de película deben considerarse, de acuerdo con Rothenbach, como distintas de las rápidas, que han vuelto a su condición normal.

El sistema propuesto por Rothenbach diferencia entre:

1) Bacterias rápidas que producen vinagres de alta acidez en los generadores Schützenbach, estando anulada o muy disminuída su capacidad de formación de zoogleas.

2) Bacterias técnicas del vino, que lo acetifican sin enturbiar. Pueden transformarse en rápidas o viceversa. No pertenecen a este grupo B.xylinum y B.ascendens que fueron encontradas muchas veces en vinagres de vino y vino, que son capaces de acetificarlo pero sin dar produc

tos aptos para el consumo.

3) Bacterias técnicas de la cerveza; acetifican pero no enturbian la cerveza. Se comportan con respecto al grupo 1) en la misma forma que las del vino. Incluye B. rancens y B. Pasteurianum.

4) Bacterias de los mostos: B. industrium y B. oxydans.

5) Bacterias capaces de bastarse con nitrógeno inorgánico, que son formadores de películas, pero tienen bajo poder de acetificación, tanto que no pueden aceptarse como rápidas: B. acetigenum, B. aceti (Hansen).

6) Bacterias de las "enfermedades". Todos aquellos microorganismos que no son técnicamente aprovechables, como por ejemplo B. ascendens que transforma rápidamente los mostos para vinagre de vino, pero que produce enturbiamiento; B. xylinum cuya presencia puede llegar a hacer inapetecibles los productos debido a la formación de masas mucosas.

En resumen se trata de un esquema dictado por las conveniencias de la práctica como lo acepta el propio Rothenbach.-

Basada fundamentalmente en el comportamiento frente a la solución mineral de Beijerinck (1) propone Janke (1) su clasificación en acetobacterias haplotrofas (crecen visiblemente en el medio) y en acetobacterias simplotrofas (no crecen en ese medio). Subdivide a las primeras en dos grupos: Schützenbach y Hansenianum de acuerdo con la incapacidad o capacidad de formar películas mucosas en medios líquidos. A su vez las bacterias simplotrofas comprenden los grupos: Rancens- no se colorean con iodo-, Pastourianum- se colorean con iodo bajo ciertas condiciones- y Xylinum- forma películas resistentes de consistencia cartilaginosa que se colorean con iodo.

Krehan (1) considera este esquema como una buena solución hasta tanto se esclarezca definitivamente el problema de la variabilidad de las especies y se completen las descripciones de las conocidas, absolutamente insuficientes, sobre todo en lo que respecta a la definición de los medios de cultivo y al estado fisiológico del material para la siembra en las distintas verificaciones.

Aconseja el mismo autor el empleo de la solución mineral "J" de Janke (1) como medio de composición definida.

Empero Hermann y Neuschuchl (1), objetan que tal sistema no deja de contemplar, a pesar de la definición fisiológica de las dos grandes clases, el comportamiento de los microorganismos únicamente desde el punto de vista morfológico, con todos los inconvenientes propios del mismo.

A su vez, haciendo pié en la diferente capacidad de formación de cuerpos de naturaleza cetónica a partir de glucosa, glicerina, eritrita y sorbita, esos investigadores dividen en bacterias cetógenas y acetógenas.

Esta clasificación tampoco puede, según Krehan (2) aceptarse como satisfactoria, puesto que el mismo trabajo de origen muestra la dudosa ubicación de B. Pasteurianum y B. aceti (Henneberg).

Por otra parte, los resultados de aquellas investigaciones ponen claramente en evidencia, las dificultades existentes en materia de descripción y caracterización de acetobacterias:

dos cepas de B. ascendens aisladas respectivamente por Henneberg y el Instituto de Fermentaciones de Berlin, presentan propiedades fisiológicas enteramente diferentes, obligando a los autores a consignarlas como de gérmenes distintos

Con motivo del descubrimiento de acetobacterias de pequeña capacidad de oxidación, intenta Visser't Hooft una clasificación (Bergey (1) basada únicamente en propiedades fisiológicas: A.- Catalasa negativos:

1.- Acetobacter peroxydans

B.- Catalasa positivos:

I.- Crecen en el medio mineral de Hoyer

2.- Acetobacter aceti

II.- No crecen en el medio de Hoyer

1.- Forman ácido y carbonato sobre placas con alcohol y creta:

3.- Acetobacter rancens

2.- Forman solamente ácido sobre placas con alcohol y creta

a) sobre placas de agar glucosado con creta forman ácido glucónico que es oxidado a carbonato de calcio

b) forman película gruesa:

4.- Acetobacter xylinum

bb) no forman película y forman pigmento pardo oscuro:

5.- Acetobacter melanogenum

bb) sobre placas de agar glucosado con creta forman ácido glucónico que es oxidado a oxigluconato de calcio

6.- Acetobacter suboxydans

Sin embargo, según opinión de Krehan (2) debe considerarse prematura esa proposición, hasta tanto no se aclare la dependencia de la capacidad de oxidación de las condiciones de cultivo, composición de los medios y otros

factores del mismo orden.

Posteriormente, se ha ensayado una separación de los gérmenes acéticos capaces o no de sobreoxidar, pero Dratwina (1) afirma que carece de fundamento, basándose en sus observaciones sobre la dependencia de la acción sobreoxidativa de B. rancens y B. vini acetati del p H del medio:

encuentra para B. vini acetati que si el medio se agota en alcohol etílico antes de bajar el pH de 4,5 hay sobreoxidación, de lo contrario no se produce.

Para B. rancens ese límite se encuentra a pH 3,1, difícil de alcanzar, por lo que casi siempre sobreoxida.

En el caso particular de las bacterias rápidas se ha llegado últimamente a conclusiones desconcertantes, a raíz de estudios sobre las características bioquímicas de B. Schützenbachii, B. orleanense y B. curvum. Vasil'ey y Shains'ka (1) observaron que aquellas propiedades variaban notablemente para una misma especie y lo que es más, cepas de especies diferentes pueden presentar gran semejanza en su fisiología. La consecuencia inmediata de tal comportamiento es, que surjan dudas sobre su existencia como especies separadas.

Teniendo presente todo lo dicho, no extraña la observación de Tósić y Walker (1) en 1946 que toda caracterización de gérmenes acéticos resulta prácticamente irrealizable sin ensayos paralelos con las cepas originales. Para tal labor, sugieren una rigurosa "standardización" de los métodos de investigación.

Ella ha sido la norma de conducta del presente trabajo en lo que atañe al estudio de los microorganismos activos en la acetificación, que han logrado aislarse.

SEGUNDA PARTE

ESTUDIOS BACTERIOLOGICOS

CAPITULO I.

METODOS DE INVESTIGACION

De acuerdo con el plan de trabajo ya delineado, corresponde mencionar en este capítulo los procedimientos bacteriológicos utilizados en el curso de la investigación.

Dentro de estos procedimientos, cabe distinguir entre aquellos que deben seguirse para el reconocimiento microbiológico de un material cualquiera, y los que permiten la descripción de los gérmenes obtenidos por los anteriores.

I) PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LOS GERMENES ACTIVOS EN LOS ACETIFICADORES RAPIDOS.

Fundamentalmente pueden seguirse dos caminos, el aislamiento previo enriquecimiento o el directo.

De acuerdo con Janke (1) puede obtenerse por el segundo, un cuadro más completo de la flora acetobacteriana, ya que se evita la supresión de especies pocos resistentes al ácido por obra de los gérmenes que acetifican fuertemente los medios. Tiene el inconveniente, lo reconoce el mismo Janke, de que organismos de gran capacidad de multiplicación pueden inhibir por invasión de las superficies, el desarrollo de las bacterias acéticas.

En el primero de los métodos, pueden elegirse los factores de selección y en este sentido, Beijerinck (1) y la escuela de Delft han tomado la temperatura. Waterman (1) sigue la misma norma para separar acetobacterias termófila y psicrófilas para sus estudios fisiológicos.

Henneberg (6) es un decidido partidario del enriquecimiento previo, debido a que encontró dificultades para obtener gérmenes acéticos por cultivo en caja, especialmente

cuando el material para la siembra era de extracción muy reciente.

Las especies una vez enriquecidas, desarrollaban bien en placas y el citado investigador atribuyó estos hechos a la muy disminuída capacidad de multiplicación de las células, como consecuencia de las condiciones del ambiente del que provienen. Admitió (1) también la posibilidad de que los cambios bruscos de medio no sean ajenos a esta situación, recordando la sensibilidad de estas bacterias hacia las modificaciones de concentración. El factor de selección era para Henneberg principalmente la acidez del medio.

Cumpliendo con la finalidad propuesta, se siguieron en el curso de las presentes experiencias ambas normas.

1) Enriquecimiento en medios diversos

a) Aislamiento por enriquecimiento previo.-

Los medios para éste se eligieron de tal modo que la flora acética que en ellos creciera fuera lo más representativa posible de la existente en el material de siembra.

- Medio N^o 1: 1 parte mezcla alcohólica + 2 partes agua
Medio N^o 2: 1 parte mezcla alcohólica + 2 partes mosto de malta
Medio N^o 3: 1 parte mezcla alcohólica + 1 parte agua de levadura + 4 % etanol
Medio N^o 4: Mezcla alcohólica privada de ácido y alcohol + 1,5% glucosa + 1 % peptona.
Medio N^o 5: 2 partes mezcla alcohólica + 2 partes agua + 1 parte mosto de malta
Medio N^o 6: mosto de malta + 4 % de alcohol
Medio N^o 8: 1 % peptona + 4-% etanol + 1-% ac. acético + 3 % glucosa + 0,1 PO₄H₂K + 0,1 PO₄HCa + 0,1 % SO₄Mg
Medio N^o 9: 2-% glucosa + 2-% alcohol + 3% PO₄(NH₄)₂ + 0,2 % SO₄Mg + 0,3 % PO₄H₂K
Medio N^o 10: 6 % jarabe de glucosa + 3 % etanol + 0,2 % PO₄(NH₄)₂ + 0,1 % PO₄H₂K + 0,1 % SO₄(NH₄)₂ + 0,1 % PO₄H₂K
Medio N^o 11: cerveza hervida + 4 % etanol
Medio N^o 12: 1 parte cerveza + 2 partes agua + 1 parte mosto de malta

Medio "J" de Janke (1)

Se entiende por mezcla alcohólica: 6 % etanol + 4 % ácido acético (procedente de vinagre) + 0,1 % glucosa + 0,05 % $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_3$ + 0,03 % CaCl_2 + 0,03 % PO_4HCa .

El mosto de malta se preparó según Henneberg (1) y el agua de levadura según Beijerinck.

Para esterilizarlos se procedió separadamente con los distintos componentes a las temperaturas compatibles con su naturaleza, se hicieron luego los agregados de alcohol etílico y ácido acético (hervidos) indicados. En el caso de la mezcla alcohólica no se practicó en realidad una esterilización, sino que se calentó aproximadamente hasta 50-55°C con el solo fin de asegurar la eliminación de los gérmenes acéticos que contuviera (Henneberg (7)). Se repartieron a razón de 50 ml. en erlenmeyer de 125 ml. de capacidad cerrados con tapón de algodón y también previamente esterilizados.

Como material de siembra se prefirieron las virutas de vinagre, siguiendo las indicaciones de Henneberg (6), para obtener así, un gran número de células capaces de multiplicarse.

Las virutas se colocaron separadamente según su origen en cajas de Petri estériles, raspándolas y exprimiéndolas luego con un bisturí flameado. Las pequeñas cantidades de líquido con gérmenes suspendidos que resultaron, se tomaron con pipeta estéril y diluyeron en tubos con 6 ml. de agua estéril cada uno. De estas suspensiones se sembró con pipeta estéril a razón de 0,5 ml. por cada erlenmeyer.

Además se sembró en los mismos medios 1 ml. de vinagre turbio por cada erlenmeyer.

En todos los casos se incubó a 25°C.

Una vez que se observaron signos de desarrollo microbiano bien marcados, película, turbidez, etc, se tomó del

materiales enriquecidos y se extendió, usando espátula, sobre placas de agar mosto de malta y agar agua de levadura ambas con 2 % de gelificante y 3 % de alcohol. En el caso particular de las películas se tomó un trozo de las mismas, se lo colocó en un tubo estéril y con una pipeta también estéril se procuró deshacerla en el mayor grado posible, por fricción contra las paredes del tubo. El material deshecho, se suspendió en una pequeña cantidad del líquido sobre el cual se había formado la película y una gota de esa suspensión se extendió respectivamente en cada una de las placas nombradas.

También se dejó estacionar un vinagre durante algunos meses, tiempo al cabo del cual se había formado una película de la que se tomó material y se sembró, en la forma descripta.

b) Enriquecimiento en medios que imitan las condiciones reinantes en un transformador.-

Teniendo presentes las posibles causas de los inconvenientes encontrados por Henneberg, se buscó previamente un medio de cultivo que, representando aproximadamente a las condiciones reinantes en un generador en lo que respecta a concentraciones de etanol, y ácido acético, resultara más conveniente en ensayos de acetificación con virutas y en aislamiento en placas de los gérmenes que se separaran de aquellas por raspado, una vez alcanzado el período de máxima acetificación.

Los medios elegidos fueron:

- | | | |
|------|---|----------------------|
| A 1: | 3 partes mezcla alcohólica + 1 parte vinagre + 1 parte melaza 2,5:10 | ác.-al. (4,2-3,6) |
| A 2: | 2 partes mezcla alcohólica + 2 partes vinagre + 1 parte melaza 2,5:10 | (5,1-2,4) |
| A 3: | 1 parte mezcla alcohólica + 3 partes vinagre + 1 parte melaza 2,5:10 | (6,1-1,2) |
| A 5: | 4 partes mezcla alcohólica + 1 parte melaza 2,5:10 | (3,2-4,8) |
| A 8: | 3 partes mezcla alcohólica + 1 parte vinagre + 1 parte agua corriente | (4,2-3,6) |

- A 9: 2 partes mezcla alcobólica + 2 partes vina- ác. - al.
gre + 1 parte agua corriente (5,1 -2,4)
- A 10: 1 parte mezcla alcobólica + 3 partes vina-
gre + 1 parte agua corriente (6,1 -1,2)
- A 11: Mezcla alcobólica (6% etanol + 4% ác. acético + 0,01%
glucosa + 0,05% $PO_4(NH_4)_3$ + 0,03% ClK + 0,03% PO_4HCa)

El vinagre era de fabricación rápida conteniendo 8,85% ácido acético y 0,1% de alcohol etílico.

Se distribuyeron a razón de 300 ml. en frascos de boca cha de 900 a 1000 ml. de capacidad, cerrados con tapón de algodón, y se calentaron en autoclave hasta vapor, para eliminar la flora acetobacteriana.

El material para siembra, fueron virutas, que se distribuyeron de tal modo que una buena porción de las mismas emergiera de la superficie del líquido, disposición que según Henneberg (6) es necesaria para que se produzca la acetificación.

Se incubó a 30°C, extrayéndose periódicamente y en forma estéril 2 ml. de líquido para determinar la acidez total.

Los medios empleados para el aislamiento de los microorganismos acumulados en las virutas de los ensayos precedentes, fueron de igual composición que los destinados a la acetificación agarizados al 1,7%. Se los designó con la letra D seguida del número correspondiente a su composición.

Las placas respectivas, se obtuvieron mezclando dentro de la caja de Petri estéril, iguales volúmenes de las soluciones hidro-aceto-alcobólicas con o sin melaza, preparadas a doble concentración, con agar al 3,4% licuado. Previamente, se había procedido a la esterilización por separado, del agar a 1 atmósfera durante 20 minutos en autoclave y de las soluciones por calentamiento hasta vapor.

El material para la siembra, se obtuvo del raspado de la viruta tal como se procedió en (1). De acuerdo con la procedencia y para no someter a los gérmenes a cambios bruscos de naturaleza del medio, se realizó la siembra de la siguiente manera: de A 1 y A 8 a: D 1, D 5, D 8 de A 2 y A 9 a: D 2, D 5, D 9

de A 3 y A 10 a: D 3, D 5, D 10, de A 5 y A 11 a: D 5, D 11
2 Aislamiento directo:

Entre los medios mencionados en el párrafo anterior se eligieron los de mejores resultados y se efectuaron siembras con material obtenido del raspado de virutas extraídas de generadores en marcha, empleando los procedimientos ya detallados.

De las colonias formadas en todas las placas sembradas, se tomaron las de distintas características, con ansa las grandes y alejadas, o con pipeta Pasteur estéril estirada en capilar, las pequeñas y próximas. Las colonias picadas, se pasaban a un tubo con agar agua de levadura glucosada, inclinado, extendiendo sobre la superficie cuando se trabajaba con ansa o soplando por la pipeta dentro del líquido de condensación, rompiendo la punta capilar y haciendo correr el líquido sobre la superficie cuando se usaba la pipeta Pasteur.

Se verificó luego la pureza de los cultivos así obtenidos por doble pasaje por placa de agar agua de levadura glucosada, aprovechando para eliminar simultáneamente duplicados por comparación de los caracteres de las colonias.

II) PROCEDIMIENTOS PARA EL ESTUDIO EN CULTIVO PURO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.-

Se siguió en lo posible la planilla reducida de la Sociedad bacteriólogos Americanos (1) y los métodos consignados en el "Manual of Methods" editado por la misma. Se emplearon también otros procedimientos y se efectuaron observaciones suplementarias, siempre que se lo consideró conveniente.

1) Preparación de los medios de cultivo.

a) Mosto de malta: se empleó el preparado de acuerdo con la fórmula de Henneberg (1):
para un litro de agua corriente se emplean 250 gr. de malta molida.

Se calienta el agua a 48-50°C; se agrega la malta con

fuerte agitación, procurando evitar la formación de grumos. Se mantiene la temperatura de 45°C durante media hora, para liberar el máximo de diastasas. Se aumenta luego la temperatura a 60-65°C empleando para ello alrededor de 25 minutos, manteniéndola por espacio de una hora.

Se extrae de tanto en tanto una gota de mosto, para comprobar la presencia de almidón residual con solución de iodo. No produciéndose color azul está totalmente sacarificado el mosto.

A veces se hace necesario prolongar el calentamiento a 60-65°C para transformar todo el almidón.

Se pasa entonces por un lienzo para separar la parte sólida y se hierve para coagular las proteínas, filtrando luego por papel. El filtrado es en general límpido pero siempre vuelve a precipitar en sucesivos calentamientos. Para abreviar estas operaciones puede hacerse la clarificación del modo siguiente: Se enfría el filtrado hasta 50°C, se añade clara de huevo (la de un huevo por cada 2 á 3 litros de mosto) y se calienta hasta obtener buena coagulación. Se pasa dos veces por filtro con algodón.

Una vez clarificado, se determina su densidad diluyendo luego hasta 10 % de azúcar.

Se esteriliza por tindalización a 100°C por media hora cada vez, en 3 días consecutivos.

b) Agua de levadura: se utilizó obtenida de acuerdo con la fórmula de Beijerinck.- Se deshacen 200 gr. de levadura de cerveza en 1 litro de agua corriente usando al principio pequeñas cantidades de agua. Se añade una clara de huevo y se agita hasta homogeneizar bien el líquido. Se calienta en autoclave a 115°C durante 20 minutos y se deja reposar luego hasta el día siguiente. Se decanta entonces el líquido sobrenadante a través de un filtro de pliegues, pasando recién en ese momento la sustancia coagulada y dejándola escurrir. Se lleva al volumen

primitivo con agua corriente. Se emplea con o sin 1 % de glucosa.

Hasta aquí la fórmula clásica. A través de ensayos realizados se ha visto la conveniencia de añadir cistina en la proporción siguiente: 5 ml de una suspensión al 0,5% de esa sustancia por cada 100 ml. de medio, es decir, la concentración final es de 0,025 %. Esa suspensión se agrega antes de llevar a volúmen, después de la filtración.

El pH del medio resultante es aproximadamente 6 y en caso de diferir sensiblemente de ese número, se ajusta hasta obtenerlo. Se esteriliza en autoclave a 110°C durante media hora.

Para solidificar los medios anteriores se agregó 1,7 % de agar o 15 % de gelatina de acuerdo con las necesidades. Empleando gelatina se ajustaba el pH a 7 y se esterilizaba por tindalización.

e) Agua de peptona con cistina.- Se disuelve 1 % de peptona en agua corriente y se añade cistina en la misma proporción que en el agua de levadura.

2) Método de siembra.-

Para uniformar el estado fisiológico del material para la siembra, se siguieron en líneas generales las indicaciones de Tósić y Walker (1) obteniendo por sucesivos repiques en tubos con agar inclinado de agua de levadura glucosada con cistina, cultivos de 48 horas. De estos se tomaba un ansa de 3 mm. de diámetro, lleno y se suspendía en un tubo con 2 ml. de solución de cloruro de sodio al 8 % sembrando luego una ansa del mismo por cada tubo. Salvo indicaciones contrarias se incubó siempre a 30°C.

3) Características morfológicas.- a) Forma y tamaño; fueron observados en preparados negativos obtenidos por la ejecución de "frotis" hechos con nigrosina de acuerdo con la descripción del "Manual of Methods". Se tomó material de cultivos en estría sobre agar de levadura glucosada con cistina a los

b.- Agrupación celular y movilidad; se observaron sobre cultivos de 24 horas en cámara húmeda. Para prepararlos se usaron porta-objetos excavados, flameados y dejados enfriar con la excavación hacia abajo. Se rodeó ésta con un aro de vaselina fundida, mediante llama pequeña, sobre el mismo pincel pequeño que se usa para la aplicación. Los cubre objetos, preferentemente de 20 x 20 mm., se esterilizaron a la llama sostenidos por uno de sus vértices con pinza de Comet. Sobre una de sus caras, preferiblemente la que miraba hacia abajo durante el enfriamiento, se depositaron de 3 a 5 gotitas con ansa, de acuerdo con el tamaño de las mismas, de agua de levadura glucosada con cistina.

Sostenido siempre el cubre con la pinza, se siembra luego con el cultivo a estudiar, tomando material con un hilo de platino de las suspensiones obtenidas según 2).

Después de esto, se colocó el cubre sobre el aro de vaselina que rodea la excavación, presionando sobre el mismo hasta cerrar la cámara que se terminó de asegurar bordeando el cubre objetos con vaselina fundida, aplicada con el mismo pincel.

El cubre se colocó en la estufa e incubó a 30°C.

c) Coloración de Gram; fué hecha empleando la técnica de Kopeloff y Beerman descripta también en el "Manual of Methods", sobre preparados obtenidos de cultivos de iguales condiciones que 1.-

d) Tinción de las películas con iodo y ácido sulfúrico; se siguió la técnica indicada por Henneberg (1) -tomo 2 pág.219, usando como solución de iodo la de Lugol del método de Kopeloff y Beerman (ver 3).

4) Desarrollo en medios sólidos. A) Colonias en cajas de Petri; la descripción de las mismas fué hecha empleando como medio de cultivo agar de levadura glucosada con cistina y efectuando las siembras por el método de bandas en superficie, usando espátula de platino, partiendo de las suspensiones obtenidas según 2).-

b) Crecimiento en agar estria y en punción en gelatina: usando como medio el agua de levadura glucosado con cistina y sea agarizado o gelatinizado; se procedió de acuerdo con las indicaciones del "Manual of Methods", observando a los 7 y a los 14 días.

5) Desarrollo en medios líquidos.- Los medios líquidos empleados han sido: agua de levadura glucosada con cistina y agua de peptona glucosada con cistina, que se sembraron según 2) haciendo la descripción del crecimiento a los 7 y 14 días de acuerdo con las normas del manual antes citado.

6) Características fisiológicas.- a) Influencia de la temperatura; para estudiarla se incubaron a temperatura ambiente (20°C), a 30°C, 33°C, 37°C y 45°C cultivos en agar inclinado de agua de levadura glucosada con cistina, observando la magnitud del crecimiento entre los 7 y 14 días.

b) Influencia del oxígeno, fué comprobada sembrada por dilución 0,5 ml. de la suspensión según (b) en tubos con 10 ml de agua de levadura glucosada con cistina y añadida de 1 % de agar.

En el momento de la inoculación a una temperatura no superior a 37°C se mezcló con la misma pipeta enfriando luego rápidamente.

7) Características bioquímicas.- a) Acción sobre los hidratos de carbono y sustancias afines; estas observaciones se hicieron siguiendo el procedimiento recomendado por Soriano (1).

El medio de cultivo empleado fué agua de peptona con cistina y 0,25 % de agar, al que se añadieron 8 ml por litro de una solución acuosa saturada de bromocresol púrpura. Este medio se distribuyó en tubos de ensayo comunes.

Por otra parte se prepararon soluciones al 10 % de las sustancias a ensayar distribuidas en tubos comunes y esterilizados por tindalización. Además se esterilizaron tubos pequeños (aproximadamente 10 x 1 cm) cerrados con tapón de algodón

en cantidad suficiente para los azúcares y los cultivos que debían ensayarse cada vez. Estos tubos se dividieron por lotes, tantos como sustancias deseaban emplearse más uno, cada uno con tantos tubos como cultivos que se sembrarían más uno. Cada lote menos uno, se marcó con una letra o un número característico, para cada sustancia, colocándose luego en todos los tubos del mismo lote 2 gotas de la solución al 10 % de la sustancia correspondiente a la marca de ese lote; menos el lote con tubos sin marcar que quedaron vacíos.

Se licuó el medio de cultivo por ebullición en baño maría, enfriando hasta la temperatura más baja posible sin solidificación del medio. Se dispersó ahora una ansa de cultivo de 48 horas -ver 2).- en cada uno de estos tubos, se homogeneizó con pipeta graduada de 10 ml estéril, y se repartió a razón de 1 ml en un tubo de cada lote con marca y también del sin ella, tubo este último que sirvió para comprobar la no fermentabilidad del medio. Todos los tubos con marca sembrados con un cultivo determinado, incluso aquél sin azúcar se reunieron, marcándose uno de ellos con la característica del cultivo.

Por otra parte se fundió un tubo con medio de cultivo y se lo repartió sin sembrar en cada uno de los tubos sobrantes de los distintos lotes para control de la esterilidad de las soluciones de las especies químicas empleadas.

De este modo se verificó la producción de ácido por las de bacterias estudiadas, así como la de gas, por la formación de burbujas en la masa del agar blanco, a partir de; arabinosa, levulosa, glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa, dextrina, etanol, glicerina, manita y sorbita.

Además se averiguó la transformación de la sorbita en cuerpos de naturaleza cetónica (seguramente sorbosa) utilizándose para detectarlos la reacción de Seliwanoff (1). En atención a la necesidad de no emplear el HCl en concentración superior al 12 % expresado en gas clorhídrico- Mazzocco y Rietti (1)- y considerando las cantidades extremadamente pequeñas de sorbosa e-

ventualmente presentes, se procedió del siguiente modo: en lugar de preparar el reactivo disolviendo 0,05 gr. de resorcina en 33 ml de HCl (densidad 1,19) más 66 ml de agua destilada se lo disolvió en una mezcla de 33 ml de HCl de esa densidad y 33 ml de agua destilada; se tomaron luego 2 ml de esta solución y se mezclaron con el ml de solución a investigar del que se disponía, continuando después en la forma acostumbrada: calentamiento a ebullición por no más de 30 segundos, enfriamiento y disolución del posible precipitado pardo rojizo en el alcohol. El tubo con sorbita no sembrado se usó como testigo.

b) Reacción de Voges Proskauer y al rojo de metilo; se llevaron a cabo sobre cultivos de 7 días sembrados según 2) en agua de levadura glucosada con cistina y ateniéndose a las técnicas del ya citado "Manual of Methods".

c) Formación de catalasa; para observarla se sembró en forma "standard" en tubos con agar inclinado de agua de levadura con cistina. A los 7 días se cubrieron los cultivos obtenidos con agua oxigenada aproximadamente 0,5 N, verificándose la producción de burbujas de gas oxígeno proveniente de la descomposición del agua oxigenada por acción de la catalasa.

d) Formación de indol y de hidrógeno sulfurado; se investigó siguiendo las recomendaciones del manual americano con papeles de filtro embebido en solución de ácido oxálico (reacción de Gneza para indol) y de acetato de plomo, previamente secados y sujetos en la parte superior del tubo con el mismo tapón de algodón. El medio utilizado fue agua de peptona glucosada con cistina que se inoculó con la suspensión standart. Los ensayos se dieron por terminados a los 14 días.

e) Reducción de nitratos; se ensayó en agua de levadura glucosada con cistina añadida de 0,1 % de nitrato de potasio; se sembró con la suspensión de 2) y se verificó la presencia de nitritos cada tres días a partir del segundo y hasta los catorce.

La reacción de caracterización empleada fue la de Peter

Griess modificada por Ilosva, consignada en el manual antes mencionada y que se practicó colocando una gota de la solución a investigar, tomada con ansa estéril, sobre un vidrio de reloj mezclándola luego sucesivamente con una gota de la solución de alfa-naftilamina y otra de la de ácido sulfanílico, verificando la aparición de color rojo rosado.

f) Acción sobre la leche; se sembró en leche desoremada, tornasolada y esterilizada por tindalización, describiendo los posibles fenómenos de acuerdo con las indicaciones dadas por el manual de los americanos.

CAPITULO II

INVESTIGACIONES EFECTUADAS

I) AISLAMIENTOS.- De acuerdo con los fines perseguidos, el material para los estudios microbiológicos procedió en su totalidad de transformadores rápidos tanto industriales, como del aparato que funcionó como planta piloto.

Para mayor claridad en la exposición, se dividieron los cultivos de acuerdo con el aparato de origen, consignándose si fueron virutas o vinagre el elemento intermedio en el aislamiento. Se ha diferenciado así mismo, en el caso de los aislamientos por enriquecimiento previo, con respecto a la naturaleza del medio empleado para preparar las cajas donde se extendió el material enriquecido.

En lo que se refiere al empleo de los medios utilizados con esa finalidad, agua de levadura y mosto de malta, se encontró que el primero resultaba mucho más conveniente, y no sólo por la abundancia de crecimiento sino también por el tiempo requerido para observarlo. Por esta razón se ha adoptado el agua de levadura como medio básico para las descripciones descartando el mosto de malta.

Por otra parte pudo comprobarse durante el empleo de los medios solidificados con agar que el agregado de una menor proporción de éste, favorecía el desarrollo. De ahí que se prepararan añadiendo 1,7 % del gelificante en lugar de los 2 % comúnmente utilizados, como ya se dijo en el párrafo de medios de cultivo del capítulo de métodos.

1) Transformador industrial.- Se partió de virutas, mejor del raspado de las mismas del generador N° XIII del establecimiento de A.H.P. de esta Capital.

a) Aislamiento previo enriquecimiento.

Medio 1: no se observó desarrollo

Medio 2 : película muy resistente con puntos más espesos. Al agitar cae entera.

Agua de agua de levadura :

36: colonia pequeña, elevada, lisa, de borde oscuro.

37: colonia mediana, elevada especialmente en el centro, lisa, centro opaco.

Agar de mosto de malta:

66: colonia de iguales características que 36.

67: colonia pequeña, convexa, lisa, traslúcida.

Medio 3 : no se observó desarrollo.

Medio 4 : película jaspeada, que se deshace con dificultad. Al agitar cae en jirones. Líquido turbio.

Agar de agua de levadura:

25: colonia elevada, lisa, borde más oscuro.

26: colonia convexa, lisa, traslúcida.

Agar de mosto de malta:

60: colonia grande, convexa, lisa, traslúcida, centro más oscuro, mucosa.

61: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.

Medio 5 : película de espesor diverso, las partes más gruesas tenían aspecto húmedo. Al agitar cae sin deshacerse.

Agar de agua de levadura:

23: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.

24: colonia grande, convexa, lisa, traslúcida, mucosa.

Medio 6 : velo tenue sobre la superficie libre del líquido y las paredes del recipiente.

Agar de agua de levadura:

5 : colonia grande, convexa, lisa; entero, traslúcida.

34: colonia grande, convexa, lisa, ligeramente ondulado, centro más opaco.

35: colonia semejante a la 34 pero con zona central opaca más extensa.

Agar de mosto de malta.

13: colonia pequeña, convexa, lisa, traslúcida.

14: colonia mediana, convexa, lisa, poco traslúcida.

64: colonia pequeña, convexa, lisa, centro más oscuro.

Medio 8 : no se observó desarrollo.

Medio 9 : película muy resistente, con partes más gruesas de forma alargadas orientadas en la misma dirección.

Agar de agua de levadura:

57: colonia pequeña, elevada, lisa, borde más oscuro.

58: colonia mediana, poco elevada, lisa, poco traslúcida, mucosa.

59: colonia semejante a la 58 pero menos traslúcida.

73: colonia mediana, elevada, lisa, opaca.

74: colonia pequeña, convexa, lisa, traslúcida.

Medio 10: película con partes más gruesas de forma irregular.
Al agitar cae en jirones.

Agar de agua de levadura:

32: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.

33: colonia mediana, convexa, lisa traslúcida.

Agar de mosto de malta:

29: colonia pequeña, elevada, ligeramente rugosa, opaco

30: colonia mediana, convexa, lisa, traslúcida.

31: colonia mediana semejante a la 30 pero con borde ondulado.

Medio 11: Película no cerrada, las distintas "islas" tienen puntos más espesos. Al agitar cae en jirones enturbando fuertemente el líquido.

Agar de agua de levadura:

62: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.

63: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.

Medio 12: película no cerrada, las distintas "islas" tienen puntos más espesos de forma irregular. Al agitar cae en jirones y enturbia fuertemente el líquido.

Agua de agar de levadura:

27: colonia mediana, convexa, lisa, centro más oscuro.

28: colonia mediana, convexa, lisa traslúcida.

Medio J : película resistente, con partes más espesas. Al agitar cae entera.

Agar de agua de levadura:

12: colonia pequeña, elevada, lisa, borde oscuro.

b) aislamiento directo.-

Agar de medio D1, D3, D 11: no se observó desarrollo.

Agar de medios D5:

118: colonia pequeña, elevada, lisa, borde oscuro.

119: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.

120: colonia puntiforme, elevada, traslúcida.

121: colonia mediana, convexa, lisa, traslúcida.

2) Transformador piloto N° 1.

a) Partiendo de virutas.

aa. Aislamiento previo enriquecimiento.

Medio 1: no se observó desarrollo

Medio 2: película que al agitar cae en jirones, líquido turbio.

Agar de agua de levadura:

45: colonia mediana, convexa, lisa, centro más oscuro.

46: colonia mediana, convexa, con arrugas finas, ondula-

do, centro más oscuro.

Agar de mosto de malta:

- 47: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.
- 48: colonia mediana, arrugada, opaca.

Medio 3 : no se observó desarrollo.

Medio 4 : película no cerrada. Las "islas" no se deshacen al agitar ni se hunden.

Agar de agua de levadura:

- 38: colonia mediana, elevada, arrugada, translúcida, mucosa.
- 39: colonia mediana, elevada, arrugada, opaca, mucosa.
- 52: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.
- 53: colonia mediana, elevada, lisa, borde oscuro.
- 54: colonia pequeña, convexa, lisa, translúcida.

Agar de mosto de malta:

- 40: colonia mediana, elevada, arrugada, ondulado, opaca.

Medio 5: película seca, arrugada con consistencia de papel.

Agar de agua de levadura:

- 43: colonia pequeña, convexa, lisa, oscura en el centro, mucosa.
- 44: colonia mediana, convexa, lisa, oscura en el centro.

Medio 6 : aro delgado y película que al agitar se deshace y enturbia fuertemente.

Agar de agua de levadura:

- 50: colonia pequeña, convexa, lisa, translúcida.
- 51: colonia mediana, convexa, lisa, translúcida, mucosa.
- 68: colonia puntiforme, elevada, lisa, translúcida.
- 69: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro, mucosa.
- 70: colonia grande, elevada, lisa, borde más oscuro.
- 71: colonia mediana, elevada con rugosidades, ondulado, más oscura en centro y borde.
- 72: colonia mediana, elevada, rugosa, entero, más oscura en centro y borde.

Medios 8, 9, 10 y 11: no se observó desarrollo

Medio 12 : película con partes espesas que al agitar se deshace y enturbia.

Agar de agua de levadura:

- 41: colonia mediana, convexa, arrugada fina, opaca, mucosa.
- 42: colonia mediana, elevada, arrugas opacas, ondulado, mucosa.

Agar de mosto de malta.

- 65: colonia grande, elevada, rugosa, arrugas opacas.

Medio J : película con partes más espesas. Poco resistente, al agitar cae en jirones, líquido turbio.

Agar de agua de levadura:

- 1: colonia grande, elevada, borde más oscuro. Seca.
- 15: colonia pequeña, convexa, lisa, translúcida.
- 16: colonia pequeña, convexa, lisa, centro más oscuro.

Agar de mosto de malta:

- 3: colonia grande, elevada, borde más oscuro. Seca.
- 17: colonia pequeña, convexa, lisa, translúcida.
- 49: colonia pequeña, muy parecida a 17, aparece más translúcida.
- 19: colonia mediana, elevada, lisa, borde más oscuro.

ab) Aislamiento directo.-

Agar de medios D1, D8, D 11: no se observó desarrollo.

Agar de medio D5:

- 106: colonia convexa, lisa, centro más oscuro.
- 107: colonia semejante a 106 pero con centro oscuro más extenso.

b) Partiendo de vinagre turbio.-

Medio 2 : película tenue

Agar de agua de levadura

- 7: colonia mediana, convexa, lisa, translúcida.
- 55: colonia pequeña, elevada, lisa, borde más oscuro.
- 56: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.

Agar de mosto de malta.

- 8: colonia mediana, elevada, lisa - rugosa, borde más oscuro.
- 20: colonia mediana, elevada, rugosa, opaca.
- 21: colonia grande, convexa, lisa, translúcida.

Medio 8 : no se observó desarrollo.

Medio 11 : película con partes más espesas, muy resistentes, al agitar cae entera.

Agar de agua de levadura.

- 11: colonia grande, convexa, lisa, translúcida, algo ondulado el borde.
- 22: colonia puntiforme, elevada, lisa, opaca.

Agar de mosto de malta:

- 10: colonia grande, convexa, lisa, translúcida, entero.

c) Partiendo de un vinagre estacionado.-

Se tomó material de los grumos que se habían formado en el producto y se los extendió en caja con placa de agar de agua de levadura:

- 1: colonias elevadas, arrugadas, borde más oscuro.

3) Transformador piloto N° III. Debiéndose suspender el funcionamiento de este generador por resultar inservible el recipiente construido de madera de haya, se aprovechó el recipiente con los gérmenes que sobre él se habían multiplicado, para llevar a cabo los ensayos de acetificación en frascos, descritos en el capítulo de métodos párrafo 1b.

Los resultados de las transformaciones se han reunido en el grupo de gráficos N° 1, en el que se ha representado en abscisas el tiempo de incubación y en ordenadas la acidez total expresada en ácido acético.

Los distintos gráficos en sí carecen de interés, salvo el hecho de poner de manifiesto la superioridad de los medios N° 5, 8 y 11 sobre los demás ensayados, para este tipo de comprobación.

De todo este material se sembraron en placas de agar de agua de levadura, pequeñas porciones de las películas y del líquido siguiendo los procedimientos ya indicados. Por otra parte se extendió de acuerdo con lo dicho en métodos, el líquido de raspado de las virutas obteniéndose como resultado al lado de las colonias de bacterias, otras de hongos que se desecharon una vez reconocidos como tales macro- y microscópicamente.

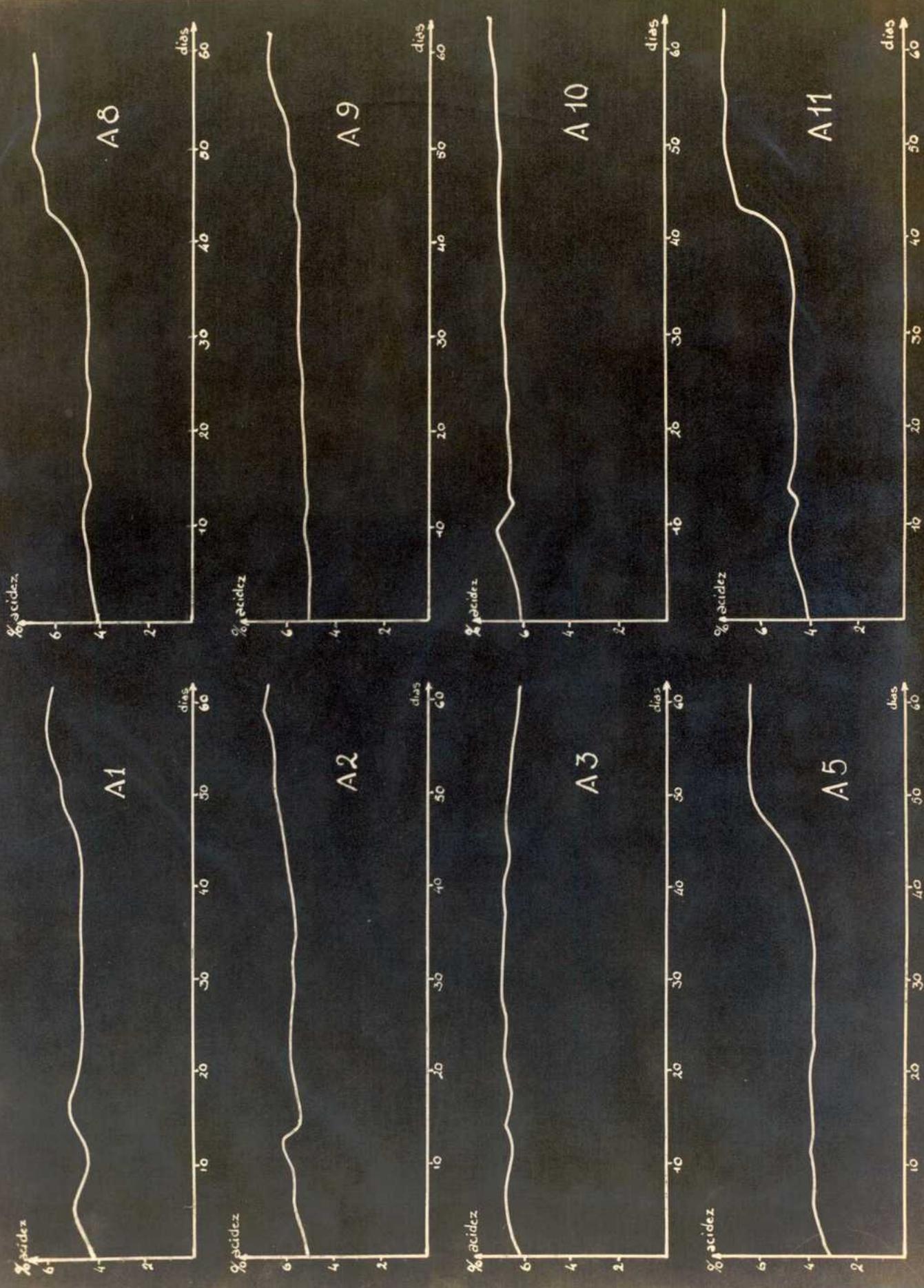
Para mayor claridad, se han separado los cultivos, cuyas colonias se describen a continuación, de acuerdo con el medio empleado para la acetificación, designándolos con la letra A seguida del número de ese medio.

1. Partiendo de las películas:

- A1: Película que se hunde entera sin deshacerse ni enturbiar.
- 201: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro, mucosa.
- 202: colonia chica; poco elevada, rugosa, seca.
- 203: colonia chica, muy elevada, lisa opaca, entero.
- 204: colonia mediana, muy elevada, lisa, opaca, lobado.
- 205: colonia chica convexa, lisa, centro más oscuro, mucosa.
- 206: colonia puntiforme, convexa, lisa, translúcida.

- A3: película tenue con pequeñas nudosidades, resistente, no se hunde. Líquido limpio.
- 207 : colonia grande, convexa, lisa, translúcida.

GRAFICO I. - RESULTADOS DE LA ACETIFICACION EN FRASCOS. -



- A 5 :** película mucosa, resistente, hundida
212: colonia mediana, muy elevada, lisa, opaca.
213: colonia grande, muy elevada, lisa, opaca, ondulado.
214: colonia puntiforme, elevada, lisa, translúcida.
- A 8 :** película cerrada, poco resistente, que se deshace en jirones que caen, líquido turbio.
218: colonia puntiforme, convexa, lisa, translúcida.
219: colonia grande, muy elevada, lisa, opaca.
220: colonia mediana, elevada, arrugada, opaca.
221: colonia grande elevada, lisa, borde más oscuro.
- A 9 :** película delgada, con nudosidades, poco resistente, que se deshace en jirones que caen. Líquido turbio.
222: colonia grande, convexa, lisa, translúcida.
223: colonia mediana, elevada, rugosa, borde más oscuro.
224: colonia mediana, convexa, lisa, poco translúcida.
225: colonia pequeña, convexa, lisa, opaca.
- A 10:** película muy parecida a la formada en A 9
208: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.
209: colonia pequeña, muy elevada, lisa, opaca.
210: colonia puntiforme, convexa, lisa, translúcida.
211: colonia mediana, muy elevada, lisa opaca.
- A 11:** película tenue con nudosidades muy semejantes a la formada en A 9.

La caja correspondiente tuvo que desecharse por haber sido invadida por anguilulas, procedentes sin duda de las virutas de este único aparato que fuera acetificado con vinagre sin filtrar. En el líquido del ensayo de acetificación respectivo fué observada la presencia de esos nematodes, en número escaso, sin habérsele dado importancia.

Cabe dejar constancia que también en los líquidos de los ensayos A9 y A 10 se observó la existencia de anguilulas sin que haya tenido las consecuencias de este caso particular.

2) Partiendo de las virutas.

- A 1 - D 1:**
84: colonia puntiforme, convexa, lisa, translúcida.
92: colonia puntiforme, convexa, lisa, translúcida.
93: colonia pequeña, convexa, lisa, translúcida.
- A 1 - S 5:**
88: colonia pequeña, elevada, lisa, borde más oscuro.
90: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.
91: colonia pequeña, convexa, lisa translúcida.

- A 1 - D 8, D 11: no se observó desarrollo
- A 2 - D 2:
95: colonia grande, marrón clara, lisa, convexa, mucosa.-
- A 2 - D 5, D 9, D 11: no se observó desarrollo.
- A 3 - D 11:
97: colonia grande, elevada, rugosa, seca.
98: colonia semejante a la 97 pero más oscura.
99: colonia grande, convexa, lisa, opaca, seca.
- A 3 - D 3, D 10: no se observó desarrollo
- A 5 - D 5: no se observó desarrollo
- A 5 - D 11:
113: colonia grande, elevada, rugosa, borde ondulado y más oscuro.
114: colonia grande, elevada, lisa, borde entero y más oscuro
115: colonia grande, elevada, lisa, opaca.
116: colonia pequeña, lisa, elevada, opaca.
117: colonia pequeña, lisa, elevada, borde más oscuro.
- A 8 - D 1, D 8, D 11: no se observó desarrollo
- A 9 - D 2:
94: colonia grande marrón clara, convexa, lisa, translúcida, mucosa.
- A 9 - D 5, D 9, D 11: no se observó desarrollo.
- A 10 - D 11:
96: colonia grande, elevada, rugosa, seca.
105: semejante a la 96 pero mucho más pequeña.
- A 10 - D 3, D 5, D 10: no se observó desarrollo.
- A 11 - D 11:
102: colonia grande, marrón clara, convexa, lisa, translúcida, mucosa.
103: colonia pequeña, convexa, centro más oscuro.
104: colonia pequeña, convexa, translúcida.
- 3) Partiendo de los líquidos
- A 1)
130: colonia pequeña, elevada, lisa, borde más oscuro.
132: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca, borde ondulado.

- A 2) 131: colonia mediana, elevada, lisa, opaca, borde entero.
- A 8) 134: colonia grande, lisa, convexa, traslúcida.
- A 11) 133: colonia grande, convexa, lisa, centro más oscuro.
- II). comparación de las colonias aisladas (en placas de agar de agua de levadura glucosada).

Como se adelantó en el capítulo de métodos (párrafo 1) estas comparaciones fueron llevadas a cabo para eliminar los duplicados y verificar simultáneamente la pureza de los cultivos. Como resultado de esta última operación debieron sumarse a las cepas existentes otras que se detallan a continuación:

Cultivo del transformador industrial:

- 26a: colonia pequeña, elevada, lisa, opaca.
- 73,1: colonia grande marrón clara, elevada, lisa, con centro más oscuro.
- 73,2: colonia grande, elevada, lisa traslúcida.

Cultivos del transformador experimental N° 1:

- 51o : colonia elevada, lisa, borde entero, opaca.
- 51t : colonia convexa, lisa, traslúcida y centro más oscuro.
- 56₂ y 56₁₆: provenientes de dos cepas con características 56, que se diferenciaban por formar o no respectivamente, películas sobre el agua de condensación en el fondo de los tubos con agar inclinado.

La agrupación de acuerdo con el aspecto de las colonias ha sido la siguiente:

- 1) circulares, convexas, lisas, borde entero, traslúcidas
a) con centro más oscuro:

- x) cultivos aislados del transformador industrial: 26-28-37-59-60-62-73, 1-119-120-121.
 - y) cultivos aislados del transformador experimental № 1: 7-10-15-16-17-19-21-33-42-43-44-45-46-49-50-51-52-56₂·56₁₆-63-70-106-107.-
 - z) cultivos aislados del transformador experimental №III: 89-91-95-103-132-134-207-208-211-212-219-224-
- b) sin centro más oscuro:
- x) cultivos aislados del transformador industrial: 13-14-24-27-30-31-33-34-34-64-73, 2-74-
 - y) cultivos aislados del transformador experimental № I: 3-11-40-41-
 - z) cultivos aislados del transformador experimental № III: 102-207-222-
- c) semejantes a b) pero puntiformes:
- cultivos aislados del transformador experimental № III: 82-84-92-104-206-210-214-215-216-
- 2) circulares elevadas, lisas, borde entero y más oscuro:
- x) cultivos aislados del transformador industrial: 5-25-29-32-36-57-58-63-118-
 - y) cultivos aislados del transformador experimental № 1: 1-39-47-53-54-55-65-
 - z) cultivos aislados del transformador experimental № III: 88-114-117-130-221-
- 3) circulares, elevadas, lisas, borde entero, opacas:
- x) cultivos aislados del transformador industrial: 12-26b-61-66
 - y) cultivos aislados del transformador experimental №I: 8-22-51o.
 - z) cultivos aislados del transformador experimental № III: 90-93-94-95-115-116-131-204-209-213-217-220-225
- 4) circulares elevadas, lisas o rugosas, borde entero u ondulado, opacas:

- y) cultivos aislados del transformador experimental
Nº I: 20-48.
- z) cultivos aislados del transformador experimental
Nº III: 113-202-218-223.
- 5) circulares, elevadas rugosas, borde entero más oscuro:
cultivos aislados del transformador experimental Nº I:
1^v-69.
- 6) circulares, elevadas, rugosas, borde ondulado, centro y
borde más oscuro: cultivos aislados del transformador ex-
perimental Nº I: 71-72
- 7) circular, elevada, lisa, borde entero, opaca con anillo
concéntrico más traslúcido: cultivo aislado del transfor-
mador industrial: 23
- 8) colonias distintas de las anteriores que provienen proba-
blemente de contaminaciones: 97-98-105-133.

De cada grupo de cultivos, así definido por las caracte-
rísticas de las colonias de las mismas, se eligió uno para
realizar su descripción completa de acuerdo con las normas ya
señaladas. En algunos casos, en que pudieron apreciarse peque-
ñas diferencias entre los cultivos, que sin cambiarlos de agri-
pación, permitían su distinción de los demás, se separaron
también estos para su estudio detallado. Todo, para que el
conjunto de gérmenes a describir fuera lo más representativo
posible del material aislado de los distintos generadores.

A continuación se detallan las cepas que fueron elegidas,
indicándose el grupo al que representaban por su número de
orden:

| | | |
|----------------------|--|----------------------|
| 1 a x : 23-73, 1-121 | 1 ay : 51t-56 ₂ -56 ₁₆ | 1 az : 89-91-224-132 |
| 1 b x : 13-14 | 1 by : 3 | 1 bz : 102 |
| 2x : 5-118 | 2y : 1 | 1 c : XV |
| 3x : 12-26b | 3y : 8-51o | 2 z : 88. |
| 7 : 23 | 4y : 20 | 3 z : 93-94-131 |
| | 5 : 1 | 4 z : 218-223-113 |
| | 6 : 71 | |

Con excepción del cultivo N° 1 (grupo 2b) que se perdió por envejecimiento fueron todos estudiados e intentada su clasificación de acuerdo con las descripciones anteriores.

III.-ESTUDIO DE LOS CULTIVOS.— El método de estudio siguió en líneas generales, como ya se ha dicho, las normas del "Manual of Methods" citado anteriormente. En cada tipo de característica se ha procurado agrupar a los gérmenes con el fin de facilitar más adelante el hallazgo de las correlaciones necesarias para su clasificación.

1) Características morfológicas:

 Todos los gérmenes resultaron ser ^{no} móviles y Gram negativos, pudiendo diferenciarse por su forma y agrupación celular los siguientes grupos:

a.- bastones de 3 a 4 x 1 μ de extremo redondo rectos o generalmente curvados, observándose formas de involuación y células generalmente aisladas: 1 - 132; con algunas cadenas de pocas células: 121; no presenta cadenas ni formas de involuación: 118.

b.- bastones de 3 x 1 μ de extremo redondo, rectos o poco curvados; muchas células aisladas y algunas cadenas cortas: con involuación, 5-13-14; con poca involuación 26b-28-56₁₆.

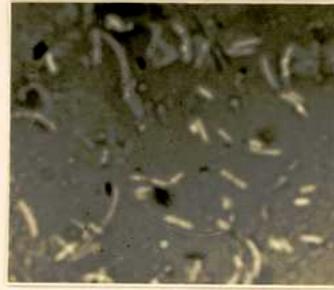
Células aisladas y frecuentemente de a pares: con poca involuación: 8-12; con mucha involuación 56₂; células aisladas y muchas cadenas largas, se observa involuación: 71-73,1.

c.- bastones de 2 a 2,5 x 1 μ generalmente rectos de extremo redondo; células aisladas y frecuentemente de a pares, se observaron formas de involuación: 102-218-223-224 con muchas cadenas largas y sin involuación 51o.

d.- bastones de 2,5 x 1 μ en su mayoría rectos y de extremo redondo; se observan células aisladas, de a pares y en cadenas cortas o largas: 88-89-91.



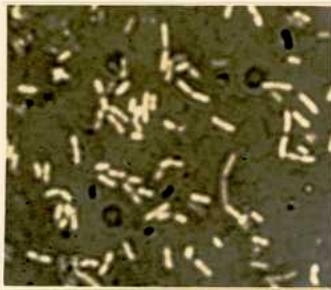
14



121



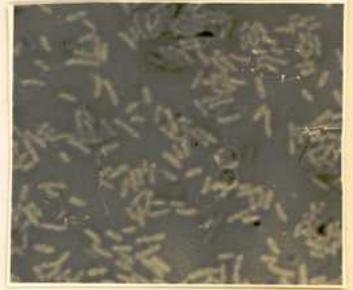
118



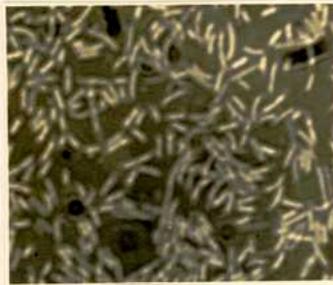
8



28



12



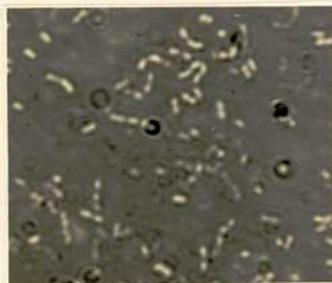
55g



102



91



51t



51s



94

LAMINA I.- Formas representativas de los grupos morfológicos de las Acetobacterias estudiadas. Aum.: X 1000

e.- bastones de 2 x 1 μ rectos de extremo redondo; células aisladas, de a pares o en cadena, involuación: 3-116; con pocas cadenas e involuación: 113-131-215.

f.- bastones de 2 x 1 μ rectos de extremo redondo; células aisladas, de a pares o en cadenas, sin involuación: 3-51t; con pocas cadenas e involuación: 113-131-215.

g.- coccobacilos de 18 x 1 μ ; células aisladas o de a pares: 20-93-94-23.

2) Desarrollo en medios sólidos:

a) Colonias en superficie de agar de agua de levadura glicosa con cistina; pueden distinguirse los siguientes tipos:

Tipo 1: grande, circular, convexa, lisa, borde entero, punto central oscuro visible a ojo desnudo;

mucosas: granulación gruesa: 1^v

granulación fina: 8-113

secas: granulación fina: 89-91-224

Tipo 2: grande, color marrón claro, circular, lisa, borde entero, convexas, con centro oscuro más o menos extendido:

mucosas: granulación gruesa: 13-14-71-73,1

granulación fina: 3-23-51t-56₁₆-88-121-118-218-223

secas: granulación gruesa: 51o
granulación fina: 56₂-215

Tipo 3: circular, poco elevada o convexa, lisa, borde entero, translúcida, mucosa:

granulación gruesa: 5
granulación fina: 102

Tipo 4: circular, pulvinada, lisa, borde entero, opaca, seca, granulación fina: 23-93

Tipo 5: circular, convexa, lisa, borde entero, opaca, seca:

granulación gruesa: 12-20
granulación fina: 20b-24-131

Tipo 6: circular, convexa o elevada, lisa, borde entero, con centro o borde más oscuro, seca, granulación fina: 132.

b) Crecimiento en estría:

ha permitido el establecimiento de algunos grupos que se han mantenido también para otras propiedades:

Tipo 1: rosario fino a filiforme, poco brillante a brillante, con película sobre el agua de condensación en el fondo de los tubos:

a) friable: 23-12-56₂-94

b) friable; algo viscoso: 1-8-20-131-215-91

c) membranoso: 93-113

Tipo 2: rosario fino, opaco, viscoso y friable, con película sobre el líquido de condensación: 132

Tipo 3: rosario fino, poco brillante, friable algo viscoso, a baja temperatura con película en el fondo del tubo, delgada: 28-56₁₆

Tipo 4: rosario fino a filiforme, sin película en el líquido de condensación:

a) viscoso y brillante: 51t-102-3

b) viscoso y poco brillante: 13-14-51o-73, 1-118-121

c) friable y poco brillante: 5-26b-71-88-89

d) membranoso y opaco: 218-223-224

3) Cultivos en gelatina (punción)

Ninguno de los cultivos determinó licuación del medio; en cuanto a los caracteres del desarrollo se encontraron los siguientes grupos netamente diferenciados:

1) crecimiento continuo o en forma de rosario fino a lo largo de la función: 1-3-5-8-12-13-14-26b-28-51o-51t-56₁₆-71-73, 1-88-89-91-102-118-121-131-132-218-223-224

2) crecimiento rizoides o arborescentes: 20-56₂-93-94-113-215

3) desarrollo en forma de campana: 23

3) Desarrollo en medios líquidos:

a) agua de levadura glucosada, con cistina:

a₁: hay formación de película:

resistente, superficial o hundida;

tíñe con iodo: 1^V-8-12-20-93-94-113-131-215-562

no tíñe con iodo: 23

débil, superficial, no tíñe con iodo, hay formación

de aro, sedimento y turbidez: 13-14-26b-28-51t-56₁₆-132

a₂: no hay formación de película con aro, sedimento y

turbidez: 5-51o-73, 1-89-118-121-218-223-224

sin aro, pero con sedimento y turbidez: 3-71-88-91-102

b) agua de peptona glucosada con cistina:

b₁: hay formación de película resistente, superficial o

hundida, tíñe con iodo: 1-8-12-20-56₂-93-94-113-131-215

no tíñe con iodo: 23

débil superficial no tíñe con iodo, no se forma aro, pero sí sedimento y turbidez: 13-14-28-51t-56₁₆-132.

b₂: no hay formación de película, se observa aro, con

turbidez y sedimento: 3-51o-89-91-218-223-224

no se observa aro, pero sí turbidez y sedimento:

5-26b-71-73, 1-88-102-118-121.

de los formadores de películas merecen ser citados especialmente: 1^V-8-20-93-94-113-215, cuyas formaciones corresponden casi exactamente con las que la literatura consigna como películas de *B.xylinum*: gruesos tapones que se amoldan a la forma de los tubos, en caso de hundirse, se emiten tenues filamentos mucosos hacia la superficie formándose una vez alcanzada la nueva película consistente Herneberg (1) .

4) Características bioquímicas: se efectuaron todos los ensayos previstos de acuerdo con el plan de trabajo establecido, encontrándose que todos los cultivos ensayados eran incapaces de formar hidrógeno sulfurado, indol y nitritos a partir de

GUADRO N° 1.-

| Cultivo N° | Arabinosa | Levulosa | Glucosa | Galactosa | Sacarosa | Maltosa | Lactosa | Rafinosa | Dextrina | Etanol | Glicerina | Manita | Sorbita | R. Seliwanoff | R. V. Proskauer | Col. con iodo | Grupo N° |
|-----------------|-----------|----------|---------|-----------|----------|---------|---------|----------|----------|--------|-----------|--------|---------|---------------|-----------------|---------------|----------|
| 51 ⁺ | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 121 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | si | 2 |
| 12 | - | - | + | L | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | si | 2 |
| 25 ⁺ | - | - | + | +L | - | - | - | - | - | + | - | - | (+)L | - | - | no | 3 |
| 132 | - | - | (+)L | (+)L | - | - | - | - | - | + | (+)L | - | - | - | - | no | 4 |
| 25 ⁺ | - | - | + | - | - | (+)L | +L | +L | - | + | + | - | - | - | - | no | 5 |
| 7 ⁺ | - | + | (+)L | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | 6 |
| 88 | - | (+)L | + | - | - | - | - | - | - | + | (+)L | - | - | - | + | - | 6 |
| 92 | - | (+)L | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | 7 |
| 3 | - | + | + | - | - | +L | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | 7 |
| 223 | - | +L | + | - | - | +L | (+)L | (+)L | - | +L | +L | - | - | (+)L | + | - | 8 |
| 218 | - | (+)L | + | - | - | +L | +L | +L | - | + | + | + | - | (+)L | + | - | 8 |
| 224 | - | +L | + | - | (+)L | +L | +L | +L | - | +L | +L | - | (+)L | (+)L | + | - | 9 |
| 89 | - | (+)L | + | - | +L | (+)L | +L | +L | - | + | +L | - | (+)L | + | + | - | 9 |
| 13 | (+)L | +L | + | - | - | - | - | - | (+)L | + | + | - | (+)L | - | - | no | 10 |
| 14 | (+)L | +L | + | + | - | - | - | (+)L | (+)L | + | + | - | (+)L | - | - | no | 10 |
| 73 ⁺ | - | +L | + | (+)L | +L | + | +L | + | - | + | + | - | (+)L | - | - | - | 11 |
| 118 | - | (+)L | +L | +L | (+)L | + | +L | +L | - | + | + | - | +L | - | - | - | 11 |
| 121 | - | +L | + | (+)L | (+)L | + | +L | + | - | + | + | - | (+)L | - | - | - | 11 |
| 510 | - | +L | + | (+)L | (+)L | +L | (+)L | (+)L | - | +L | - | - | (+)L | - | - | - | 11 |
| 28 | - | +L | + | (+)L | +L | (+)L | +L | + | - | + | - | - | - | - | - | no | 12 |
| 5616 | - | +L | + | (+)L | (+)L | + | +L | + | - | + | - | - | - | - | - | no | 12 |
| 5 | + | +L | + | +L | - | + | + | + | - | +L | + | - | +L | - | + | - | 13 |
| 102 | - | +L | + | (+)L | - | (+)L | +L | (+)L | - | +L | + | - | +L | - | + | - | 13 |
| 8 | - | +L | + | (+)L | - | +L | +L | (+)L | - | + | +L | - | - | + | + | si | 14 |
| 20 | - | +L | + | +L | - | + | +L | (+)L | - | +L | (+)L | - | (+)L | + | + | si | 14 |
| 113 | (+)L | +L | + | (+)L | - | - | - | - | - | +L | +L | - | - | + | - | si | 15 |
| 93 | (+)L | +L | + | (+)L | (+)L | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | si | 15 |
| 562 | (+)L | +L | + | (+)L | +L | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | si | 15 |
| 1 ^v | (+)L | - | + | +L | + | - | - | - | - | +L | + | + | - | + | + | si | 16 |
| 94 | (+)L | (+)L | + | (+)L | +L | + | - | - | - | +L | + | - | - | + | + | si | 17 |
| 215 | (+)L | (+)L | +L | (+)L | (+)L | - | - | - | - | +L | +L | (+)L | - | + | + | si | 17 |

nitratos, tampoco tenían acción sobre la leche. Por el contrario, todos resultaron formadores de catalasa y dan reacción al rojo de metilo positiva. En lo que respecta a las reacciones de Voges Proskauer y Seliwenoff se consignan los resultados observados conjuntamente con los de la acción sobre los hidratos de carbono y sustancias azúcares, como también de la tinción con iodo de las películas, en el cuadro N° 1.

Los virajes del indicador hasta amarillo (acidificación fuerte) se marcaron con +; hasta anaranjado amarillento (acidificación débil) con (+). En el caso de las reacciones esos signos mantienen su significado cuantitativo. Como transformación lenta (se señala con "L") se computó aquella que se producía en un lapso mayor de tres días.

5) Características fisiológicas:

Todos los cultivos sin excepción se comportaron frente al oxígeno del mismo modo: como aerobios a microaerófilos.

Con respecto a la temperatura se encontró, también para todos, que la más favorable fué 30°C. Referente a la capacidad de desarrollar a temperaturas mayores que la señalada pudieron reconocerse fácilmente tres grupos, a saber:

grupo 1: no crecen a 33 y 37°C: 1^v-26b-51t-71-88-91

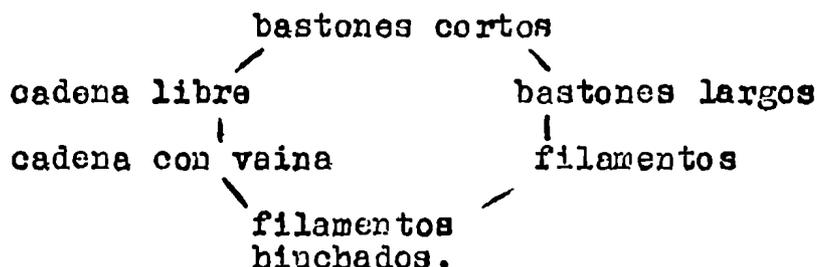
grupo 2: crecen a 33°C y no a 37°C: 3-8-12-20-51o-94-102-113-131-132-215-218-224.

grupo 3: crecen a 33 y a 37°C: 5-15-14-23-28-56₂-56₁₆-73,1-89-93-113-121-223

Ninguno de los cultivos presentó signos de desarrollo a 45°C.

IV.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.- Las características morfológicas no aportan ninguna información que pudiera resultar valiosa para la identificación de los gérmenes, objeto ulterior del presente estudio; no parece existir correlación con las demás propiedades. En realidad no podía esperarse otra cosa; basta recordar los diversos factores que Janke (1) cita

como influyentes sobre estas características. Entre ellos merecen citarse la temperatura cuya influencia estudiara Hansen (3), edad del cultivo, naturaleza física y química de los substratos, todo esto en lo que se refiere a los factores denominados externos por aquel investigador. Pero hay más, el mismo autor reconoce la necesidad de diferenciar entre las verdaderas formas de involución, estados, degenerativos de la célula y lo que se llama formas hipertróficas de resistencia de los gérmenes frente a los propios productos del metabolismo, capaces las últimas de evolucionar hacia las formas primitivas. Concibe Janke, basado en ese hecho, un ciclo evolutivo de la célula que en el caso de las bacterias del grupo rances y Pasteurianum sería:



Nada dice la literatura sobre una posible generalización de tal observación, ni se ha confirmado la presencia de vainas que haría relacionar este grupo de bacterias con las Chlamydo-bacteriales.

De cualquier manera lo anterior indica la dificultad de obtener resultados comparables: debe tenerse presente, que dado un substrato cualquiera, los diferentes gérmenes podrán actuar sobre él de muy distintas maneras y que de acuerdo con lo dicho, la morfología será dentro de ciertos límites consecuencia de ella. Se infiere entonces que sólo con una rigurosa "standardización" podrán lograrse consecuencias útiles. Que tal cosa no se ha producido queda demostrado con los resultados obtenidos.

De las observaciones realizadas sobre las características del crecimiento en medios sólidos cabe destacar la importancia de la agrupación de las bacterias de acuerdo con el

desarrollo en estría, donde se observan dentro del tipo 1 todos los gérmenes, que luego se encontrarán como formadores de películas resistentes en la superficie de líquidos. La delimitación sería casi perfecta, a no ser por la necesidad de ubicar dentro del grupo al cultivo 91, dada su facultad de formar película en el agua de condensación de los tubos, formación que nunca produce en medios líquidos. Hay que tener en cuenta también, la definición del tipo 3 así como la del 4b que reúnen microorganismos de características bioquímicas sino iguales, al menos muy semejantes.

La punción en gelatina permitió separar a los microorganismos tipo xylinum, diferenciando además 1 y 8 que por otras propiedades son los que más se alejan de ese tipo.

Si bien el aspecto de las colonias permite entrever alguna relación con las demás propiedades, la delimitación de los grupos no es lo suficientemente precisa como para obtener conclusiones para la clasificación de los cultivos. Es indudable que esta característica ha sido de gran utilidad para una comparación preliminar del material aislado, que se llevó a cabo bajo mantenimiento estricto de la igualdad de condiciones, con el objeto de eliminar aquellas cepas que resultaban idénticas en el más amplio sentido de la palabra. Como ya se dijo, pequeñas diferencias bastaron para separar más de un cultivo de cada uno de los grupos establecidos. Pero evidentemente, esta es la máxima función que puede desempeñar tal observación dentro de un estudio como el presente.

El comportamiento en medios líquidos, ha sido indudablemente uno de los criterios selectivos de mayor importancia.

Por de pronto, los dos grandes grupos que se delimitan se han mantenido para los dos substratos ensayados y más, algunos de los subgrupos también subsisten al cambiar de medio.

Lo que no resulta preciso, es la diferenciación dentro de las bacterias que no forman películas, de acuerdo con la

capacidad de producir aro sobre la pared del tubo y la superficie libre del líquido.

Pero aún aquí se observan algunos cultivos para los cuales la propiedad es constante: 510-89-218-223-224, entre los que los que lo forman y 71-88-102 entre los que no forman ese aro.

Más interesante todavía, es el hecho de que tales divisiones se corresponden en mayor o menor grado con las que resultan de la comparación de las propiedades bioquímicas.

La naturaleza celulósica de algunas de las películas (revelada por la coloración con iodo) fue otro carácter de valor para el intento de la clasificación, en especial cuando se cotejaba el resultado de esa reacción con la de Seliwanoff.

En lo que se refiere a los caracteres bioquímicos se observaron algunos generales para todos los cultivos, así, son en su totalidad formadores de catalasa, positivos para la reacción al rojo de metilo, no producen hidrógeno sulfurado, indol, ni nitritos, y no actúan sobre la leche en las condiciones de experimentación en que fueron realizadas.

El cuadro combinado (Nº 1) de las restantes propiedades estudiadas ha permitido la definición de agrupaciones que luego se constituyeron en la base de la caracterización de los cultivos.

En ese cuadro se las ha separado por medio de rayas horizontales, siendo el número consignado en la última columna el de diferenciación de cada grupo. Dentro de algunos de ellos hay diferencias cualitativas que no pesan empero, frente a los demás criterios de división. Así por ejemplo, llama la atención la acidificación de la galactosa por parte del cultivo 12 y no del 131, ambos pertenecientes al grupo 2, pero basta considerar la reacción de Voges Proskauer para justificar la delimitación del mismo, en general, en esos casos se ha dado participación también al resultado de otras observaciones y en es-

pecial al desarrollo en medios líquidos y la naturaleza de la película formada sobre estos. Con ello se han señalado los caracteres de diferenciación que más contribuyeron a establecer la probable identidad de los gérmenes estudiados. Las diferencias cuantitativas en las fermentaciones se han dejado de lado para la clasificación, habiéndose las consignado únicamente a los efectos de la descripción.

Los resultados de las observaciones sobre las propiedades fisiológicas no pudieron aprovecharse para aquel objeto, su importancia es de otro orden. Así por ejemplo, la relación con oxígeno hallada (pueden bastarse con tensiones de ese gas muy disminuídas) corrobora la conclusión que obtuviera Wüstenfeld (6) al estudiar la influencia de la reducción de la ventilación en generadores industriales.

A su vez, el hecho de haber obtenido cultivos capaces de desarrollar a 37°C, algunos de los cuales se encontraron luego identificables con B. Schüzembachii que según los datos de la literatura no crece a esa temperatura, demuestra que hubo en el transformador industrial analizado microbiológicamente, una aclimatación de gérmenes de alto poder acetificante a las condiciones imperantes en este país. Tales cepas podrían ser aplicadas para la acetificación con cultivo puro, con la finalidad ulterior de eliminar o al menos reducir los trastornos estacionales tan comunes en las fábricas argentinas.

V) CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS ESTUDIADAS.- El aprovechamiento de un cierto tipo de caracteres consignado en la literatura sobre los gérmenes acéticos, ha permitido ubicar si bien sólo aproximadamente, algunos de los cultivos estudiados.

A continuación, se detallan brevemente las distintas analogías halladas, así como las razones que las justifican.

Entre los gérmenes de esquema de fermentación sencillo está el 5lt que no forma cuerpos cetónicos de sorbita, da una película débil en medios líquidos y que podría corresponder a

B. acetii (Hansen) de acuerdo con la descripción de Henneberg (1). Con esquema simple, pero reacción de Voges-Proskauer positiva se encuentran 131 y 12 comparables con *B. Kütsingianum* o *B. Pasteuriarium* por la naturaleza celulósica de su película e incapacidad de producir sorbosa a partir de sorbita.

Seguendo con los cultivos de pequeño poder fermentativo, reacciones Seliwanoff y V. Proskauer negativas, se halla el 23 cuya película no toma color con iodo y ácido sulfúrico y que presenta analogías con *B. acetosum* (Henneberg) germen que Beijerinck (1) consideró como variedad de su *B. ranceus*.

Los cultivos correspondientes a los grupos 4 a 9 inclusive del cuadro de propiedades bioquímicas, no presentan semejanzas con ninguno de los microorganismos acéticos descritos, sin que por ello puedan considerarse como no pertenecientes a esa familia. No tiene sentido consignarlas como especies desconocidas hasta tanto no se puedan realizar estudios comparativos con cepas descendientes de las originales. Tal trabajo corresponde en realidad realizarse también para los cultivos en los que ha sido posible establecer paralelos, aunque en este caso, solo se trate de comprobar la ubicación que se les ha dado.

Los grupos 10, 11 y 12 del mismo cuadro, reúnen bacterias incapaces de producir sustancias cetónicas o de sorbita, ni acetilmetilcarbinol de glucosa, forman o películas y en los casos afirmativos éstas son débiles y se deshacen por simple agitación del líquido. Todos formaban aro en agua de levadura y de acuerdo con la facultad de acidificar sacarosa, maltosa y lactosa se diferenciaron los grupos 11 y 12 del 10 (cultivos N^o 13 y 14) que no atacan esos azúcares. Los primeros se clasificaron como semejantes a *B. Stuzembachii* distinguiendo entre 28 y 56₁₆ que no producen ácido de glicerina y sorbita y forman siempre películas sobre la superficie de líquidos, y 73, 1-118-121-51o que no dan película, pero acidifican esos alcoholes.

En realidad 510 ocupa una posición intermedia entre esas dos posibles variedades de B. Schüzembachii. Las cepas 13 y 14 se muestran parecidas a B. curvum especialmente en los que respecta a su capacidad de fermentación.

Los cultivos 5 y 102 al igual que los del los grupos 4-9 no se asemejan a las especies típicas, podría empero aceptarse una analogía con B. Schüzembachii, por agruparse en general junto con los gérmenes clasificados como tales. La mayor divergencia reside en que atacan la sacarosa y determinan reacción de Voges Proskauer positiva.

Las bacterias de las clases 14 a 17 oxidan todos la sorbita a sorbosa, todos forman películas gruesas de naturaleza celulósica y se han separado por un lado 8 y 20 que acidifican maltosa, lactosa, rafinosa, y por el otro los de los grupos 15, 16 y 17 que no los atacan. Los primeros se han considerado por esa razón análogos a B. xylinoides y los segundos a B. xylinum. Dentro del tipo xylinum, se ha dividido de acuerdo con el resultado de la reacción de Voges Proskauer, diferenciando además 1V por no acidificar la levulosa, así como por su comportamiento en punción en gelatina y con respecto a la temperatura.

La no correspondencia de los esquemas de fermentación de las bacterias estudiadas, con los consignados por otros autores en cuanto a la acción sobre algunos azúcares o alcoholes no reviste mayor importancia, por cuanto los segundos difieren entre sí para muchos de los microorganismos estudiados. En este sentido se transcriben en el cuadro N° 2 los esquemas hallados por Henneberg (1), Rothenbach (1) y Herman y Neuschul (1) para las acetobacterias probablemente representadas entre las estudiadas con excepción de B. curvum y B. Schüzembachii cuyas fermentaciones estudiadas por Henneberg y Rothenbach solo representan diferencias cuantitativas entre los resultados hallados por uno y otro autor.

CUADRO Nº 2

| | Investigador | Arabinosa | Levulosa | Glucosa | Galactosa | Sacarina | Maltosa | Lactosa | Melitosa | Dextrina | Escayola | Glicerina | Manita | Sorbita |
|--------------------|--------------|-----------|----------|---------|-----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|-----------|--------|---------|
| Bact. aceti | H | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | R | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | HN | + | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| Bact. acetosum | H | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | R | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | HN | + | (+) | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| Bact. Kitzingianum | H | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | R | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | HN | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | ? |
| Bact. pasteurianum | H | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | R | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | ? |
| | HN | + | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | ? |
| Bact. xylinum | H | + | (+) | + | + | + | - | - | + | - | + | + | (+) | ? |
| | R | - | - | + | - | (+) | - | - | - | - | + | - | (+) | ? |
| | HN | + | (+) | + | + | (+) | - | - | - | - | + | (+) | - | ? |
| Bact. xyliniodes | H | + | (+) | + | + | + | (+) | (+) | (+) | + | + | + | (+) | ? |
| | R | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ? |
| | HN | + | (+) | + | + | + | - | + | + | - | + | (+) | (+) | (+) |

H: Henneberg - R: Rothenbach - HN: Herman y Neuschuhl -

lo notable es que Hermann deja constancia de haber trabajado con duplicados de las cepas originales.

Los datos encontrados en la literatura han permitido llegar a considerar como probable las identificaciones de las especies estudiadas en este trabajo, en la forma que se ha considerado más arriba.

La confirmación de estas conclusiones y el estudio más acabado de los cultivos que no han podido ser identificados sólo podrá realizarse luego de un ulterior trabajo de sistemática de este interesante grupo de bacterias, preferentemente en comparación con los cultivos originales que debieran reunirse especialmente con este objeto.

TERCERA PARTE

OPERACION CON UNA PLANTA PILOTO

CAPITULO I

CONSTRUCCION DE UNA PLANTA PILOTO PARA LA ELABORACION DE VINAGRE POR EL METODO RAPIDO.

1) CONSTRUCCION DEL GENERADOR PILOTO.- De acuerdo con los principios de trabajo, se trata de reducir proporcionalmente dentro de lo posible, un transformador rápido de tipo normal tal como el descrito en la obra de Wüstenfelg (1) cuyas dimensiones fueron encontradas como las más apropiadas para temperaturas ambientes medias de 15 a 20°C (Sohrank (2)).

Las referencias citadas, dan para un generador de ese diseño las características señaladas en ESQUEMA N° 2.

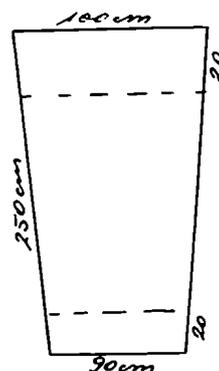
el esquema N° 2 con un espacio libre para material de relleno de aproximadamente 1,2 m³, comprendidos entre la criba en la parte superior y el contrafondo, en forma enrejado, en la inferior.

Al proyectar el aparato reducido, se tuvieron en cuenta las medidas de la parte central que contenía el relleno, dado que por razones de orden práctico tuvieron que modificarse, tanto la cámara superior como el pequeño depósito de producto terminado. Deduciendo entonces de aquellas dimensiones, resultaron para un aparato de alrededor de 3 litros de volumen para relleno estas otras:

altura 27,5 cm.

diám. supe. 13 cm.

diám. inf. 11,8 cm.; entendiéndose que se referían a la porción de generador que contendría el material de relleno.



Como desde un principio se pensó en la posterior adaptación del sistema de carga automático se aumentó la altura de la cámara superior a 8 cm. para dejar así el espacio don-

de colocar más tarde el dispositivo para cargas intermitentes.

La altura del depósito inferior, proporcionalmente correspondían 2,6 cm., se aumentó a 3,5 cm, para poder, ubicar con más comodidad el tubo de salida, así como las perforaciones para ventilación (respiraderos) que en número de cuatro se practicaron desde afuera a la altura del contrafondo y del tal modo que resultaran oblicuas de arriba hacia abajo y de fuera hacia adentro para determinar por debajo de ese falso fondo en la parte interior, Su diámetro fué de 1 cm.

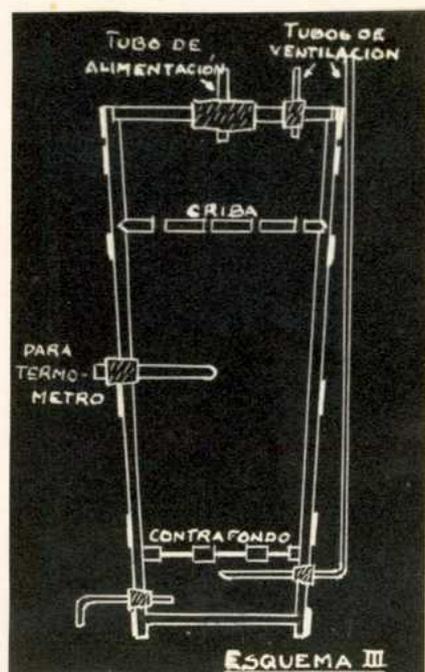
En un tipo posterior, que es el que puede apreciarse en la figura N° 1, preparado para ser colocado en termóstato, se sustituyeron esos 4 respiraderos por uno único alimentado a través de un tubo de vidrio doblado de 7 mm. de luz, que emergía de la parte superior del termóstato y terminaba en el interior del aparato, sobre el centro del mismo, en el extremo biselado para evitar la acumulación del líquido dentro de la rama horizontal de aquél.

Para la construcción se eligió madera de roble, que de acuerdo con Wüstenfeld y Kreipe (2) ha resultado ser la menos permeable a los vapores ácidos y alcohólicos. Se realizó también un ensayo empleando madera de haya impregnada con parafina una vez que se armó el aparato, resultando un fracaso absoluto: además de las filtraciones, se deformaron las due- las punto de perder solidez el recipiente. En todos los casos el espesor de las due- las fué de aproximadamente 1 cm.

El esquema N° 3 ilustra sobre la distribución interior, así como la forma de ajuste de contrafondo y criba.

Las perforaciones de la última, cortada también en madera de roble, se hicieron con mecha de 2 mm. ubicándolas sobre líneas paralelas, con 1,5 cm. de distancia entre éstas y también entre las perforaciones, cuidando que aquellas de líneas contiguas quedaran corridas entre sí medio espacio.

Para asegurar el goteo lento de las afusiones, dentro de los límites fijados en el capítulo anterior, se cerraron los agujeros de la criba parcialmente con trocitos de paja.



El contrafondo se preparó con trozos de varilla de madera colocadas paralelamente y aseguradas por igual número de otras más finas que las atravesaban perpendicularmente, formando el conjunto un enrejado. Este falso fondo descansaba sobre él del aparato mediante tres pies, ajustados en orificios verticales practicados sobre cualquiera de las varillas.

La tapa del generador se asentó en una escotadura cortada en la parte superior de la pared del aparato. En su parte central, tenía una boca para las afusiones de 3 cm. de diámetro que, cuando el aparato se colocó en termóstato, fué cerrada dejando únicamente una perforación para dar paso al tubo de alimentación de 5 mm. de luz. Tenía también un orificio para tubo de 1 cm. de luz destinado a la ventilación.

Los sunchos, distribuidos como se observa en la figura

Nº 1 se pintaron por ambos lados con una doble mano de pintura anticorrosiva al minio, con excelentes resultados.

El segundo, contado desde arriba, se provveyó de uñas para fijar el aparato dentro del termóstato.

A media altura, se practicó en la pared del generador un orificio en el que se ajustaba con tapón de corcho, un tubo de vidrio dentro del cual se alojaria el termómetro. Su extremo que miraba hacia el interior del aparato se habia cerrado a la llama.

Los pasos del armado fueron los siguientes: ubicado el falso fondo y quitados todos los sunchos menos los dos inferiores se cargaba con el material de relleno prensándolo bien.

Se colocaba luego la criba en la ranura mortada a tal efecto en la pared, del aparato, se ajustaban el tercero y cuarto suncho contados desde abajo, se ubicaba la tapa y se terminaban de ajustar los sunchos restantes. El generador se barnizó ahora por afuera, medida que resultó de suma utilidad para protegerlo contra el desecamiento desde afuera cuando funcionaba en el termóstato.

El material de relleno empleado, fueron en todos los casos las clásicas virutas de madera de haya, cuya forma puede apreciarse en la figura Nº 2 adjunta y que fueron descritas por Wüstenfeld (2) como ideales.

En la misma reproducción pueden verse las virutas pequeñas (a) que fueron utilizadas en la instalación piloto, bien prensadas dieron un relleno de relativamente gran superficie. Se las cortó de tablas cuyo tamaño fué aproximadamente un tercio de las normales empleadas para obtener la viruta tipo.



FIGURA 2.- (Tamaño natural)

II) EQUIPO PARA CARGA AUTOMÁTICA.- Se compone de dos partes fundamentales, el dispositivo de carga intermitente y el de alimentación de mezcla alcohólica.

1) el dispositivo de carga intermitente fué deducido de los sistemas llamados de "volcano": dos recipientes montados sobre un eje, uno de ellos se antepone al tubo de alimentación. Cuando se llena, el peso hace que se desplace girando sobre el eje y volcando el líquido que contenía.

Con ese movimiento ocupa el otro recipiente el lugar frente a la boca del tubo de alimentación.

Esto se realizó (esquema 4) con dos embudos de 5 cm de diámetro y un ángulo de 60° , que se montaron en la forma indicada en el esquema, sobre un trozo de madera perforado de sección cuadrada, de 2 cms de lado. Entre los embudos y paralela al eje longitudinal del trozo de madera se sujetó con hilos, una tablita de 5 mm de espesor.

Sobre ella se buscó la ubicación del eje, que debía ser tal que estando antepuesto uno de los embudos al tubo de

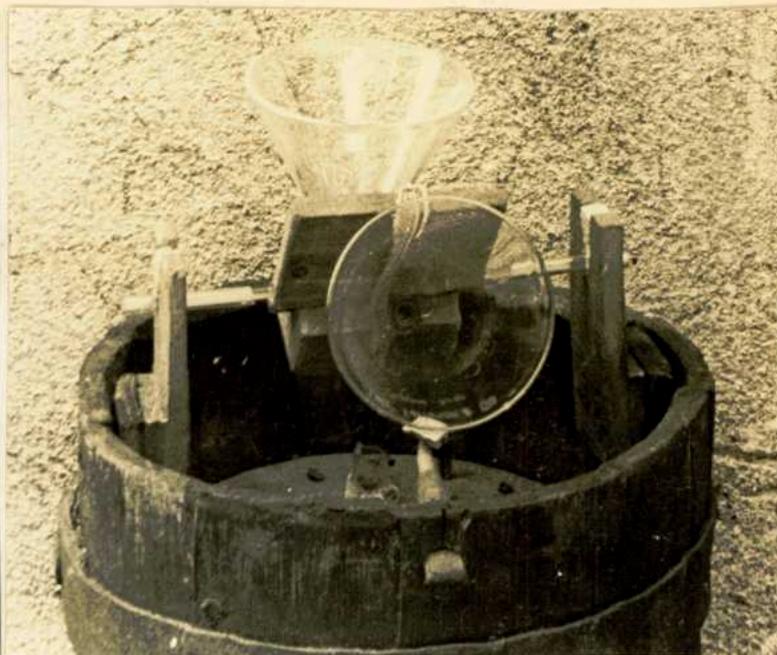
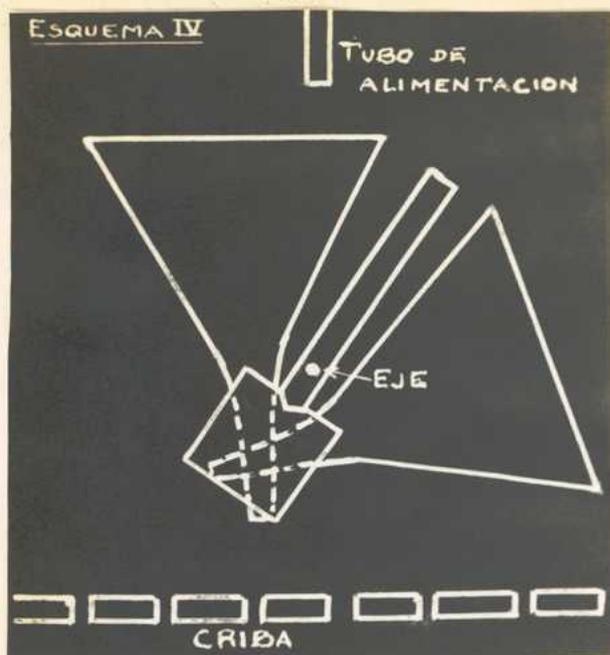


FIGURA 3.-

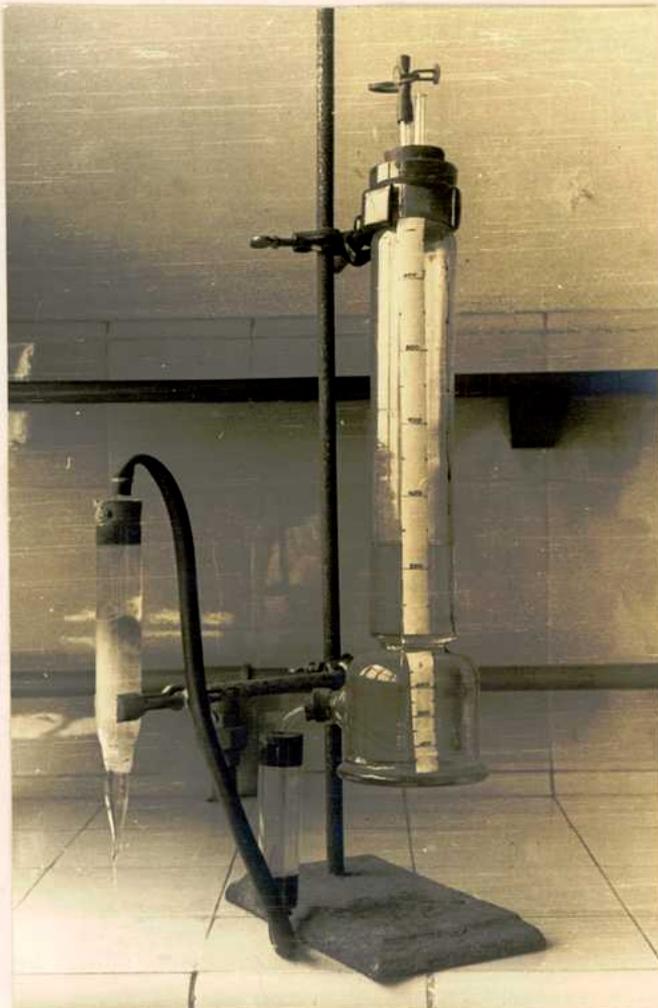
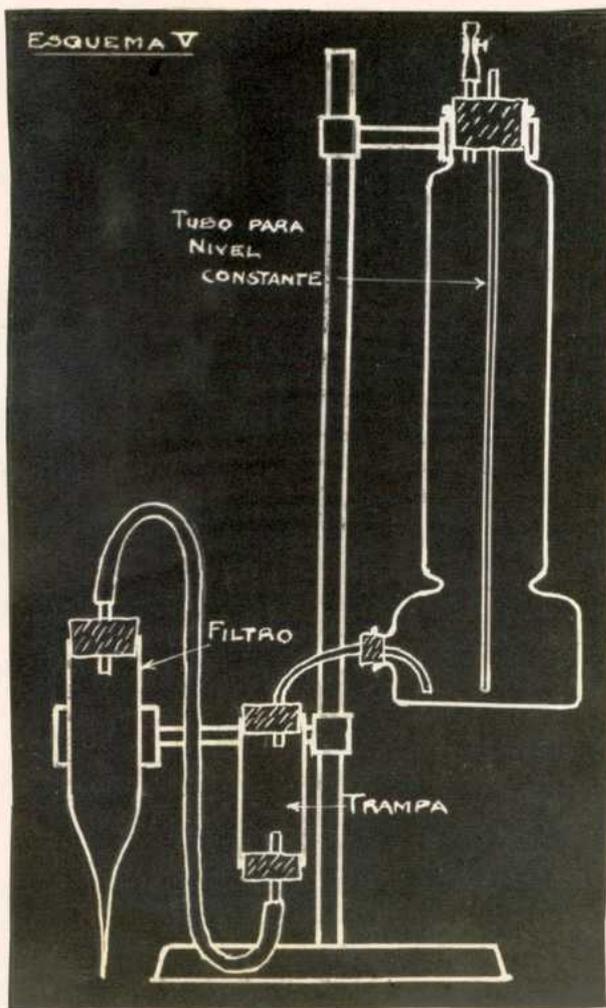
alimentación, se produjera la ruptura del equilibrio en el momento en que el embudo volcándose al fluido y anteponiéndose el otro embudo fijada la altura del eje sobre la tablita, se perforó esta longitudinalmente y se hizo pasar un trozo de varilla de vidrio que hacía las veces de eje. Los extremos del mismo giraban dentro de sendos trozos de tubo de vidrio de luz ligeramente superior al diámetro de la varilla. Estos tubos que habían las veces de bujes se acuñaron en perforaciones practicadas en la pared del transformador, a una altura conveniente sobre la criba. Su presencia evitaba el riesgo de que la madera al hincharse por acción de la humedad, dificultara el giro del eje.

La figura Nº 3 muestra uno de esos dispositivos, que funcionaron a entera satisfacción, armado sobre soportes, dado que la pared del aparato está cortada a una altura conveniente para permitir la vista lateral del sistema.

2) El sistema de alimentación de mezcla . (esquema Nº 5. y figura Nº 4) consistió fundamentalmente en un frasco de Mariotte que desembocaba en una trampa (decantador de pequeñas partículas) a su vez unidas mediante caño de goma a un tubo de 3 cms de luz estirado en capilar y llenado con lana de vidrio para retener cualquier partícula que hubiese escapado al

decantador y que podría obturar el capilar. Este desembocaba dentro del tubo de alimentación del generador.

El todo estaba armado sobre un soporte con dos agarra-
deras.



Como frasco Mariotte se usó un frasco lavador de un litro de capacidad, que se encontró muy conveniente dado que por su altura permitía una mayor sensibilidad en la lectura de los volúmenes. Se lo calibró y se cerró con tapón de goma con dos perforaciones, una para el tubo de nivel constante y otra para el tubo de escape de aire. Este tubo se cerraba con un trozo de caño de goma y pinza, abriéndolo únicamente cuando se necesitaba reponer líquido de carga, opera-

ción que se realizaba a través del tubo de nivel constante.

La velocidad de alimentación de líquido dependía de dos factores independientes: la luz del capilar terminal y la altura del nivel constante. Fijado el primero, se varió la velocidad desplazando el segundo, ya sea moviendo el tubo correspondiente dentro del tapón o modificando la altura de todo el frasco.

Las variaciones máximas de velocidad observadas durante el empleo del dispositivo fueron del orden de 5 ml diarias.

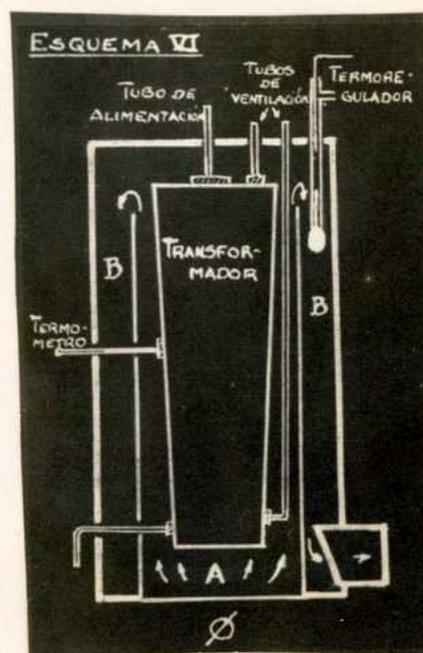
III) CONSTRUCCION DE UN TERMOSTATO..- El principio que se aplicó fué el del horno de Pasteur para esterilizar en seco.

Un recinto circular (A) rodeado de otro (B) que comunica al exterior mediante una tobera (C), estando ambos comunicados por la parte superior (esquema N° 6).

Como recinto interior se adaptó un recipiente cilíndrico de hojalata de 19 cms. de diámetro y 42 cms. de altura, con un orificio a la altura del orificio de descarga del transformador y otro para dar paso al termómetro sobre la zona central del generador.

Se lo aseguró dentro de un armazón hecho con flejes de hierro, también cilíndrico de 25 cms de diámetro y 50 cms de altura. Esta especie

de jaula, que serviría luego de soporte para un manto de plancha de amianto, estaba armada con dos aros de fleje, uno arriba y otro abajo, unidos con una serie de flejes verticales



que estaban remachados a ellos. El fondo estaba constituido por dos flejes paralelos remachados al aro inferior y sobre ellos se atornilló el recipiente anterior.

Como ya se dijo, este armazón fué recubierto por una plancha de amianto dejándose un orificio de 7 a 8 cms de diámetro cerca de la base para la tobera.

Se recubrió también con amianto el anillo de fondo correspondiente al recinto exterior, dejando libre el del interior para superficie de calefacción.

Una tapa de madera recubierta por su cara interna con amianto, cerraba todo el termóstato; presentaba orificios para los tubos de alimentación y ventilación del generador, así como para un termo regulador a gas cuyo bulbo quedó ubicado en el recinto exterior. Las uniones de las planchas de amianto se cerraron con una papilla acuesa del mismo material.

El elemento de calefacción fué un micromechero desprovisto de su chimenea, protegiéndose la llamita con una camisa de vidrio.

El transformador se colocó dentro del recinto interior apoyado sobre la pared del mismo mediante las tres uñas fijadas al segundo suncho, de tal modo que quedara un buen espacio libre entre el fondo de aquél y la superficie de calefacción.

La figura N^o 5) muestra el conjunto de la planta piloto instalada con el termóstato y el dispositivo de alimentación automática.

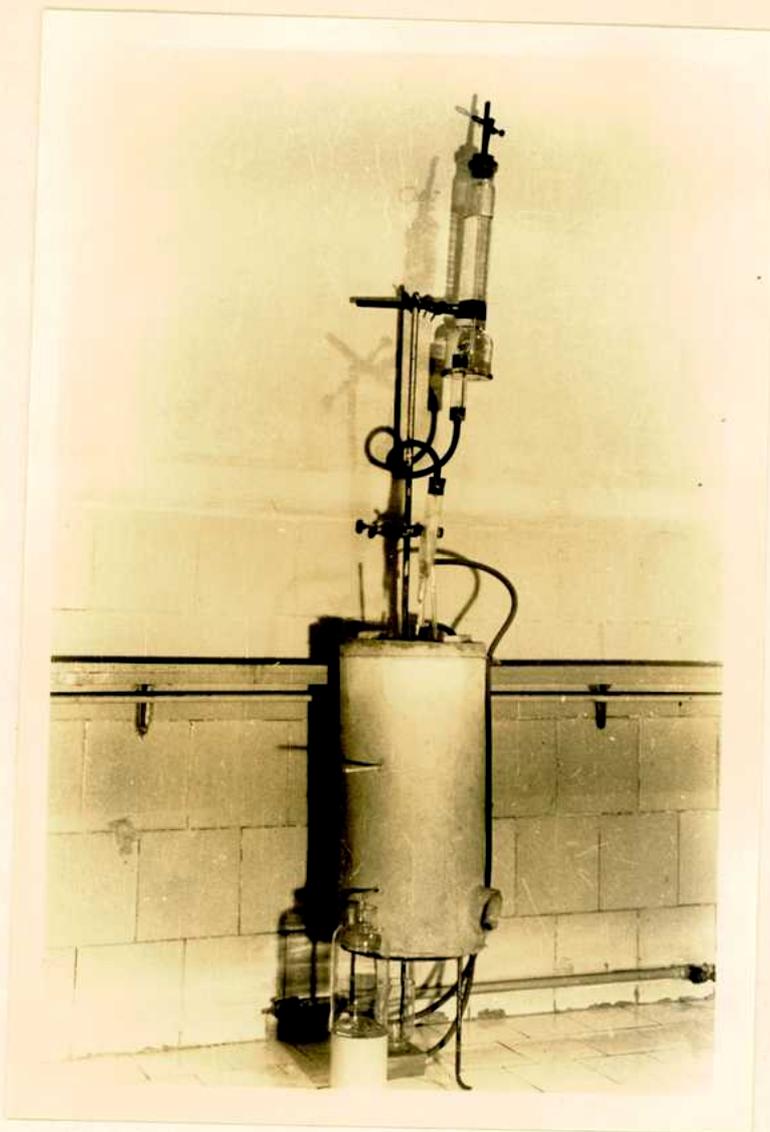


FIGURA 6.-

+

CAPITULO IICONDUCCION DE LA PLANTA PILOTO

Todos los procedimientos empleados para conducir el equipo reducido han sido adaptados de la práctica industrial siguiendo el criterio de reproducirla con la mayor perfección posible. La descripción completa de los mismos debiera entonces abarcar todos los aspectos de la fabricación de vinagre en gran escala, resultando a todas luces demasiado extensa dentro de los límites del presente trabajo. Por esa razón se hace referencia únicamente a los puntos especialmente interesantes o imprescindibles para la reproducción de las experiencias.-

1) Materia prima.- Ha sido en el curso de los ensayos: vinagre rápido de la fábrica AH P de la Capital de 8-9 % de acidez y 0,6-0,1 % de alcohol, y alcohol etílico de 95-96%GL con los que se prepararon las mezclas alcohólicas requeridas.

A las mismas se añadieron distintas sustancias nutritivas dándose preferencia a los compuestos inorgánicos que no favorecen tanto como los orgánicos, la sobreoxidación fenómeno temido por los fabricantes de vinagre (Wüstenfeld (5)).

Entre las mezclas salinas empleadas está la sugerida por Rothenbach (1): $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ 0,48 gr.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{KO}$, 24 gr.; $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}$ 0,2 gr.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,08 gr., cuya composición está totalmente de acuerdo con las conclusiones de Krehan (2) en su estudio de la influencia de las mezclas salinas sobre la capacidad de acetificación del B.acetigenoideum. Derivadas de las combinaciones más favorables encontradas por aquel investigador se usaron además:

$\text{PO}_4(\text{NH}_4)_3$ 0,5 gr.; SO_4HK 0,4 gr.; SO_4Mg 0,1 gr.;
 $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_3$ 0,4 gr.; SO_4LK 0,3 gr.; PO_4HCa 0,1 gr.;
 ClNa 0,1 gr.; SO_4Mg 0,1 gr.

Todas ellas se prepararon usando drogas analíticas demasiado costosas para el empleo en gran escala y en el afán de

controlar alguna de aplicación industrial se utilizó la siguiente: $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_3$ 0,6 gr.; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,2 gr.; ClK 0,2 gr., de finida con las drogas comerciales disponibles en plaza.

Como tipo de nutrición hidrocarbonada se eligió la glucosa y como fuente de nitrógeno orgánico, peptona (Parke Davies).

La administración combinada de estas materias nutritivas se ha realizado en general de acuerdo con el postulado de Hoyer (1), de que la fuente de nitrógeno podía ser tanto más deficiente cuanto más favorable era la de carbono y viceversa.

Todas estas sustancias, como también las mezclas salinas consideradas como conjunto, se usaron en soluciones al 10% en vinagre, midiendo luego volúmenes proporcionales a las concentraciones finales que se deseaban obtener en las mezclas.

2) Mezclas hidro-aceto-alcohólicas.— Las distintas combinaciones empleadas se eligieron de acuerdo con las necesidades de la operación con carga manual, dado que aquellas para carga automática se deducen de éstas en la forma que se verá más adelante.

Todas se calcularon con un mínimo de acidez del 4%, proporción que según Wüstenfeld (1) es la límite para evitar contaminaciones de los generadores atendidos con carga manual.

En general puede distinguirse entre las mezclas para obtener vinagres de elevada concentración ácida con las que disminuye la transformación cuantitativamente, pero que suprimen las especies de acetobacterias formadores de mucosidad; y aquellas para producir vinagres de menor acidez cuyo empleo significa un aumento de producción, sin considerar las posibles consecuencias determinadas por la segunda condición.

En el curso de las experiencias se han ensayado ambos tipos, estando representado el primero por las mezclas -4,5 % ácidas más 7 % alcohol etílico—y -5 % acidez y 6,4 % etanol, y el segundo por la combinación 4 % acidez y 3,5 % etanol.

Además se ha utilizado otra con 4 % acidez y 6 % alcohol que era en realidad el término medio entre ambos grupos. Con ella podían obtenerse vinagres de hasta 10 % de acidez, concentración capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias antes mencionadas, esperándose que no determinara disminución sensible de la producción.

3) PUESTA EN MARCHA O ACETIFICACION DEL GENERADOR.

Es sin duda uno de los aspectos más delicados de la conducción,-

La operación se realizó con el vinagre rápido mencionado, debiendo en general seleccionarse cuidadosamente. No deben usarse vinagres de procedencia dudosa y cuando se conoce elegir con preferencia el de transformadores que nunca estuvieron afectados por trastornos cualquiera sea su naturaleza. Contrariamente a lo aconsejado por Wüstenfeld (1) se empleó un producto filtrado, hecho que, como se verá ha tenido una consecuencia completamente inesperada; solamente el generador piloto N° III fué acetificado con vinagre completo (sin filtrar). Dentro de los límites de la suma alcohol más ácido con la que se desea trabajar conviene, al decir de Rothenbach (3) elegir para la acetificación el vinagre de mayor acidez, sin pasar de 11 %, pues en estos ya existen pocas células capaces de multiplicarse.

Durante este período inicial, se cerraron los respiraderos para evitar un prematuro comienzo de la transformación que puede desorientar y llegar a determinar inconvenientes posteriores -Wüstenfeld (1). Asimismo es necesario el control riguroso de temperatura y acidez del producto para descubrir la menor manifestación de actividad. No se pudo aplicar un conocido recurso de la práctica, la verificación de la existencia en los respiraderos inferiores de "tiraje" (corriente de aire al interior del aparato cuando trabaja) debido a que en la planta reducida, aún estando en pleno funcionamiento, los desplazamientos de aire son tan pequeños, que escapan a la observación.

La composición de las efusiones clásicas durante este período es la siguiente:

Se comienza por cargar vinagre de las condiciones señaladas y se continúa hasta tanto se observen algunos de los síntomas de actividad mencionadas. A partir de este momento se aumenta paulatinamente la proporción de alcohol con simultánea disminución de la de ácido acético, haciéndose el cambio de una mezcla a otra recién cuando el generador daba señales de transformar la cantidad de alcohol añadida con la mezcla precedente (se controla esto por la acidez del vinagre obtenido).

Este procedimiento es lento y se ensayaron otros tendientes a acelerar la operación de acetificación.

En los ensayos con carga manual se pusieron en práctica tres modos distintos de operar:

a.- se aumentó gradualmente la proporción de alcohol etílico, disminuyendo la de ácido acético en el líquido de carga, cada vez que la acidez del vinagre obtenido acusaba tendencia a aumentar, en resumen es el procedimiento clásico.

b.- al comienzo se aumentó lentamente la proporción de alcohol etílico en el líquido de carga, para pasar repentinamente a las concentraciones de trabajo en el instante en que se observa acidez creciente del vinagre acompañada de mayor diferencia de temperatura entre la interior (zona media) y la exterior al transformador.

c.- se comenzó con mezcla débilmente alcohólica y en el momento de observar un notable incremento en la diferencia de temperatura se pasa a cargar la mezcla de trabajo.

Para la acetificación con carga automática, se eligió una situación intermedia entre h y g , tomando como punto de referencia de la marcha de la acetificación únicamente la acidez del vinagre obtenido, ya que el control de temperatura

se debió reducir, con el empleo del termóstato, a verificar si se mantenía la temperatura de trabajo.

4) FUNCIONAMIENTO CON CARGA MANUAL.- Se trabajó de acuerdo con el sistema de afusiones independientes para cada aparato, alternando en general cada carga (afusión con mezola alcohólica) con una o dos recargas (afusiones con el vinagre producido) de acuerdo con las necesidades de cada caso.

Las distintas afusiones, fueron de 40 ml cada una, estando separadas por un máximo de 3 horas y un mínimo de una hora y media. La cantidad de líquido de cada carga fué en realidad doble de la que en proporción al volumen del aparato, comparado con uno industrial corresponde, pero los fenómenos de adsorción de líquido e intercambio por difusión que se producen en la masa de relleno quitaron significación a ese hecho. En virtud de los mismos puede admitirse que cada generador piloto se comportó como si contuviera alrededor de un litro de líquido, es decir, que una afusión de 40 ml implica una modificación de volumen de aproximadamente 4 %, perfectamente comparable con la de 2 a 3 % que se produce en los industriales. Se cuidó únicamente que la nueva infusión se produjera recién después que la anterior hubiese desplazado su volumen de líquido, lo que en general ocurría después de una hora.

Se mantuvo la recarga, ese recurso empírico conocido hace mucho tiempo, a quien las consideraciones anteriores parecen quitar la razón de su empleo. Empero las experiencias comparativas de Wüstenfeld y Luckow (1) han demostrado que los generadores que no las recibían, acusaban rendimiento y capacidad de oxidación notablemente inferiores a los del aparato de control. De acuerdo con el primero de los investigadores nombrados (4) contribuye la recarga al establecimiento del equilibrio térmico, estando ya terminado el producto no aporta nuevas fuentes de energía transformables en calor y como en la mayoría de los casos se halla a una temperatura inferior, puede quitar calor de las capas superiores que lo producen en

abundancia. Otra de las misiones, sería la de mantener en la parte superior del aparato una acidez suficientemente elevada como para proteger contra las infecciones.

5) FUNCIONAMIENTO CON CARGA AUTOMÁTICA.- Todos los dispositivos de carga automática incluso el usado, mantienen la intermitencia de las afusiones; vale entonces en lo que a cantidad de las mismas se refiere, lo dicho en el párrafo anterior. Para calcular la composición del líquido de carga se echó mano de una excelente comparación de Wüstenfeld (1): "el fabricante debe imaginar reunidos en un solo recipiente todos los líquidos que recibe cada uno de los aparatos y hallar la composición media; las concentraciones de ácido acético y alcohol resultantes, serán aquellas a las que deberá ajustar la mezcla".-

Para obtener la composición básica de una "mezcla" automática se tomó el caso de un generador servido con mezcla de 6 % vol. de etanol y 4 % de ác. acético; recibía tres cargas y tres recargas y producía un vinagre de 9,7 % de acidez y 0,1% de etanol (ensayo (3) con mezcla 4 mas 6, transformador II fecha 16 al 18 de marzo). Reuniendo: recibía 240 ml de líquido con 7,3 ml de etanol absoluto y 16,4 gr. de ácido acético expresado como glacial, es decir, con 3 % de etanol y 6,8 % de ácido acético, redondeando, 5 y 7 % respectivamente. Esta mezcla se consideró como de composición tipo y coincide con la considerada como más favorable por el nombrado investigador para una suma alcohol ácido de 10.

6) CONTRALOR DE FUNCIONAMIENTO.- Excluyendo las determinaciones de las diferencias de temperatura entre el interior (zona media) de los aparatos y exterior, cuando estos no se hallaban montados en termóstatos, se concretó ese contralor a las valoraciones de acidez total que se expresaban en ácido acético, y la de alcohol etílico.

a) La determinación de la acidez total se hizo titulando a la fenolftaleína 1 ml del vinagre a ensayar con solución

0,166 N de hidróxido de sodio o de potasio, con cuyo empleo dan las lecturas en ml sobre la bureta, el valor numérico de la acidez total por ciento expresada en ácido acético.

b) Para la valoración del etanol se siguió la técnica de Guagnini (1) que en principio consiste en el arrastre del alcohol con vapor de agua, sucesivamente a través de solución saturada de ácido pícrico, de carbonato de sodio al 10 %, de ácido tartárico al 10 % para terminar en mezcla oxidante obtenida con partes iguales de solución de bicromato de potasio al 0,66 % y ácido sulfúrico concentrado.

Esta mezcla toma por acción del etanol tintes verdosos (reducción a sales crómicas) y su color puede compararse, luego de diluir a igual volumen y empleando un tubo del mismo tamaño, con el que resulta de reducir igual cantidad de reactivo con cantidades crecientes 0,1 ; 0,2 ; etc. ml de una solución 0,1 % de alcohol etílico.

Empleando 0,1 ml del vinagre a investigar, medido exactamente con pipeta de 0,2 ml graduada al milésimo de mililitro, el número de mililitros de la solución tipo con el que se obtuvo igual color, da el contenido de etanol por ciento en volumen de la muestra.

CAPITULO III

ENSAYOS DE ACETIFICACION EN LA PLANTA PILOTO.

Independientemente del procedimiento de carga, manual o automática, se ha visto en el curso de las experiencias que la cantidad de alcohol transformada era el índice que mejor ponía de manifiesto el trabajo realizado por el generador. Esa cantidad se calculaba sin necesidad de tener en cuenta el alcohol etílico residual del vinagre obtenido, conociendo la acidez en ácido acético de éste y la inicial de la mezcla hidro-aceto-alcohólica empleada, así como el volumen de la misma cargada sobre el transformador en el lapso considerado, por lo general un día. En efecto con esos datos y considerando que los volúmenes de mezcla empleada y vinagre eran prácticamente iguales en virtud de la evaporación despreciable, pueden obtenerse de inmediato los gramos de ácido acético producidos en ese lapso, su valor numérico multiplicado por 0,97 (exactamente 0,968) da el número de mililitros de alcohol absoluto necesarios para obtenerlos, es decir, transformados por el aparato.

Tal factor, resulta de la ecuación estequiométrica de la oxidación del alcohol de acuerdo con la que, 60 gr. de etanol seco proceden de 58,1 ml de etanol absoluto.

Como conclusión general de todas las comprobaciones se encontró la insensibilidad de los generadores frente a la distinta naturaleza de las mezclas salinas: dentro de las ensayadas ninguna se mostró superior a las demás.

Para mayor claridad todos los resultados de los ensayos realizados se presentan en forma de cuadros; haciéndose al pie de los mismos la discusión de aquellos por idéntico motivo.

I) ENSAYOS CON CARGA MANUAL. Con este tipo de carga se hicieron todas las observaciones a temperaturas inferiores a

308C.

Estando los aparatos sin aislación ni colocados en termostato, la temperatura se confundía con alguna diferencia (por lo general de 3° C y en los casos más favorables de 5° C) con la del ambiente, dependiendo prácticamente de la misma.

Pero los equipos, a pesar de su pequeña masa estuvieron en condiciones de dejar sin efecto las variaciones diurnas de la temperatura, probablemente en virtud del mecanismo de autorregulación de aquella, mecanismo que según Wüstenfeld (3) rige el mantenimiento de los transformadores industriales sobre un determinado nivel térmico durante mucho tiempo.

Como es lógico suponer, hará sentir su efecto en el caso de los aparatos piloto, únicamente frente a variaciones que se producen en el lapso de algunas horas, no alcanzando la pequeña cantidad de calor en ellos acumulada, como reserva para fluctuaciones de temperatura de mayor duración. Con toda seguridad, ha influido en ese sentido también la mayor relación entre la superficie exterior y el volumen del aparato reducido, situación que se traduce en un intercambio aumentado de calor con el ambiente.

1) PUESTA EN MARCHA.-- Los tres modos de operación del párrafo 3 del capítulo anterior se pusieron en práctica en tres generadores reducidos siendo para todos la mezola de trabajo prevista de 4,5 % de acidez y 7 % de alcohol.

Los resultados en el cuadro N° 3.

La consecuencia a deducir de estos modos operatorios salta a la vista, con el tercero se ha llegado a obtener en 15 días vinagre de 9,25 % de acidez, producto que, siguiendo el primero resultaba después de más de un mes.

Es notable que no gravitara sobre la acidez del vinagre, el cambio de mezcla al que fuera sometido el generador II con fecha 29-1, cuando para todos los demás, modificaciones de magnitud menor, determinaban descensos más o menos significativos.

Compárese la acidez del vinagre de I desde el 9-2 al 11-2 y la del II entre los días 26-2 y 28-2.

El plan de trabajo número 1, no correspondió en realidad exactamente con el programado, puesto que en vista del éxito del 3 se pasó también repentinamente a la mezcla final con fecha 9-2.

Tal cambio empero se introdujo recién cuando la superioridad del último estaba completamente demostrada.

La temperatura ambiente osciló en todos los casos alrededor de 25°C.

- 2) Acetificación con mezcla de 4,5 % de ácido y 7 % de etanol:

CUADRO Nº 4.- Acetificación con mezcla 4,5% ácido y 7% etanol

| Transformador I | | | Transformador II | | | Transformador III | | |
|---|----------------|---------------|---|----------------|---------------|---|----------------|---------------|
| Liq. total: 200 ml/d. | | | Liq. total: 240 ml/d. | | | Liq. total: 240ml/d. | | |
| Liq. alcohol: 120 ml/d. | | | Liq. alcohol.: 120 ml/d. | | | Liq. alcohol.: 120ml/d. | | |
| Sales min.: 0,02 % | | | Sales min.: 0,01 % | | | Sales min.: 0,01 % | | |
| Glucosa: 0,04 % | | | Glucosa: 0,02 % | | | Glucosa: 0,02 % | | |
| Diferencia de temp. int. - ambiente: 29°C | | | Diferencia de temp. int. - ambiente: 30°C | | | Diferencia de temp. int. - ambiente: 29°C | | |
| Temp. ambiente: 24 a 25°C | | | Temp. ambiente: 23°C | | | Temperatura ambiente: 23°C | | |
| Fecha | Acidez | Etanol | Fecha | Acidez | Etanol | Fecha | Acidez | Etanol |
| | vinagre obt. % | trans. ml/día | | vinagre obt. % | trans. ml/día | | vinagre obt. % | trans. ml/día |
| 13/2 | 8,90 | 5,1 | 11/3 | 9,50 | 5,8 | 9/3 | 9,35 | 5,65 |
| 14 | 9,10 | 5,35 | 12 | 9,50 | 5,8 | 10 | 9,55 | 5,9 |
| 15 | 9,25 | 5,5 | 13 | 9,60 | 6,0 | 11 | 9,80 | 6,15 |
| 16 | 9,30 | 5,6 | 14 | 9,75 | 6,1 | 12 | 9,85 | 6,25 |
| 17 | 9,30 | 5,6 | 15 | 9,75 | 6,1 | 13 | 9,95 | 6,35 |
| 18 | 9,40 | 5,7 | 16 | 9,70 | 6,05 | 14 | 10,15 | 6,55 |
| 19 | 9,45 | 5,75 | 17 | 9,60 | 6,0 | 15 | 9,80 | 6,15 |
| 20 | 9,50 | 5,8 | | | | | | |
| 21 | 9,70 | 6,05 | | | | | | |
| 22 | 9,50 | 5,8 | | | | | | |
| Prom. | 9,35 | 5,6 | Prom. | 9,65 | 6,0 | Prom. | 9,80 | 6,15 |

El ensayo fué realizado tendiendo a la preparación de vinagres de relativamente elevada concentración ácida. De acuerdo con la mezcla utilizada, que permitía la obtención de productos con hasta 11,5 % de acidez debe considerarse al ensayo como fracasado, por la relativamente elevada cantidad de alcohol residual.

Pero por otra parte debe tenerse en cuenta, que vinagres de alrededor de 10 % de ácido acético como los resultantes de III (ver cuadro Nº 4), no se producen con facilidad ni comúnmente en el país.

Dentro de un orden distinto de observaciones, se pone de manifiesto la influencia de la circulación aumentada de líquido, se entiende, dentro de los límites permitidos. La duplicación de la concentración de hidrato de carbono no resultó suficiente para compensar ese efecto.

Llama además la atención que III, el transformador más rápidamente acetificada, acusara los mejores resultados, aún comparando con el II que trabajó en igualdad de condiciones. Como tal situación se ha mantenido a lo largo de todo su funcionamiento, debe admitirse que en ese generador piloto, habiéndose partido de un mismo vinagre, han enriquecido gérmenes particularmente activos. La causa de tal hecho, no puede ser otra que el método de puesta en marcha elegido, que por sus características debe tender a la supresión de las especies menos resistentes a la acidez elevada y acetificantes.

Rothenbach llegó a conclusiones semejantes por otro camino. En un ensayo de acetificación con vinagres de 8 y 10% de acidez, encontró que después de medio año el generador puesto en marcha con el último, todavía producía 2 % más de ácido acético, transformándose en ambos casos todo el alcohol. En estas experiencias la mayor concentración en ácido acético de la puesta en marcha desempeñó el papel de la acetificación rápida en el presente trabajo.

3) Acetificación con mezcla 4 % de ácido acético y 6 % de etanol.

Los resultados de los ensayos con esta mezcla están resumidos en los cuadros 5a y 5b.

Con excepción del A se han transformado en todos los ensayos, cantidades de alcohol proporcionalmente muy superiores a las que oxidan los generadores industriales en el país. Aún en el caso citado se alcanza todavía a realizar el trabajo correspondiente al término medio de un buen transformador industrial de tamaño normal en la Argentina: 1,5-2 litros de eta-

nel transformado por día y aparato (en el caso de la experiencia correspondería 1,7 litros).

La explicación de los resultados a veces extraordinarios que se han obtenido (durante los ensayos H e I se ha elaborado en la proporción de 5 litros de alcohol diarios), no puede ser otra que la favorable relación de superficie exterior a masa de relleno de los equipos reducidos. Tal situación facilita la eliminación del calor de oxidación que es considerada por Rothenbach (1) y Wüstenfeld como de primordial importancia para la producción de vinagre por el método rápido. Pasando a comparar entre sí los resultados de los distintos ensayos, se observa ante todo la enorme influencia que ejerce la circulación del líquido sobre la producción del aparato (especialmente notable en D y E). Para aumentarla al límite realizado se disminuyó el lapso entre las afusiones a una hora y media, todavía mayor el tiempo necesario para el desplazamiento de un volumen de líquido igual al de la carga.

Muy estimulante resultó ser el aumento de la carga alcohólica, a constancia de los demás factores (véase A-B y F-H).

La variación en el agregado de las sustancias nutritivas no tuvo una influencia tan manifiesta como la modificación de los factores arriba mencionados. Se destaca, eso sí, la ventaja de la adición de nitrógeno orgánico (ensayos F-G) frente a una relativa indiferencia con respecto al aumento de la concentración de sales minerales, e hidratos de carbono.

Comparando los ensayos A, B y C con los restantes se concluye que, procurando elaborar vinagres de alta acidez con escaso alcohol residual se provoca una disminución de producción. El problema de las fábricas es en general, para una determinada mezcla alcohólica, elaborar vinagres de alta acidez aparejados con baja transformación o mantener un ritmo de gran producción cuya consecuencia es una menor "fuerza" del vinagre. Para la mezcla con la que se trabajó, las situaciones elegidas en C y H resultaron las más convenientes para uno u otro objeto.

CUADRO N° 5b.-Acetificación con mezcla 4% ácido y 6% etanol.-

| F | | G | | H | | I | | | | | |
|---------------------------------|------------------|---------------------------------|-------|--|----------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------|------|-------|
| Fecha | Acidez vinagre % | Alcohol trans ml/dfa | Fecha | Acidez vinagre % | Alcohol trans ml/dfa | Fecha | Acidez vinagre % | Alcohol trans ml/dfa | | | |
| Liq. total: 440ml/d. | | Liq. total: 440ml/d. | | Liquido total: 440 ml/dfa | | Liq. total: 440ml/d. | | Liq. total: 440ml/d. | | | |
| Liq. alcoh: 240ml/d. | | Liq. alcoh: 240ml/d. | | Liquido alcohólico: 280 ml/dfa | | Liq. alcoh: 240ml/d. | | Liq. alcoh: 280ml/d. | | | |
| Sales min.: 0,01% | | Sales min.: 0,01% | | Sales minerales: 0,01% | | Sales min.: 0,01% | | Sales min.: 0,01% | | | |
| Glucosa: 0,04% | | Glucosa: 0,04% | | Glucosa: 0,04% | | Glucosa: 0,04% | | Glucosa: 0,04% | | | |
| Peptona: -- | | Peptona: 0,01% | | Peptona: -- | | Peptona: 0,01% | | Peptona: -- | | | |
| Dif. temperatura int.-amb.: 5°C | | Dif. temperatura int.-amb.: 4°C | | Diferencia de temperatura entre interior transf. y ambiente: 5°C | | Dif. temperatura int.-amb.: 5°C | | Dif. temperatura int.-amb.: 5°C | | | |
| Temp. amb.: 20°C | | Temp. amb.: 22°C | | Temperatura ambiente: 21-24°C | | Temp. amb.: 22°C | | Temp. amb.: 15-17°C | | | |
| Transformador II | | Transformador II | | Transformador III | | Transformador III | | Transformador III | | | |
| 20/4 | 8,10 | 9,55 | 9/4 | 8,35 | 10,1 | 4/4 | 8,75 | 12,9 | 23/4 | 8,45 | 12,1 |
| 21 | 8,15 | 9,65 | 10 | 8,2 | 9,8 | 5 | 8,70 | 12,75 | 18 | 8,70 | 12,6 |
| 22 | 8,15 | 9,65 | 11 | 8,35 | 10,1 | 6 | 8,70 | 12,75 | 19 | 8,75 | 13,0 |
| 23 | 8,20 | 9,8 | 12 | 8,35 | 10,1 | 7 | 8,55 | 12,4 | 20 | 8,80 | 12,9 |
| 24 | 8,15 | 9,65 | 13 | 8,35 | 10,1 | 8 | 8,50 | 12,2 | 21 | 8,60 | 12,9 |
| 25 | 8,10 | 9,55 | 14 | 8,20 | 9,8 | 9 | 8,75 | 12,9 | 22 | 8,70 | 12,75 |
| 26 | 8,20 | 9,8 | 15 | 8,30 | 10,0 | 10 | 8,40 | 12,0 | 23 | 8,40 | 12,0 |
| 27 | 8,15 | 9,65 | 16 | 8,35 | 10,1 | 11 | 8,60 | 12,5 | 24 | 8,50 | 12,2 |
| 28 | 7,90 | 9,1 | 17 | 8,35 | 10,1 | 12 | 8,45 | 12,1 | 25 | 8,50 | 12,2 |
| 29 | 8,10 | 9,55 | 18 | 8,35 | 10,1 | 13 | 8,55 | 12,4 | 26 | 8,55 | 12,4 |
| 30 | 8,15 | 9,65 | 19 | 8,35 | 10,1 | 14 | 8,55 | 12,4 | 27 | 8,55 | 12,4 |
| 1/5 | 8,05 | 9,45 | | 8,35 | | 15 | 8,55 | 12,4 | 28 | 8,55 | 12,4 |
| 2 | 8,30 | 10,0 | | | | 16 | 8,75 | 12,9 | | | |
| 3 | 8,25 | 9,9 | | | | | | | | | |
| 4 | 8,30 | 10,0 | | | | | | | | | |
| Prom | 8,15 | 9,65 | Prom | 8,35 | 10,1 | Prom | 8,60 | 12,5 | Prom | 8,70 | 12,75 |

CUADRO Nº 7.- Acetificación con mezcla 5% ác.6,5%et.

| Transformador II | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | Líquido total: | 440 ml/día | | | |
| | | Carga alcohólica: | 140 ml/día | | | |
| | | Sales minerales: | 0,02 % | | | |
| | | Glucosa: | 0,02 % | | | |
| Fecha | Acidez vinagre obt. % | Etanol trans. ml/día | Tempe- ratura amb. °C | Fecha | Acidez vinagre obt. % | Tempe- ratura amb. °C |
| 12/6 | 9,50 | 6,1 | 18 | 19/6 | 9,05 | 12 |
| 13 | 9,40 | 6,0 | 17 | 20 | 8,80 | 11°5 |
| 14 | 9,40 | 6,0 | 18 | 21 | 7,95 | 9°5 |
| 15 | 9,40 | 6,0 | 18 | 22 | 7,65 | 9 |
| 16 | 9,05 | 5,5 | 18°5 | 23 | 7,40 | 8°5 |
| 17 | 9,40 | 6,0 | 18 | 24 | 6,95 | 5 |
| 18 | 9,40 | 6,0 | 17 | | | |
| Prom. | 9,40 | 6,0 | | | | |
| Dif. temp. media: | | | 5°C | Dif. temp. media: 2°C | | |

El descenso de la temperatura ambiente provocó un pequeño pero sensible aumento de producción determinado probablemente por la reacción favorable de la flora bacteriana presente en el aparato

4) Acetificación con mezcla 4 % de acidez y 3,5 % de etanol:

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se trabajó únicamente con abundante circulación de líquido. El ensayo A (cuadro N º 6) demuestra con respecto al B, que también aquí se produce la acción estimulante de la carga alcohólica secundada seguramente por la adición de peptona. Es notable que la influencia sea proporcionalmente tan grande y el análisis de las condiciones experimentales señala a la relativa falta de materias salinas (solo presentes al 0,01 %) como responsable

de esa acción. Compárese en este sentido con los resultados de C, donde con menor carga alcohólica se consigue mayor producción y acidez.

Un fuerte descenso de temperatura (de 15°C a alrededor de 10°C) quedó, en contra de lo que se esperaba, sin efecto. Podría tal vez admitirse que la doble concentración de hidratos de carbono haya contribuido al mantenimiento del nivel de producción, consecuencia ya señalada por Wüstenfeld (1) en transformadores grandes.

Si bien no corresponde considerar inepto este tipo de mezcla por su menor producción con respecto a la 4+6, dado que las diferentes temperaturas hacen que en realidad no sean comparables, hay otra razón para desechar esta combinación: la baja acidez reinante en el aparato favorece la multiplicación de gérmenes productores de mucosidad, cuyo desarrollo determinó la obturación frecuente de la criba, así como la inutilización del relleno, por recubrirlo de capas de mucus que en conjunto reducen la superficie de aquél y hacen que la mezcla circule por caminos determinados, dejando algunas porciones sin carga.

5) Acetificación con mezcla 5 % de ácido y 6,5 % de etanol:

Este nuevo intento para llegar a obtener vinagre de alta acidez, esta vez a menor temperatura, se llevó a cabo aumentando la concentración inicial de etanoico con respecto a la mezcla 4 + 6 y manteniendo elevada la circulación de líquidos.

Las concentraciones de sustancias nutritivas se mantuvieron dentro de los límites del ensayo anterior.

Una consecuencia importante de esta experiencia es el hecho de que el aparato resultó más sensible al descenso de temperatura, en otras palabras, en la práctica industrial encontrándose frente a un problema derivado de esa condición ambiental debe tenderse al empleo de mezclas de menor suma alcohol y ácido, sin llegar al extremo de la anterior, y aumentar

a) agregado de hidratos de carbono.

6) Influencia de cargas calientes a baja temperatura ambiente:

El cuadro N° 8 es por demás demostrativo. Para completar se dirá que el aparato I había descendido en los seis días anteriores a la experiencia de 7,25 % a 6,8 % de acidez y el II en igual plazo de 8,15 % a 6,50 %.

Se observa una vez más la mayor sensibilidad del generador suministrado con cargas de elevada suma ácido más alcohol a los descensos de temperatura.

Es interesante la mayor reacción, en el último caso, frente a la afusión caliente y tal observación completa muy bien la del párrafo anterior con respecto a las medidas a tomar con motivo de trastornos de esta índole; se entiende, en el caso de que se desee mantener la alta suma de concentración en la mezcla.

Antes de hacer algunas consideraciones sobre el conjunto de los resultados con carga manual cabe destacar una inesperada consecuencia del empleo de vinagre filtrado, libre practicamente de anguilulas, para la puesta en marcha de los

CUADRO N° 8.- Influencia de las cargas calientes.-

| Transformador I | | | | Transformador II | | | |
|------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|
| Mezcla: 4% ácido 3,5% etanol | | | | Mezcla: 5% ácido 6,5% etanol | | | |
| Líquido total: 440 ml/día | | | | Líquido total: 440 ml/día | | | |
| Carga alcohólica: 200 ml/día | | | | Carga alcohólica: 120 ml/día | | | |
| Sales minerales: 0,02 % | | | | Sales minerales: 0,02 % | | | |
| Glucosa: 0,02 % | | | | Glucosa: 0,02 % | | | |
| Temp. líquido carga: 35°C | | | | Temp. líquido carga: 35°C | | | |
| Fecha | Acidez vinagre % | Temp. ambiente °C | Dif. temp. °C | Fecha | Acidez vinagre % | Temp. ambiente °C | Dif. temp. °C |
| 9/7 | 6,90 | 5 ²⁵ | 4 ²⁴ | 10/7 | 6,30 | 6 | 3 |
| 10 | 6,90 | 5 | 4 ²⁵ | 11 | 7,85 | 6 ²⁵ | 3 ²² |
| 11 | 6,90 | 6 ²⁵ | 4 ²⁵ | 12 | 8,30 | 8 | 3 ²¹ |
| 12 | 6,95 | 8 | 4 ²⁸ | 13 | 8,60 | 8 | 3 ²² |

transformadores I y II: los productos de estos aparatos se mantuvieron libres del nematode en todo el curso de las experiencias. La misma observación se ha realizado en la serie de comprobaciones con carga automática. La ventaja de tal procedimiento es obvia por cuanto ha sido siempre un problema para los fabricantes de vinagre la invasión de éste con anguilulas. Corresponde entonces someter a una revisión la clásica norma de utilizar vinagre completo para la acetificación, que significa el pasaje de toda la fauna y flora de los generadores de origen a los nuevos, y comprobar hasta que punto depende la observación de otros factores por ahora inaparentes. La buena acetificación de los aparatos piloto conseguida, rebate posibles objeciones sobre una menor conveniencia del vinagre filtrado para aquel empleo.

De los tipos de mezcla ensayados es indudablemente aquella compuesta por 4 % de etanico (procedente de vinagre) y 6% de etanol con sustancias nutritivas la que ha resultado ser la más conveniente.

Se ha visto por otra parte que en general la concentración necesaria y suficiente de sales minerales e hidratos de carbono oscila alrededor de 0,02 % pudiendo reforzarse su acción con el agregado de nitrógeno orgánico en aquellos casos en que se necesite aumentar la actividad de los aparatos ya sea para alcanzar niveles de producción superiores cuando funcionan bien, ya sea para reactivarlos cuando están afectados por trastornos que provocan disminución de transformación.

Muy ventajosa se ha mostrado también una circulación de fluidos aumentada, que se consiguió a expensas de mayor número de recargas acompañadas o no de una creciente cantidad de cargas que también actúan como estimulantes de la producción.

II) ENSAYOS CON CARGA AUTOMÁTICA.- Utilizando este procedimiento se hicieron todas las experiencias a mayores temperaturas (30° y 35°) colocando el aparato en termóstato con suministro exterior de calor para conseguirlos. Esta situación determinó una modificación fundamental en lo que se refiere al e

equilibrio térmico. En efecto, estando aislado y calentándolo desde afuera el aparato no solo funcionaba con inferioridad de condiciones frente a los del grupo industrial, sino también con respecto a los industriales. En otras palabras, no se podían esperar las mismas cifras de elaboración. Empero el comportamiento fué el mismo y en el problema fundamental que se enfocó pudieron establecerse comparaciones desde el punto de vista cuantitativo.

Las investigaciones a realizar se concretaron a hallar las condiciones de funcionamiento óptimas a esas temperaturas y en especial alguna combinación que permitiera mantener aunque fuera aproximadamente, el nivel de elaboración al pasar a los 35°C.

Como mezcla básica se utilizó la indicada en el capítulo de métodos, calculada sobre la de mejor rendimiento en la serie de experiencias anterior. La adición de sustancias nutritivas se hizo con igual criterio, alrededor de 0,02 de sales minerales y glucosa de acuerdo con lo hallado con carga mineral.

1) PUESTA EN MARCHA:

De acuerdo con lo dicho en el capítulo anterior II y con las conclusiones anteriores se eligió una situación intermedia entre los procedimientos 2 y 3 de acetificación a una velocidad de circulación relativamente elevada.

Como mezcla de trabajo, cargada a partir del día 26-9, (ver cuadro N° 9) se empleó en un principio una fundamentalmente constituida por 8 % de etanoico y 2 % de etanol para pasar después de ella a la básica descripta.

El trabajo con la mezcla citada (ver cuadro N° 10) puso en evidencia otra de las consecuencias de la falta de eliminación de calor en esta instalación; para mantener la acidez del producto a una altura conveniente lo mismo que el nivel de producción, se hizo necesario disminuir la cantidad de carga alcohólica.

CUADRO N°9 .- Puesta en marcha con carga automática.-

| Temperatura 30°C Velocidad de circulación: 300 ml/día Sales minerales: 0,02 % Glucosa: 0,02 % | | | | | | | |
|--|-------------|------------------|------------------------|-------|-------------|------------------|------------------------|
| Fecha | Mezcla | | Acidez vinagre % | Fecha | Mezcla | | Acidez vinagre % |
| | Acidez % | Etanol % vol. | | | Acidez % | Etanol % vol. | |
| 2/9 | 9,00 | 0,1 | | 15/9 | | | 10,00 |
| 3 | | | | 16 | | | 9,90 |
| 4 | 9,35 | 0,65 | | 17 | | | 10,00 |
| 5 | | | | 18 | | | 10,00 |
| 6 | | | 9,30 | 19 | 8,50 | 1,5 | 9,90 |
| 7 | | | 9,45 | 20 | | | 9,90 |
| 8 | | | 9,50 | 21 | | | 9,90 |
| 9 | | | 9,45 | 22 | | | 9,90 |
| 10 | 9,00 | 1,0 | 9,50 | 23 | | | 9,80 |
| 11 | | | 9,90 | 24 | | | 9,65 |
| 12 | | | 9,75 | 25 | | | 9,85 |
| 13 | | | 9,75 | 26 | | | 9,95 |
| 14 | | | 9,95 | | | | |

La razón es siempre la misma, el agregado de mezcla significa para el aparato un continuo aporte de sustancias cuya transformación está acompañada por liberación de energía calorífica, cuya pérdida, como se sabe, está dificultada. Ahora bien, como la única condición variable dentro del sistema es precisamente la circulación de líquido alcohólico para una determinada concentración del mismo es lógico que los equilibrios se establecen a menor agregado del mismo.

2) Acetificación con la mezcla tipo a 30°C:

En el curso de la experiencia se corroboró la observación realizada con motivo del empleo de la mezcla 8+2; hubo necesidad de disminuir aún más el agregado de mezcla alcohólica

Velocidad: 250 ml/día
 Sales min.: 0,02 %
 Glucosa: 0,02 %
 Temperatura: 30°C

| Fecha | Acidez vinagre % | Etanol. trand. ml/día |
|-------|------------------------|-----------------------------|
| 28/10 | 8,95 | 2,3 |
| 29 | 9,05 | 2,55 |
| 30 | 9,30 | 3,15 |
| 31 | 9,20 | 2,9 |
| 1/11 | 9,25 | 3,0 |
| 2 | 9,20 | 2,9 |
| 3 | 9,40 | 3,4 |
| 4 | 9,35 | 3,25 |
| 5 | 9,30 | 3,15 |
| Prom. | 9,25 | 3,0 |

CUADRO Nº 10.-Acetificación automática con mezcla 8% ácido y 2 % etanol.-

hallándose un óptimo alrededor de los 120 ml diarios.

No considerándose satisfactoria la elaboración desde el punto de vista cuantitativo se buscó activar el funcionamiento con una adición suplementaria, de sustancias nutritivas (hasta 0,05 %). La medida no pudo tener mejor éxito, en el cuadro Nº 11 se consigna el aumento de producción de más del 20 % que resultó de ella. Esta extraordinaria influencia de la nutrición mineral aparece más notable aún cuando se compara con la relativa insensibilidad a la misma que mostraron los equipos servidos con carga manual, pero no hay que olvidar que Wüstefeld (1) aconseja para generadores industriales

que acusan transformación insuficiente multiplicar varias veces las dosis que se administran de aquellas sustancias. En otras palabras, la nueva consecuencia está más de acuerdo con la realidad industrial que la anterior.

3) Acetificación a 35° C:

Las experiencias se consignan en general en cuadros 12a y 12b. Las de orientación se hicieron con la mezcla 7+3, si bien ya los primeros ensayos efectuados demostraron que no podía considerarse como conveniente para el trabajo a esta temperatura. Se comenzó (A) con la velocidad y concentraciones de materias nutritivas encontradas como óptimas en las comprobacio-

CUADRO Nº 11.- Acetificación automática con mezcla 7% ácido y 3% etanol.

| Temperatura 30°C | | | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Velocidad: 120 ml/d. | | | Velocidad: 120 ml/d. | | |
| Sales min.: 0,02 % | | | Sales min.: 0,05 % | | |
| Glucosa: 0,02 % | | | Glucosa.: 0,05 % | | |
| Fecha | Acidez vinagre obt. % | Etanol transf. ml/día | Fecha | Acidez vinagre obt. % | Etanol transf. ml/día |
| 9/12 | 9,10 | 2,45 | 12/1 | 9,70 | 3,15 |
| 10 | 9,15 | 2,5 | 13 | 9,60 | 3,02 |
| 11 | 9,15 | 2,5 | 14 | 9,75 | 3,2 |
| 12 | 9,25 | 2,6 | 15 | 9,70 | 3,15 |
| 13 | 9,20 | 2,55 | 16 | 9,60 | 3,02 |
| 14 | 9,40 | 2,8 | 17 | 9,65 | 3,08 |
| 15 | 9,60 | 3,0 | 18 | 9,60 | 3,02 |
| 16 | 9,60 | 3,0 | 19 | 9,65 | 3,08 |
| 17 | 9,50 | 2,9 | 20 | 9,70 | 3,15 |
| | | | 21 | 9,75 | 3,2 |
| | | | 22 | 9,80 | 3,25 |
| | | | 23 | 9,80 | 3,25 |
| | | | 24 | 9,80 | 3,25 |
| Prom. | 9,35 | 2,7 | Prom. | 9,70 | 3,15 |

nes anteriores. La acidez del vinagre comenzó a descender y recordando la influencia favorable de las sustancias nutritivas se cuadruplicó la dosis de sales minerales a agregar (B). No se aumentó la de hidratos de carbono en esa medida, dado que la literatura consigna (Wüstenfeld (5)) la inconveniencia de una alimentación orgánica, en este caso hidrocarbonada, de masiado elevada. Con ello se consiguió estabilizar la transformación, por más que cuantitativamente no resultara muy satisfactoria. Se apeló entonces (C) a la disminución del volumen de líquido a circular, observándose una reacción positiva, si bien no fuera muy notable y carente de constancia.

A pesar de las conclusiones contrarias de los autores clásicos, se ocurrió ahora también el aumento de la proporción de glucosa añadida (D), pero, tal medida no se justificó, admitiendo la existencia de variación, esta fué negativa.

Cuadro Nº 12a.- Acetificación automática a 35º-

| Con empleo de la mezcla 7 % de ácido y 3 % de etanol | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| Velocidad: 120 ml/d. Sales min.: 0,05 % Glucosa: 0,05 % Peptona: --- | | | Velocidad: 120 ml/d. Sales min.: 0,2 % Glucosa: 0,05% Peptona: --- | | | Velocidad: 100 ml/d. Sales min.: 0,2 % Glucosa: 0,05% Peptona: --- | | |
| A | Acidez vinagre obt. % | Etanol transf. ml/día | B | Acidez vinagre obt. % | Etanol transf. ml/día | C | Acidez vinagre obt. % | Etanol transf. ml/día |
| Fecha | | | Fecha | | | Fecha | | |
| 3/2 | 8,30 | 1,50 | 4/3 | 7,80 | 0,93 | 19/3 | 7,90 | 0,87 |
| 4 | 8,20 | 1,40 | 5 | 7,65 | 0,75 | 20 | 7,90 | 0,87 |
| 5 | 8,0 | 1,15 | 6 | 7,60 | 0,7 | 21 | 7,90 | 0,87 |
| 6 | 7,90 | 1,10 | 7 | 7,60 | 0,7 | 22 | 7,90 | 0,87 |
| 7 | 7,90 | 1,10 | 8 | 7,60 | 0,7 | 23 | 7,95 | 0,92 |
| 8 | 7,65 | 0,75 | 9 | 7,60 | 0,7 | 24 | 7,70 | 0,68 |
| | | | 10 | 7,60 | 0,7 | 25 | 7,70 | 0,68 |
| | | | 11 | 7,60 | 0,7 | 26 | 7,70 | 0,68 |
| | | | 12 | 7,60 | 0,7 | 27 | 7,70 | 0,68 |
| | | | 13 | 7,60 | 0,7 | 28 | 7,80 | 0,75 |
| | | | 14 | 7,60 | 0,7 | 29 | 7,80 | 0,75 |
| | | | | | | 30 | 8,10 | 1,05 |
| | | | | | | 31 | 8,10 | 1,05 |
| | | | | | | 1/4 | 7,95 | 0,92 |
| | | | Prom. | 7,62 | 0,72 | Prom. | 7,87 | 0,84 |
| Velocidad: 100 ml/d. Sales min.: 0,2 % Glucosa: 0,2 % Peptona: --- | | | Velocidad: 100 ml/d. Sales min.: 0,2 % Glucosa: 0,05% Peptona: 0,01% | | | Velocidad: 90 ml/d. Sales min.: 0,2 % Glucosa: 0,05% Peptona: ---- | | |
| D | Acidez vinagre transf. % | Etanol transf. ml/día | E | Acidez vinagre transf. % | Etanol transf. ml/día | F | Acidez vinagre transf. % | Etanol transf. ml/día |
| Fecha | | | Fecha | | | Fecha | | |
| 11/4 | 7,80 | 0,77 | 21/4 | 7,95 | 0,92 | 29/4 | 8,15 | 1,0 |
| 12 | 7,80 | 0,77 | 22 | 8,05 | 1,02 | 30 | 8,15 | 1,0 |
| 13 | 7,80 | 0,77 | 23 | 8,05 | 1,02 | 1/5 | 8,45 | 1,25 |
| 14 | 7,85 | 0,82 | 24 | 8,05 | 1,02 | 2 | 8,45 | 1,25 |
| 15 | 7,85 | 0,82 | 25 | 8,05 | 1,02 | 3 | 8,45 | 1,25 |
| 16 | 7,90 | 0,87 | 26 | 8,05 | 1,02 | | | |
| 17 | 7,90 | 0,87 | 27 | 8,15 | 1,12 | | | |
| 18 | 7,90 | 0,87 | | | | | | |
| Prom. | 7,85 | 0,82 | Prom. | 8,05 | 1,02 | Prom. | 8,33 | 1,15 |

CUADRO Nº 12b.- Acetificación automática a 35°C-

| Con mezcla 6% ácido y 3% de etanol | | | | | | Con mezcla 7% ácido y 2% etanol | | | | | |
|--|---------|----------------------|---------------------|---------------------|---------|---------------------------------|---------|-------------------|--|-------------------|--|
| Velocidad: 100ml/d. | | Velocidad: 100 ml/d. | | Velocidad: 100ml/d. | | Sales min.: 0,05 % | | Sales min.: 0,2 % | | Sales min.: 0,2 % | |
| Glucosa: 0,05 % | | Glucosa: 0,05 % | | Glucosa: 0,05 % | | Peptona: ---- | | Peptona: ---- | | Peptona: --- | |
| G | Acidez | Etanol | H | Acidez | Etanol | I | Acidez | Etanol | | | |
| | vinagre | transf. | | vinagre | transf. | | vinagre | transf. | | | |
| Fecha | obt. % | ml/día | Fecha | obt. % | ml/día | Fecha | obt. % | ml/día | | | |
| 26/5 | 8,45 | 2,4 | 9/6 | 9,00 | 2,9 | 10/7 | 7,70 | 0,68 | | | |
| 27 | 8,65 | 2,55 | 10 | 9,00 | 2,9 | 11 | 8,00 | 0,97 | | | |
| 28 | 8,55 | 2,45 | 11 | 9,00 | 2,9 | 12 | 7,90 | 0,87 | | | |
| 29 | 8,40 | 2,33 | 12 | 8,95 | 2,85 | 13 | 7,90 | 0,87 | | | |
| 30 | 8,25 | 2,2 | 13 | 8,90 | 2,8 | 14 | 7,80 | 0,78 | | | |
| 31 | 8,30 | 2,23 | 14 | 9,00 | 2,9 | | | | | | |
| | | | 15 | 8,95 | 2,85 | | | | | | |
| | | | 16 | 8,95 | 2,85 | | | | | | |
| | | | 17 | 9,00 | 2,9 | | | | | | |
| | | | 18 | 8,95 | 2,85 | | | | | | |
| Prom. | 8,43 | 2,36 | Prom. | 8,97 | 2,88 | Prom. | 7,85 | 0,82 | | | |
| Con empleo de la mezcla 7% de ácido y 2% de etanol | | | | | | | | | | | |
| Velocidad: 90 ml/d. | | | Velocidad: 90 ml/d. | | | Velocidad: 90ml/d. | | | | | |
| Sales min.: 0,1 % | | | Sales min.: 0,1 % | | | Sales min.: 0,2 % | | | | | |
| Glucosa: 0,05% | | | Glucosa: 0,1 % | | | Glucosa: 0,05% | | | | | |
| Peptona: --- | | | Peptona: --- | | | Peptona: --- | | | | | |
| J | Acidez | Etanol | K | Acidez | Etanol | L | Acidez | Etanol | | | |
| | vinagre | transf. | | vinagre | transf. | | vinagre | transf. | | | |
| Fecha | obt. % | ml/día | Fecha | obt. % | ml/día | Fecha | obt. % | ml/día | | | |
| 5/8 | 7,90 | 0,79 | 16/8 | 7,75 | 0,65 | 19/9 | 8,45 | 1,25 | | | |
| 6 | 7,95 | 0,83 | 17 | 7,85 | 0,74 | 20 | 8,45 | 1,25 | | | |
| 7 | 8,05 | 0,92 | 18 | 7,85 | 0,74 | 21 | 8,65 | 1,45 | | | |
| 8 | 8,25 | 1,1 | 19 | 7,90 | 0,79 | 22 | 8,65 | 1,45 | | | |
| | | | 20 | 7,85 | 0,74 | 23 | 8,65 | 1,45 | | | |
| | | | 21 | 8,00 | 0,87 | 24 | 8,50 | 1,30 | | | |
| | | | 22 | 8,10 | 0,96 | | | | | | |
| | | | 23 | 8,30 | 1,15 | | | | | | |
| Prom. | 8,05 | 0,92 | Prom. | 7,95 | 0,83 | Prom. | 8,55 | 1,35 | | | |

Al igual que en todas las observaciones anteriores la adición de peptona (E) fué el recurso de mejores resultados. Empero la transformación estaba lejos de la que se había conseguido a 30°C con la misma mezcla. Una nueva disminución de la velocidad de carga (F) determinó otro aumento de la producción, de magnitud realmente notable, importó casi el 15 % de la elaboración obtenida según (E). Pero se seguía estando lejos de los 3,15 ml de alcohol transformados a 30°C.

Ahora bien, por analogía con la multiplicación de las acetobacterias (desarrollan con tanta facilidad cuanto menos ácido es el medio) se pasó a experimentar con una mezcla de menor acidez que conservaba la concentración alcohólica de la considerada tipo.

De acuerdo con las consecuencias obtenidas de los ensayos con la mezcla de mayor suma se eligió la velocidad de 100 ml diarios para el ensayo. Se debió preferir esta a la de 90 ml, más favorable, porque no pudiendo obtenerse una acidez superior al 9 % de haber trabajado con la segunda, se hubiese limitado de hecho la producción a una magnitud de por sí muy inferior a la que se deseaba alcanzar. Las concentraciones de sales minerales y glucosa se mantuvieron en 0,05 % respectivamente, en procura de lograr la finalidad propuesta, sin el empleo de relativamente altas adiciones de esas sustancias. (6).-

El resultado no pudo ser más promisor, la elaboración se duplicó casi, y aumentando la adición de materias salinas (H) de acuerdo con lo hallado en B, C y F, se llegó a un nivel tan solo inferior en aproximadamente 3,5 % al encontrado a 30°C. Cabe destacar que el máximo que se podía lograr era de 2,91 ml de etanol, menor en 7,5 % al anterior. Por otra parte, las instalaciones industriales acusan en verano (temperatura media muy próxima a la de ensayo 35°C) retrocesos en la elaboración que oscilan alrededor de 25 % con respecto a la producción de invierno, bajando rara vez del 20 %.

La aplicación de esta observación "disminución de la acetobacterias"

des de las mezclas en verano, acompañada de fuerte aumento de la nutrición salina" -a la práctica de fábrica puede resultar de gran valor.

Para completar las comprobaciones, se ensayó también una mezcla con mayor acidez y menor proporción del alcohol, a igualdad de la suma de ambos componentes comparada con la anterior (I, J, K, L), encontrándose su empleo si bien preferible a la 7+3 (experiencia F-L) pero nunca tan favorable como el de la de 6 % de etanoico más 3 % de etanol. En esta serie de ensayos se ha puesto marcadamente en evidencia la ventaja de la adición de sales comparada con la de glucosa (hidratos de carbono), especialmente en lo que se refiere a una mejor transformación (véase J-L y J-K).-

CAPITULO III

DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE ACETIFICACION.

Las conclusiones obtenidas del trabajo con ambos tipos de carga demuestran que los equipos piloto construidos y ensayados son buenas representaciones en las instalaciones industriales. Por tal razón se ha podido en el curso de las experiencias comprobar varias analogías de comportamiento con respecto a las segundas. Tanto imitan el funcionamiento de sus semejantes mayores que el presente trabajo ha resultado una excelente práctica industrial, al punto que, aún cuando nunca se tuvo antes oportunidad de manejar a éstos, pudieron encararse problemas industriales con la única experiencia de la dirección de los equipos reducidos. Se presentó la ocasión en este sentido de verificar en operación manual de gran escala la conveniencia del aumento de circulación de líquidos que se halló; su aplicación significó un aumento de producción de 10 a 15 %.

Volviendo a los trastornos térmicos estivales de los cuales padecen practicamente todos los generadores argentinos construidos según el tipo clásico europeo, se ha llegado a la conclusión que además de la posible solución de los mismos según párrafo 3 del capítulo anterior cabe contemplarse la posibilidad de ensayar para tal efecto un tipo distinto de transformador que responda a la condición de presentar mayor relación de superficie exterior a masa de relleno. Tal podría ser por ejemplo, un generador pequeño cuyo tamaño sea a lo sumo $\frac{2}{3}$ del normal descrito en la literatura, colocado en recintos amplios, relativamente espaciado uno de otro, todo para facilitar la eliminación del calor de oxidación por radiación que es la vía por la cual se produce la máxima pérdida (Wüstenfeld y Kreipe (1)).

Otra manera de encarar la cuestión sería la construcción

de aparatos gigantes pero con sistema de refrigeración dispuesto de tal modo que divida a la masa de relleno en sectores de volumen no superior a 1 m^3 .

Tales proposiciones se basan también en el comportamiento de los aparatos piloto, los cuales sin aislamiento dieron cifras de producción superiores a las del equipo con él, hecho explicable únicamente por las consideraciones térmicas ya mencionadas. Entonces, si al evitar la acumulación de calor, se aumenta el rendimiento debe ser factible lograr igual resultado con una disminución de tamaño de los aparatos, contribuyendo de este modo a solucionar los desequilibrios estivales apuntados.

CUARTA PARTE

CONCLUSIONES Y RESUMEN

CAPITULO 1.

CONCLUSIONES

1) En el curso de la investigación se hallaron bacterias acéticas capaces de desarrollar a 37°C que acetificaban fuerte y rápidamente.

2) Se verificó la inconstancia de la forma y agrupación de las células de las aceto bacterias estudiadas.

3) Se reconocieron cepas que pueden ser clasificadas como *B. aceti* (Hansen), *B. acetosum*, *B. Kützingianum*, o *B. Pasteurianum*, *B. curvum*, *B. Schützembachii*, *B. xylinoides* y *B. xylinum*.

4) Se encontraron algunas cepas no identificables con las aceto bacterias conocidas.

5) Se comprobó la necesidad de ensayos paralelos con cepas originales para identificar acetobacterias con seguridad.

6) En ensayos de acetificación con los generadores pilotos contruidos, se comprobó la conveniencia del empleo de la mezcla 4 % de ácido + 6 % de etanol para el trabajo con carga manual a temperaturas comprendidas entre 5 y 25°C y la de las mezclas 7 % de ácido + 3 % de etanol y 6 % de ácido + 3 % de etanol para la operación con carga automática en termóstato a 30 y 35°C respectivamente.

7) Se comprobó que la peptona (nitrógeno orgánico) era el estimulante de mayor actividad.

8) Se ensayaron distintas mezclas nutritivas minerales, comprobándose la ventaja del empleo de cualquiera de ellas frente a la glucosa (hidratos de carbono).

9) Se comprobó la influencia favorable de la mayor velocidad de afusión y se tuvo oportunidad de controlarla en una planta industrial.

10) Se observó que generadores piloto puestos en marcha con vinagre del que se habían eliminado las anguilulas por filtración, permanecían libres de ellas, no experimentando trastornos durante la acetificación.

11) Como consecuencia de las experiencias realizadas se proponen soluciones para los trastornos estivales en fábricas de vinagre, consistentes fundamentalmente

a) aumento en la cantidad de líquido que circula por el transformador y de la proporción de sustancias nutritivas minerales.

b) empleo de un tipo de transformador adaptado para el funcionamiento en regiones de clima cálido.

12) Se comprobó que los generadores reducidos se comportan de modo semejante a los industriales, tanto que con su manejo se acumularon experiencias análogas a las que podrían haber adquirido en la práctica de fábrica.



CAPITULO II

RESUMEN

El presente estudio de la acetificación por el procedimiento rápido abarcó el aspecto microbiológico y el establecimiento de las condiciones de transformación.

Se reconoció la existencia de distintos tipos de acetobacterias en los generadores investigados, que se aislaron de los mismos previo enriquecimiento y directamente, así como pasando por un ensayo de acetificación con virutas. Los 134 cultivos así obtenidos se compararon por la forma de las colonias, eliminándose los duplicados.

La descripción de los gérmenes de los 32 cultivos resultantes se hizo teniendo en cuenta las recomendaciones de rigurosa "standardización" de Tósió y Walker (1) siguiendo en general las normas de la planilla bacteriológica reducida de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos (1) realizando algunas observaciones suplementarias que se consideraron de interés.

La caracterización no pudo ser absoluta, ya que tuvo que llevarse a cabo en base a descripciones imprecisas, sobre todo en lo que respecta a composición de medios, condiciones de observación, etc. Se encontró en este sentido que toda clasificación resulta en realidad problemática sin ensayos paralelos con cepas originales. Los gérmenes reconocidos en estas condiciones fueron: B. acetii (Hansen), B. acetosum, B. Kützingianum o B. Pasteurrianum, gérmenes del grupo de B. Schözenbachii, B. curvum, B. xylinoides y B. xylinum.

En lo que respecta a las condiciones de acetificación, fueron estudiadas en plantas piloto de aproximadamente 3 litros de capacidad, que se construyeron imitando los generadores industriales.

Con ensayos con carga manual y automática (se ideó y construyó el dispositivo necesario), pudieron establecerse algunas influencias de temperatura, concentraciones de ácido y alcohol, así como de sustancias nutritivas. Los ensayos a temperaturas superiores a 25°C se llevaron a cabo colocando uno de los aparatos en un termóstato que se construyó a tal efecto.

Como consecuencia de aquellas experiencias se encontró que la planta piloto representaba bien a las industriales. De su comportamiento pudieron inferirse consecuencias aplicables al orden industrial, especialmente en lo que se refiere a los trastornos estivales para los que se proponen algunas soluciones.

CAPTULO III

BIBLIOGRAFIA

En los casos en que no se pudo disponer de la publicación indicada, se señalan entre corchetes las comunicaciones u obras a través de las cuales se ha tomado conocimiento del trabajo respectivo.

BEIJERINCK M. W.

- (1) Über die Arten der Essigbakterien (Centralb. f. Bakt. Abt. II 4 - 1898 pág.: 209)
- (2) Über die Pigmentbildung bei Essigbakterien (Centralb. f. Bakt. Abt. II 29 - 1911 pág.: 169)
- (3) (Bergey (1))

BERGEY D. H.

- (1) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"
5a. ed. Williams and Wilkins - Baltimore 1939

BROWN A. J.

- (1) On an acetic ferment which forms cellulose
(J. Chem. Soc. London Transact. 49 - 1886 pág.: 432)
- (2) The chemical action of pure cultivations of Bacterium Aceti (loc. cit. 49 - 1886 pág.: 172)
Further notes on the chemical action of Bacterium Aceti (loc. cit. 51 - 1887 pág.: 638)

BUCHNER E. y GAUNT F.

- (1) Über die Essiggährung (Liebig's Ann. d. Chem. 349 - 1906 pág.: 140)

y MEISENHEIMER J.

- (1) Enzyme bei Spaltpilzgährungen (Ber. deut. Chem. Ges. 36 - 1903 pag.: 634)

DAY F. E. y BAKER J. L.

- (1) A Bacterium causing Ropiness in Beer (Centralb. f. Bakt. Abt. II 36 - 1913 pág.: 433)

DINGLER

- (1) Dingler's Polytechn, Jour. 39 - 1831 pág.: 317
(Wästenfeld (1)) (Chem. Centralb. 1921 IV - 363)

DRATVINA T. V.

- (1) Dependence of alcohol- and acetic acid oxidation by acetic acid bacteria, on the pH and other conditions of the medium (Microbiol. 6 - 1937 pág.: 480)

FUHRMANN F.

- (1) Beih. z. Bot. Centralb. 19 - 1905 pág.: 8 (Bergey (1))

GUAGNINI O.A.

- (1) Método rápido de dosaje de alcohol en sangre, orina y otros humores, especialmente en casos de alcoholización y ebriedad (Rev. Asoc. Bioquim. Arg. Año 10 N° 35 pág.: 13 - 1944)

HANSEN E.C.

- (1) Compte rendue Carlsberg 1 - 1879 pág.: 49 y 96 (Luckow (1)) (Henneberg (1))
- (2) Ber. deut. Chem. Ges. 27 - 1893 pág.: 69 (Luckow (1))
- (3) Compte rendue Carlsberg 3 - 1894 pág.: 182 (Janke (1))

HENNEBERG W.

- (1) "Handbuch der Gärungs-bakteriologie" 2a. ed. Parey - Berlin 1926
- (2) Beiträge zur Kenntniss der Essigbakterien (Centralb. f. Bakt. Abt. II 3 - 1897 pág.: 223)
- (3) Weitere Untersuchungen über Essigbakterien (loc. cit. 4 - 1898 pág.: 14)
- (4) B. industrium und B. ascendens und Ergänzungen zu den bisherigen Untersuchungen über Essigbakterien (loc. cit. 4 - 1898 pág.: 933)
- (5) Zur Kenntniss der Schnell-essig- und Weinessigbakterien. Beschreibung fünf neuer Arten und des B. xylinum (loc. cit. 17 - 1906 pág.: 789)
- (6) Bakteriologische Untersuchungen in der Schnell-essigfabrik, sowie Anreicherungs- und Säuerungsversuche mit Schnell-essigbakterien (loc. cit. 16 - 1906 pág.: 551)
- (7) Die im lagernden Essig lebenden Organismen und die bei der Pasteurisierung des Essigs anzuwendenden Temperaturen (loc. cit. 16 - 1906 pág.: 591)

HERMAN S.

- (1) Über die sogenannte Kombucha (Biochem. Ztsch. 1928 - 1928 pág.: 188)
- (2) Glukonsäuredarstellung mittels B. gluconicum (Herman). (Centralb. f. Bakt. Abt. II 93 - 1935 pág.: 25)

y NEUSCHUHL

- (1) Zur Biochemie der Essigbakterien, zugleich ein Vorschlag für eine neue Systematik (Biochem. Ztsch. 233 - 1931 pág.: 129)

HOYER D.P.

- (1) Bijdrage tot de Kennis van de Azijnbacterien (Centralb. f. Bakt. Abt. II 4 - 1898 pág.: 867)

JANKE A.

- (1) Studien über die Essigsäurebakterien-Flora von Lagerbieren des Wiener Handels (Centralb.f.Bakt. Abt. II 45 - 1916 pág.: 1)

y BAUER E.

- (1) Beiträge zur Ergründung des Gärungsverlaufes in Schnell-essigbildnern (loc. cit. 45 - 1916 pág.: 145)
- (2) idem - Segunda parte - (loc. cit. 46 - 1916 pág.: 545)

KLUYVER y de LEEUV

- (1) Trabajo presentado ante la convención de la Sociedad Holandesa de Microbiología en 1923 (Bergey (1))

KREHAN M.

- (1) Beiträge zur Physiologie und Systematik der Essigbakterien - Primera parte - (Arch.F.Mikrobiol. 1-1930 pág.493)
- (2) idem - Segunda parte - (loc. cit. 2 - 1932 pág.: 277)

KÜTZING F. T.

- (1) Erdmann's Journ. f. prakt. Chem. 11 - 1857 pág.: 385 (Luckow (1)) (Wüstenfeld (1))

LAFAR F.

- (1) "Handbuch der technischen Mykologie" Tomo 5º Ed. Fischer Jena 1913 (Rothenbach (1))

LUCKOW C.

- (1) Vom Wesen der Essiggärung (Centralb.f. Bakt. Abt. II 72 - 1927 pág.: 79)

MAZZOCCO P. y RIETTL C. T.

- (1) "Guía de trabajos prácticos de Química Biológica" Ed. Moly y Lasserre Buenos Aires 1928

ROTHENBACH F.

- (1) "Die Untersuchungsmethoden und Organismen des Gärungs-essigs und seiner Rohstoffe" Ed. Percy - Berlin 1907
- (2) Dtsch. Essigind. 10 - 1906 pág.: 162 (Chem. Centralb. 1906 II - 622)
- (3) loc. cit. 22 - 1918 pág.: 235 (Chem. Centralb. 1919 II - 101)

SCHROHE A.

- (1) "Aus der Vergangenheit der Gärungstechnik und verwandter Gebiete" 2 partes. Berlin 1918 (Luckow (1))

SCHRANK

- (1) Dtsch.Essigind. 30-1926 pág.61 y 70 (Chem. Centralb. 1926 I - 3365)

SELIWANOFF

- (1) Notiz über eine Fruchtzuckerreaktion (Ber. Dtsch. Chem. Ges. 20 - 1887 pág.: 181)

SHIMWELL

- (1) J. Inst. Brewing 42 - 1936 pág.: 585 (Chem. Abst. año 1937 - 8037)

SOCIEDAD de BACTERIOLOGOS AMERICANOS

- (1) "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Geneva Nueva York 1939

SORIANO S.

- (1) Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la chicha (Rev. Inst. Bact. 8 - 1938 pág.: 231)

TAKAHASHI y ASAI

- (1) On Gluconis acid fermentation. On Bacterium Hosigaki var. rosea nov. Spec. (Centralb. f. Bakt. Abt. II 82 - 1930 pág.: 390)

TOSIG J. y WALKER T.K.

- (1) A procedure for the characterisation of the Acetic Acid Bacteria (J. Soc. Chem. Ind. 65 - 1946 pág.; 104)
(2) J. Inst. Brewing 50 - 1944 pág.: 296 (Chem. Abst. año 1945 - 38095)

y COSBIE

- (1) J. Inst. Brewing 48 - 1942 pág.: 82 (Chem. Abst. año 1942 - 58494)

UTKIN L.M.

- (1) Microbiology 6 - 1937 pág.: 421 (Chem. Abst. año 1938 - 34456)

VASIL`EV y SHAINS`KA

- (1) Mikrobiol. Zhur. 5 N°3 - 1938 pág.: 63 (Chem. Abst. año 1940 - 13479)

VISSER`T HOOFT

- (1) Inaug. Diss. Delft 1925 (Bergey(1)) (Krehan (2))

WATERMAN H.J.

- (1) Zur Physiologie der Essigbakterien (Centralb. f. Bakt Abt. II 38 - 1913 pág.: 451)

WOSTENFELD H.

- (1) "Lehrbuch der Essigfabrikation" Ed. Parey Berlin 1930

- (2) Dtsch. Essigind. 23 - 1919 pág.: 275 (Chem. Centralb. 1919 IV - 1010)
- (3) loc. cit. 25 - 1921 pág.: 237 (Chemie et Industrie 7 - 1922 pág.: 985)
- (4) loc. cit. 25 - 1921 pág.: 261 (Chemie et Industrie 7 - 1922 pág.: 985)
- (5) loc. cit. 26 - 1922 pág.: 9 (Chem. Centralb. 1922 II - 645)
- (6) loc. cit. 28 - 1924 pág.: 225 (Chem. Centralb. 1924 II - 2207)

y KREIPE

- (1) Dtsch. Essigind. 33 - 1929 pág.: 253 (Chem. Centralb. 1929 II - 2271)
- (2) loc. cit. 42 - 1938 pág.: 321 (Chem. Centralb. 1939 I - 271)

y LUCKOW C.

- (1) Dtsch. Essigind. 31 - 1927 pág.: 273 (Chem. Centralb. 1927 II - 1627)

ZEIDLER A.

- (1) Über eine Essigsäure bildende Thermobacterie (Centralb. f. Bakt. Abt. II 2 - 1896 pág.: 729)
- (2) Bemerkung zur Arbeit von Dr. H. Henneberg: Beiträge zur Kenntniss der Essigbakterien (Centralb. f. Bakt. Abt. II 3 - 1897 pág.: 399)

INDICE

| | pág. |
|--|------|
| PRIMERA PARTE: ANTECEDENTES. | |
| Capítulo I : Introducción. | 1 |
| Capítulo II: Antecedentes bibliográficos. | 4 |
| SEGUNDA PARTE: ESTUDIOS BACTERIOLOGICOS. | |
| Capítulo I Métodos de investigación. | |
| I) Procedimiento para el aislamiento de los gérmenes activos en los acetificadores rápidos | 23 |
| 1) Enriquecimiento en medios diversos | |
| a) Aislamiento por enriquecimiento previo | 24 |
| b) Enriquecimiento en medios que imitan las condiciones reinantes en un transformador | 26 |
| 2) Aislamiento directo | 28 |
| II) Procedimientos para el estudio en cultivo puro de los microorganismos aislados | |
| 1) Preparación de los medios de cultivo | 28 |
| 2) Método de siembra | 30 |
| 3) Características morfológicas | |
| a) forma y tamaño | 30 |
| b) Agrupación celular y movilidad | 31 |
| c) Coloración de Gram | 31 |
| d) Tinción con iodo | 31 |
| 4) Desarrollo en medios sólidos | |
| a) Colonias en cajas de Petri | 31 |
| b) Crecimiento en agar estría | 32 |
| 5) Desarrollo en medios líquidos | 32 |
| 6) Características fisiológicas | |
| a) Influencia de la temperatura | 32 |
| b) Influencia del oxígeno | 32 |
| 7) Características bioquímicas | |
| a) Acción sobre los hidratos de carbono | 32 |
| b) Reacción de Voges Proskauer y al rojo de metilo | 34 |

| | pág. |
|--|------|
| c) Formación de catalasa | 34 |
| d) Formación de indol y de hidrógeno sulfurado | 34 |
| e) Reducción de nitratos | 34 |
| f) Acción sobre la leche | 35 |
| Capítulo II: Investigaciones efectuadas | |
| I) Aislamientos | 36 |
| 1) Transformador industrial | |
| a) Aislamiento previo enriquecimiento | 36 |
| b) Aislamiento directo | 38 |
| 2) Transformador piloto N° I | |
| a) Partiendo de virutas | |
| aa) Aislamiento previo enriquecimiento | 38 |
| ab) Aislamiento directo | 40 |
| b) Partiendo de vinagre turbio | 40 |
| c) Partiendo de vinagre estacionado | 40 |
| 3) Transformador piloto N° III | |
| a) Partiendo de las películas | 41 |
| b) Partiendo de las virutas | 43 |
| c) Partiendo de los líquidos | 44 |
| II) Comparación de las colonias aisladas (en placas de agar de agua de levadura glucosada) | 45 |
| III) Estudio de los cultivos | |
| 1) Características morfológicas | 48 |
| 2) Desarrollo en medios sólidos | |
| a) Colonias en superficie de agar de agua de levadura glucosada | 49 |
| b) Crecimiento en estría | 50 |
| c) Cultivos en gelatina (punción) | 50 |
| 3) Desarrollo en medios líquidos | |
| a) Agua de levadura glucosada con cistina | 51 |
| b) Agua de peptona glucosada con cistina | 51 |
| 4) Características bioquímicas | 51 |
| 5) Características fisiológicas | 53 |
| IV) Discusión de los resultados obtenidos | 53 |
| V) Clasificación de las bacterias estudiadas | 57 |

TERCERA PARTE: OPERACION CON UNA PLANTA PILOTO

pag.

Capítulo I : Construcción de una planta piloto para la elaboración de vinagre por el método rápido.

| | |
|--------------------------------------|----|
| I) Construcción del generador piloto | 62 |
| II) Equipo para carga automática | |
| 1) Dispositivo de carga intermitente | 66 |
| 2) Sistema de alimentación de mezcla | 67 |
| III) Construcción de un termostato | 69 |

Capítulo II: Conducción de la planta piloto

| | |
|---|----|
| 1) Materia prima | 72 |
| 2) Mezclas hidro-aceto-alcohólicas | 73 |
| 3) Puesta en marcha a acetificación del generador | 74 |
| 4) Funcionamiento con carga manual | 76 |
| 5) Funcionamiento con carga automática | 77 |
| 6) Contralor de funcionamiento | 77 |

Capítulo III: Ensayos de acetificación en la planta piloto

| | |
|--|----|
| I) Ensayos con carga manual | 79 |
| 1) Puesta en marcha | 80 |
| 2) Acetificación con mezcla 4,5 % ácido y 7% de etanol | 82 |
| 3) Acetificación con mezcla 4 % ácido y 6 % de etanol | 84 |
| 4) Acetificación con mezcla 4% ácido y 3,5 % de etanol | 89 |
| 5) Acetificación con mezcla 5% ácido y 6,5% de etanol | 90 |

| | |
|---|------------|
| 6)Influencia de cargas calientes a baja temperatura ambiente | pág. 91 |
| II) Ensayos con carga automática | 92 |
| 1)Puesta en marcha | 92 |
| 2)Acetificación con la mezcla tipoa 30°C | 94 |
| 3)Acetificación a 35°C | 95 |
| Capítulo III: Discusión de los resultados de los ensayos de acetificación | 101 |
| CUARTA PARTE : CONCLUSIONES Y RESUMEN | |
| Capítulo I; Conclusiones | 103 |
| Capítulo II: Resumen | 105 |
| Capítulo III: Bibliografía | 107 |