

REVISTA

DE LA

FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

JUNIO DE 1936

ENTREGA II

TOMO VII



Alteraciones bacterianas de vinos argentinos ⁽¹⁾

POR EL ING. AGRÓN. ANTONIO ARENA

«Je me plais à rattacher aux explications de la science les usages techniques. Ils sont presque toujours le fruit d'observations justes».

PASTEUR (*Etudes sur le vinaigre et sur le vin*, pág. 145).

Las alteraciones bacterianas de los vinos no han sido objeto especial de estudio por los investigadores de la enotecnia argentina, no conociéndose con rigurosidad científica cuáles son las especies bacterianas presentes en nuestros mostos o vinos, si bien están establecidos los principales procesos de transformación que se presentan.

Como las alteraciones microbianas de los vinos no constituyen actualmente en el país un problema, debido a la técnica enológica avanzada, su investigación no presenta beneficios económicos inmediatos. Pero, como existen procesos bacterianos que normalmente se presentan en los vinos y como, además, las pequeñas zonas de elaboración emplean aún métodos de vinificación atrasados, constituyendo aquéllas una de las más serias consecuencias, motivadas las más de las veces por la falta de higiene, como he podido comprobarlo, la determinación científica de los gérmenes de las enfermedades y de las transformaciones que causan en los vinos, tiene aún, además del interés científico, importancia económica real.

Esa misma circunstancia de ser raras, en general, las enfermedades, en las grandes zonas vinícolas del país, hace su estudio dificultoso. Por eso, la ocasión de encontrarme frente a gran cantidad de material me

(1) Trabajo realizado como adscripto «ad-honorem» al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires, durante los años 1932 y 1933.

indujo a abordar la investigación de este asunto, cuyos resultados constituyen el presente trabajo.

Los estudios realizados, consistieron en la determinación de la composición química y alteraciones de los vinos enfermos investigados, y en el aislamiento y caracterización de los gérmenes presentes, causantes de aquéllas. La reproducción artificial de las enfermedades, que no efectué, fué subsanada con el método de aislamiento adoptado.

El trabajo hecho, está lejos de ser un estudio completo del tema, lo que hubiera significado intensificar la investigación química de las transformaciones causadas por los gérmenes en mostos o vinos, cosa que no he efectuado, debido a su amplitud para ser abordada individualmente. Considero que esas investigaciones serían un complemento del estudio realizado, del cual podría sacarse, tal vez, conclusiones prácticas, como las que se derivarían de la investigación de los procesos bacteriológicos útiles, según se verá en el texto.

Al publicar los resultados de las experiencias hechas, no creo haber resuelto el problema de las transformaciones bacterianas de los vinos del país. Las conclusiones obtenidas sólo constituyen una contribución a su esclarecimiento, basada en datos propios, quedando como consecuencia de las mismas, numerosas lagunas y planteados algunos problemas, que únicamente pueden resolverse en las propias zonas de elaboración, perteneciendo más al campo de la práctica industrial, que a la investigación de laboratorio.

Deseo con el presente trabajo trazar los lineamientos generales del conocimiento de los bacterios de nuestros vinos, esperando que alguien los complete y que sean de utilidad a otros investigadores.

Dejo constancia de mi agradecimiento al profesor de Microbiología, ingeniero agrónomo Santos S. Soriano, por las atenciones y consejos dispensados mientras hacía las investigaciones, y por haberme sugerido algunos de los métodos utilizados. Agradezco también al jefe de trabajos prácticos de la misma cátedra, ingeniero agrónomo Julio A. Paso, por las facilidades que me dió para su ejecución.

Agradezco igualmente a los profesores doctor Federico Reichert e ingeniero agrónomo Emilio F. Paulsen, por las indicaciones suministradas durante la ejecución de las determinaciones químicas en el Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad; al doctor Andrés L. Corso, quien hizo efectuar en el laboratorio a su cargo, de la Oficina Química Nacional, algunas determinaciones analíticas de los vinos estudiados; y al estudiante de agronomía A. H. do Pico, quien me sirvió de ayudante en algunos análisis de vino.

Agradezco también al profesor ingeniero agrónomo José Testa, al

ingeniero agrónomo Alfredo Boltshauser, y a todas aquellas personas que hayan suministrado algún aporte para el presente trabajo.

I. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE LAS ALTERACIONES MICROBIANAS DE LOS VINOS

a) EVOLUCION DEL CONCEPTO DE LAS ALTERACIONES DE LOS VINOS

Las enfermedades de los vinos, son conocidas, puede decirse, desde que se conoce la elaboración del vino.

Los antiguos, según GALENO, determinaban la época en que cada vino debía beberse, a fin de evitar las alteraciones, y según TRILLAT, PLINIO el viejo ⁽¹⁾ y TEOFRASTO ⁽²⁾ citan vinos con tendencia al amargo.

Mucho antes de PASTEUR se intentó dar la explicación de las enfermedades. Se admitía entonces, que el vino estaba siempre en un estado de trabajo interno, y que después de la fermentación, si no se establecía el equilibrio entre los diversos constituyentes, el líquido enfermaba.

Hacia 1800 el conde CHAPTAL emitió su teoría sobre las enfermedades, como consecuencia de los estudios de FABRONI sobre la fermentación vinaria. CHAPTAL suponía que la fermentación era normal si había equilibrio entre la sustancia végeto-animal, que según FABRONI producía la fermentación, y el azúcar. Cuando este estaba en exceso, el vino quedaba dulzaino, pero si la sustancia végeto-animal era la que abundaba, el resto que no se utilizaba en la fermentación, producía, decía, todas las enfermedades propias del vino.

El concepto de CHAPTAL fué sostenido por todos los autores que se ocuparon del problema, posteriormente, hasta PASTEUR. Fué después de las investigaciones del fundador de la Bacteriología, que las verdaderas causas de las alteraciones de los vinos se conocieron, y al señalarse la presencia del micro-organismos como causantes de las mismas, se pudo, no solamente dar la real explicación del fenómeno, sino también establecer los procedimientos para prevenirlo o corregirlo.

Las primeras observaciones de PASTEUR en vinos alterados, comenzaron en 1858, y sus estudios se prosiguieron hasta 1866, en que publi-

(1) Lib. XIV *Insigna Culturae Vinearum*.

(2) De Causis, lib. VI, cap. X.

có sus: «Etudes sur le vin. Ses maladies, causes qui le provoquent. Procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir», cuya segunda edición apareció en 1873.

PASTEUR no solamente demostró la existencia en los vinos, de microorganismos (hongos y bacterios), a los cuales consideró como causantes de las alteraciones, sino que estudió cada tipo de enfermedad, considerando las sustancias normales del vino desaparecidas, y los nuevos productos formados como consecuencia de la actividad microbiana; y describió en cada caso los gérmenes que a su juicio producían las alteraciones. Consideraba así: la enfermedad de la acetificación, la de los vinos «tournés, montés, qui ont la pousse», la enfermedad de la grasa, «vins filants, vins huileux», y la del amargor o amargo, de gusto a viejo.

Sus investigaciones estaban basadas exclusivamente en la observación directa y la constatación de la alteración; no hizo pues, cultivos de los bacterios de los vinos, y, por lo tanto, no reprodujo artificialmente las enfermedades.

Los estudios que con posteridad a PASTEUR se efectuaron, confirmaron ampliamente sus observaciones. Los numerosos microorganismos que, estudiados en cultivo puro, permitieron dar la explicación actual del proceso de las alteraciones microbianas de los vinos, demuestran la exactitud del punto de vista con que el gran maestro resolvió el problema, y muchas de sus observaciones, aún actualmente, después de casi tres cuartos de siglo, conservan, dentro de las modificaciones a que está naturalmente sujeto todo conocimiento científico, el valor y la importancia que se atribuyó en aquella época.

Después de PASTEUR, con el impulso general que tomó la Bacteriología, numerosos investigadores se ocuparon del estudio de las enfermedades de los vinos.

Se aislaron bacterios, y se estudiaron en cultivo puro, haciéndose la reproducción artificial de las alteraciones. Se constataron en esta forma la existencia de enfermedades que no habían sido descritas por PASTEUR, como la fermentación manítica, y otras de menor importancia, y se reconoció, además, la presencia en los mostos, de procesos bacterianos que no influyen desfavorablemente en la fermentación alcohólica normal, sino que, antes bien, pueden ser necesarios y útiles en algunas ocasiones: tal es la destrucción del ácido málico con producción de ácido láctico.

Las investigaciones de los diversos autores que se ocuparon del asunto, entre los que debe mencionarse en primer término a MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, por el gran aporte efectuado al conocimiento científico de la bacteriología de los vinos, el mayor sin duda después

de los estudios de PASTEUR, permitieron establecer los procesos bioquímicos que corresponden a las diversas alteraciones conocidas.

Sin hacer un análisis detallado de los conocimientos actuales sobre las diversas alteraciones bacterianas de los vinos, que expongo en otro trabajo ⁽¹⁾, consideraré brevemente a continuación cada una de ellas, señalando los agentes que las causan.

b) LAS DIVERSAS ALTERACIONES MICROBIANAS DE LOS VINOS

Las alteraciones microbianas de los vinos pueden ser causadas por organismos aerobios o anaerobios. Entre las primeras se encuentran la llamada flor del vino, y la acetificación. Entre las segundas se tienen: la fermentación lactomanítica, el torcido, la fermentación maloláctica, la viscosidad, el amargo, y otras alteraciones menos corrientes, algunas de ellas de existencia no demostrada de manera indudable, como son: el enturbamiento, la fermentación butírica, la alteración sulfhídrica, y el olor a ratas.

1. *La flor del vino. La acetificación*

Estas alteraciones son causadas por microorganismos (hongos y bacterios) exclusivamente aerobios, cuya principal actividad es la oxidación del alcohol en ácido acético y en CO₂. La circunstancia de desarrollarse únicamente en presencia del oxígeno del aire, hace que esta alteración, en la práctica, sin perder la importancia que tiene, sólo sea un accidente de la industria, motivado por la no observación de preceptos técnicos a veces elementales (rellenos, tapado de recipientes, etc.), muy diferente de las otras alteraciones causadas por microbios anaerobios, en que los medios de impedir el desarrollo no dependen a veces del bodeguero (composición del mosto, etc.).

Mencionaré aquí, por lo tanto, sólo los organismos que las provocan y las principales consecuencias de su actividad, dado que por las características que presentan debe ser objeto de estudio aparte.

La flor del vino se caracteriza por la producción de una membrana o velo superficial en el mosto o vino, la que a medida que progresa el desarrollo de los microorganismos, se espesa, ascendiendo por las paredes del recipiente o cayendo al fondo.

Al lado de la alteración del gusto o aroma, hay cambios quími-

(1) ARENA, A., 1935. *Las alteraciones bacterianas de los vinos. Con especial referencia a las encontradas en la República Argentina* (inédito).

cos causados por la oxidación del alcohol y otros procesos de degradación de los azúcares, del ácido málico, succínico, tal vez de la glicerina, de las sustancias tánicas y colorantes con producción de ácidos volátiles, éteres, alcoholes superiores y aldehidas (DE ROSSI).

La principal actividad es la oxidación del alcohol con formación de ácido acético; pero la presencia de éste puede decirse que es transitoria, por cuanto lo resisten en poca cantidad y lo oxidan hasta CO_2 , casi a medida que lo produce. La principal alteración que se produce en los vinos es, por lo tanto, la disminución del grado alcohólico, con todas las consecuencias que ello pueda traer.

Los microorganismos causantes de la flor del vino son Eumicetas, pertenecientes a los géneros *Mycoderma*, *Pichia* y *Willia*. Estos dos últimos Sacaromicetáceas. Las micodermas son Deuteromicetas, filogenéticamente consideradas vecinas de las levaduras. Se han señalado en vinos:

Mycoderma vini DE ROSSI

Mycoderma duplex DE ROSSI

Mycoderma tenax DE ROSSI

Mycoderma acidificans DE ROSSI

Pichia membranaefaciens HANSEN (= *Sacch. membranaefaciens* HANSEN)

Pichia californica SEIFERT (= *Sacch. membranaefaciens* var. *californicus* SEIFERT)

Pichia taurica SEIFERT (= *Sacch. membranaefaciens* var. *tauricus* SEIFERT)

Willia anomala HANSEN (= *Sacch. anomalus* HANSEN).

La acetificación o picadura acética es generalmente una consecuencia de la flor; éstas pueden decirse que preparan el medio de la picadura.

La principal característica es la oxidación del alcohol a ácido acético, en forma enérgica, con la intervención del oxígeno del aire, provocando el avinagramiento del vino.

Se presenta también en forma de velos superficiales (madres del vinagre), de grosor y aspecto variable según la especie que interviene, los que ascienden igualmente por las paredes de los recipientes y finalmente se depositan.

A la acetificación del vino, sigue, como consecuencia, la modificación de los caracteres organolépticos y demás acciones físicas y químicas que constituyen la transformación del vino en vinagre, que no es del caso citar en este lugar.

Los causantes de la picadura acética son bacterios, exclusivamente aerobios, de los cuales se han aislado numerosas especies en vino, cerveza, mostos, etc. A título ilustrativo se citan las siguientes tomadas de DE ROSSI:

Bacterium aceti HANSEN
Bacterium Pasteurianum HANSEN
Bacterium Kützingerianum HANSEN
Bacterium oxydans HENNEBERG
Bacterium industrium HENNEBERG
Bacterium Schützenbachi HENNEBERG
Bacterium orleanense HENNEBERG
Bacterium curvum HENNEBERG
Bacterium ascendens HENNEBERG
Bacterium acetosum HENNEBERG
Bacterium vini acetati HENNEBERG
Bacterium acetigenum HENNEBERG
Bacterium xylinoides HENNEBERG
Bacterium xylinum BROWN
Etcétera.

2. La fermentación lactomanítica

He agrupado bajo un mismo título dos alteraciones que hasta el presente se han descripto como cosas distintas: la fermentación láctica y la fermentación manítica.

En realidad, como bien lo sostienen MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, se trata de un mismo proceso fermentativo, causado por los mismos gérmenes, cuyos productos de fermentación varían según substancias hidrocarbonadas que destruyen, azúcares especialmente. Se encuentran entre los principales el ácido láctico y la manita; el primero es constante, mientras que la producción de manita está ligada a la existencia de levulosa, substancia a expensas de la cual se forma y, por lo tanto, no siempre se observa.

La distinción principal entre la fermentación láctica y la fermentación manítica, se debe, entonces, a la presencia o ausencia de manita, dado que los otros productos originados son iguales.

La alteración lactomanítica se presenta en los mostos en fermentación, especialmente al final de la misma, o en los vinos ya hechos, sobre todo si quedaron con azúcar sin descomponer. Los caracteres organolépticos del líquido se altera: el olor es acético, y a veces aromático, el gusto acídulo y algo picante en la fermentación láctica pu-

ra, y dulzaína en la fermentación manítica, debido a la presencia de manita formada a expensas de la levulosa, el color permanece generalmente inalterado. El aspecto es casi siempre turbio, por la masa microbiana en suspensión, pero dejando el líquido en reposo, se aclara, por deposición de la misma; con la agitación se levantan nuevamente en el seno del mismo en forma de ondas o nubes.

La principal transformación química que se observa, es la fermentación de azúcares, con formación de elevadas cantidades de ácido acético y láctico que elevan la acidez volátil y la acidez fija, y también de CO₂, glicerina, y ácido succínico. De levulosa se forma, además, manita y de los otros azúcares alcohol etílico. La manita eleva el extracto del vino, característica esta que tiene mucha importancia; sin embargo, a veces no es posible constatar su existencia, a pesar de haberse originado, por cuanto por el desarrollo de otros gérmenes ha desaparecido (1).

A veces hay también destrucción de acidez fija, pues el ácido málico y el ácido cítrico, pueden ser fermentados con producción de ácidos volátiles y de ácido láctico.

Los causantes de la enfermedad son bacterios de los que se han aislado varias especies. En un comienzo se creyó que había un solo tipo de fermento manítico, específico de la alteración, pero posteriores investigaciones demostraron que hay varias especies, las que sin embargo presentan un conjunto de características semejantes.

Entre los primeros investigadores que estudiaron los bacterios maníticos se encuentran: BASILE, DE CILLIS, PEGLION, PARIS, entre los italianos; GAYON y DUBOURG, LABORDE, MAZÉ Y PACOTTET, en Francia; MÜLLER-THURGAU Y OSTERWALDER, en Suiza, etc.

El primer bacterio manítico estudiado en cultivo puro y descripto, cuya autenticidad se demostró, es el «fermento manítico» de GAYON Y DUBOURG, estudiado por estos autores (1894, 1901, 1904) que se aisló en un vino blanco manítico de Algeria y fué cultivado en caldo Liebig (20 — 30 g. por l.). agua de levadura (200-250 g. por l.), o jugo de uva diluido.

Este germen se consideró durante mucho tiempo como el representante típico de fermentos maníticos sin darle nombre. MÜLLER-THURGAU Y OSTERWALDER ampliaron la descripción morfológica (1917), al estudiarlo comparativamente con los gérmenes que aislaron de vinos suizos, y lo designaron *Bacterium Gayoni*.

Los bacterios maníticos que estudiaron LABORDE (1894-1904), y

(1) Lo he podido constatar en vinos alterados que presentaban simultaneamente bacterios maníticos, y otros fermentadores de manita.

MAZE-PACOTTET (1904), sin establecer las diferencias con el fermento manítico de GAYON y DUBOURG, presentan como todos los bacterios maníticos, características análogas.

Además del estudio de GAYON y DUBOURG, se encuentran como principal contribución al conocimiento de los bacterios maníticos, las investigaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER quienes al estudiar los diversos bacterios por ellos aislados, en detalle, y comparativamente con otros gérmenes, corroboraron los resultados de GAYON y DUBOURG sobre la fermentación manítica, y establecieron las diferencias morfológicas y fisiológicas de los mismos dando la clave para su clasificación.

Las investigaciones de estos autores se efectuaron en Suiza, sobre vinos alterados, de uva y otras frutas, comenzándose en 1890. MÜLLER-THURGAU estudió entonces, la fermentación láctica de los vinos de frutas describiendo un *Bacterium pilluliformans* ⁽¹⁾, germen que en posteriores estudios se consideró vecino al *Bacterium mannitopoeum* aislado por el mismo autor de vinos de frutas con picadura láctica ⁽²⁾ (1913).

MÜLLER-THURGAU describió otro bacterio manítico perteneciente al grupo de los gérmenes enérgicos destructores del ácido málico y excepcionalmente productor de fermentación manítica, al que designó *Bacterium gracile* ⁽²⁾ (1913).

Años más tarde, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER estudiaron un nuevo bacterio manítico (1917), que llamaron *Bacterium intermedium*, aislado de vinos tintos suizos alterados, germen capaz también de dar fermentación láctica pura del ácido láctico, como el *Bacterium gracile*.

En sus primeras observaciones, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER utilizaron como medio de cultivo, jugo de peras de diversas variedades (peras de agua) y jugo de uva fuertemente desacidificado, aislando sobre los mismos medios (desacidificados) que solidificaron al agar o gelatina.

Posteriormente usaron como medio de cultivo más enérgico, agua

(1) MÜLLER-THURGAU, H., *Eine bisher noch nicht beschriebene Weinkrankheit*. III. Jahresber. d. deutsch. Schweiz. Versuchsstat. und Schule f. Obst. Wein und Gartenb. in Wädenswil. 1892-1893, p. 93.

MÜLLER-THURGAU, H., *Der Milchsäurestick der Obst und Trauben weines*. Centralb. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4, 1898, p. 849.

(2) MÜLLER-THURGAU, H., *Mannitgärung in Obst und Trauben weinen*. Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1907.

MÜLLER-THURGAU, H., *Bakterienblasen* (Bakterio cysten). Centralb. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20, 1908 (pág. 463 Bact. mannitopoeum, pág. 464 Bac. gracile).

de levadura azucarada y acidificada, aislando sobre gelatina nutritiva, picando las colonias bajo el microscopio.

Los típicos bacterios de la fermentación lactomanítica de los vinos, son, en consecuencia; *Bacterium Gayoni*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER; *Bacterium mannitopoeum*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER; y *Bacterium intermedium*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Las diversas especies de bacterios maníticos se distinguen especialmente por la fermentación de azúcares, glucósidos y ácidos orgánicos, pues morfológicamente algunas se parecen.

3. El torcido

Esta es una alteración que se presenta especialmente en los vinos tintos, pudiéndose observar también en los vinos blancos. Corrientemente se observa en los vinos hechos.

Los vinos torcidos se caracterizan por la enérgica alteración de sus caracteres organolépticos. El olor es desagradable, acético, picante. El gusto es a veces insípido o acre, y aún ligeramente amargo. La materia colorante sufre transformaciones; leves al principio de la enfermedad con decoloración del vino, son más enérgicas luego, produciéndose una verdadera «casse» con precipitación completa de la misma, presentando el líquido un abundante depósito, de aspecto mucoso, que con la agitación se eleva, en igual forma que en los vinos maníticos.

El torcido de los vinos es una alteración compleja, y la modificación de los caracteres organolépticos es una consecuencia de las transformaciones químicas producidas por la actividad bacteriana, que se efectúa especialmente sobre las sustancias del extracto.

El ácido tartárico y sus sales desaparecen y la glicerina es atacada. Con la disminución de la acidez fija, la materia colorante precipita, produciéndose una verdadera quebradura del color, tornándose el vino achocolatado; y si es expuesto al aire, el oxígeno lo vuelve negrozco.

De las escrupulosas investigaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, se deduce que el torcido no es una fermentación propiónica del ácido tartárico y sus sales, como lo sostuviera DUCLAUX, sino que estas sustancias son fermentadas con producción de ácido acético y carbónico, y la glicerina, además, con formación de ácido acético, propiónico y láctico. Los autores observaron que la glicerina siempre es atacada, mientras que el ácido tartárico a veces no está alterado; además, sugieren que otras sustancias del extracto, como el ácido láctico, pueden ser atacadas.

La consecuencia principal de las transformaciones que se producen en los vinos torcidos, es el aumento de la acidez volátil, la disminución del extracto, característica ésta diametralmente opuesta a la fermentación lactomanítica, y la quebradura del color.

En la descripción de esta enfermedad por los diversos autores, hay una verdadera confusión, pues se describen con diferentes nombres, alteraciones que tienen exactamente la misma característica, o bien que se producen en vinos tan descompuestos que ya no merecen tal nombre.

Es corriente oír hablar de las ondas sedosas de los vinos torcidos, como si fuera una característica específica de la enfermedad, cuando no es más que el efecto de la agitación de una suspensión coloidal sedimentada, y que se presenta igualmente en vinos maníticos, o con otras alteraciones.

De la misma manera, reina confusión en la descripción que hacen los autores franceses e italianos de la enfermedad, cuando consideran que existe la «pousse» o «subbollimento» y la «tourne» o «girato», no distinguiéndose ambas más que por la presencia de CO_2 en la primera.

Como bien lo observan MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER no existe fundamento para caracterizar una enfermedad por el desarrollo de CO_2 , pues esto se observa en la fermentación lactomanítica, la fermentación de ácidos, la gratitud, etc. Estos autores sostienen que los investigadores franceses tal vez han descrito como vinos con «pousse», lo que no era más que una fermentación maloláctica, o comienzo de picadura láctica.

Como agentes de la alteración del torcido, descubrió PASTEUR, bastoncitos finos agrupados en filamentos de largo variable, del grosor de un micrón, que encontró muy parecidos a los gérmenes de la fermentación láctica; MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER suponen que PASTEUR no haya tenido en estudio verdaderos vinos torcidos, sino casos de picadura láctica.

Después de PASTEUR se describieron muchos gérmenes como los agentes del torcido, pero con características que los descartan como tales. Así se pueden considerar el *Bacillus saprogenes vini* I—VII y *Micrococcus saprogenes vini* I—II, de KRAMER, estudiado en 1890, y el *Bacillus roseus vini* A y B de BORDAS, JOULIN y de RACKOWSKI (1898 b, 1898 d).

En Italia, GALEAZZI, en 1895, señaló gérmenes de vinos torcidos con características que presentan otros bacterios de los vinos, pero sin demostrar que fueran los agentes de esa alteración. FORTI en 1901 describió el *Bacterium Abbae*, aislado de vinos torcidos por cultivos de enri-

quecimiento, con el que habría conseguido reproducir la enfermedad en vinos sanos. Llama la atención que este germen sea aerobio y capaz de formar velos en cultivos artificiales siendo que los bacterios de las enfermedades de los vinos son anaerobios facultativos, exceptuados los de la picadura acética.

PAVARI, en 1911, aisló también de vinos torcidos italianos un bacterio al que DE ROSSI llamó *Bacterium Pavarii*. Este germen es el único de los estudiados en Italia que por sus características sería uno de los típicos agentes del torcido. Si bien se aisló por cultivos previos de enriquecimiento, se habría conseguido reproducir la alteración en vinos sanos, pero no se menciona como se constató. Tampoco se cita si comprobó ataque de glicerina o ácido tartárico, pues los caracteres organolépticos son insuficientes para saber si un vino está torcido.

En Francia, MAZÉ y PERRIER (1903) y MAZÉ y PACOTTET (1904) aislaron gérmenes que se describen como agentes del torcido, los que presentan características análogas a los bacterios maníticos. Como bien lo sostienen MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, estos autores han estudiado fermentos maníticos del tipo *Bact. mannitopoeum* o *Bact. Gayoni*, pues no se comprobó desaparición del ácido tartárico en el vino originario ni su ataque en medios nutritivos artificiales o en vinos sembrados.

LABORDE (1898-1904) aisló gérmenes de vinos torcidos, con características de bacterios maníticos a los que consideró como los agentes de la alteración, la que habría conseguido reproducir en vinos esterilizados, constatando destrucción del ácido tartárico y producción de ácidos volátiles.

MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER observan que LABORDE no establece de manera indudable que el vino de donde fuera aislado el germen estuviera realmente torcido, es decir, con el ácido tartárico destruido. Con respecto a la reproducción de la enfermedad, dicen que sólo comprobaron escasa desaparición del ácido tartárico (0,8-1,1 o/oo) que dicen podría explicarse por precipitación del crémor-tártaro. En cuanto a la producción de ácidos volátiles, 3,13 o/oo, manifiestan que sólo una parte sería producido a expensas del ácido tartárico, siendo el resto originado del azúcar existente (2 o/oo) al comienzo del ensayo; deducen en consecuencia que LABORDE reprodujo más bien la picadura láctica que el torcido.

Sin dejar de considerar que el *Bacterium Pavarii* de los vinos italianos, y tal vez el *Bacterium Abbae*, o bien los gérmenes estudiados por LABORDE pueden ser realmente agentes del torcido, las únicas investi-

gaciones sobre vinos torcidos, científicamente inobjetables son las de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Estos autores investigaron (1919) numerosos vinos torcidos que tenían el ácido tartárico y la glicerina alterados, aislando un *Bacterium tartarophthorum* capaz de destruir activamente estas sustancias, y, además, otro germen igualmente activo en la destrucción del ácido tartárico, pero que atacó débilmente la glicerina, presentando características análogas al primero, que fué designado *Bacterium tartarophthorum* a considerándose como una variedad. Ambos son fermentos manílicos.

El *Bacterium tartarophthorum*, que debe considerarse uno de los agentes típicos del torcido, ataca el ácido tartárico formando ácido acético y carbónico, y descompone lentamente la glicerina originando ácidos acético, propiónico y láctico.

4. La fermentación maloláctica

Como anteriormente se mencionó, este es un proceso biológico que tiene lugar durante la formación del vino, como consecuencia del cual pueden mejorarse sus caracteres organolépticos, por lo que sólo excepcionalmente constituye una enfermedad.

Es sabido que la acidez originaria del mosto, disminuye sensiblemente durante la fermentación alcohólica. Durante mucho tiempo se trató de explicar el fenómeno, por la precipitación del crémor-tártaro, y luego por la acción de la levadura sobre el ácido málico, u otros ácidos orgánicos, que algunos autores ponen en duda. Pero ninguna de las dos formas de disminución de la acidez, permitió explicar la desintegración de ácidos del mosto en las proporciones en que tiene lugar.

Los verdaderos agentes del fenómeno, son bacterios, como lo sostuvo MÜLLER-THURGAU en sus primeros estudios sobre el asunto en 1890, que comprobaron luego KOCH y SEIFERT, y estudiaron detenidamente MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER (1913).

La desintegración de la acidez del mosto («Säure-abbau» de los alemanes), reside fundamentalmente en la fermentación del ácido málico, especialmente al final de la fermentación primaria, con formación de ácido láctico y carbónico, sin originarse ácidos volátiles, o sea la transformación de un ácido bibásico en uno monobásico, que trae como consecuencia la disminución de la acidez total, y el enriquecimiento del vino en ácido láctico.

Este es el origen del ácido láctico de los vins sanos, que, por lo tanto, debe considerarse un constituyente normal del vino, como lo demostraron por primera vez MÜLLER I. J. en 1896, KUNZ y MOESLINGER en 1901

y corroboraron posteriormente ROESLER en 1902, SOSTEGNI y PRANDI en 1903, PARIS (1907), y confirmaron en escrupulosos estudios BARAGIOLA y GODET en 1912, y los autores que investigaron el asunto con posterioridad.

Como bien lo observaron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, la destrucción del ácido málico no es una enfermedad, por cuanto no hay alteración desfavorable de los caracteres organolépticos del vino, sino que, por el contrario, suele ser un proceso conveniente, sobre todo en las regiones vinícolas que producen mostos muy ácidos, en donde la fermentación maloláctica contribuye a la obtención de vinos más armónicos.

Deben exceptuarse los procesos de destrucción de ácidos del mosto, causados por los mismos gérmenes de la fermentación maloláctica, que señalaron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER (1903) en los que se observó una alteración idéntica al torcido causado por la destrucción del crémor-tártaro, con producción de ácidos volátiles, quebradura del color, gusto malo, etc. Esa alteración, los autores la constataron en mostos pobres en ácidos y consiguieron reproducirlas artificialmente en mostos desacidificados.

Los agentes conocidos de la fermentación maloláctica son micrococos, y también bastoncitos.

MÜLLER-THURGAU (1) en 1890 comprobó que la fermentación maloláctica era causada por bacterios. Posteriormente KOCH (2) en 1900 hizo estudios sobre la misma utilizando cultivos puros de los gérmenes, que no describió, ignorándose si usó bastoncitos o cocos.

SEIFERT (3) en 1901 aisló de vinos con intensa fermentación maloláctica un micrococo, que cultivó en agua de levadura, con el que consiguió la fermentación del ácido málico, al que llamó *Micrococcus malolacticus*.

Posteriormente, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER (1913) en escrupulosas investigaciones, aislaron dos micrococos más, de características análogas al de SEIFERT, a los que llamaron *Micrococcus acidovorax* y *Micrococcus variococcus*, que dan fermentación láctica del ácido málico y de los azúcares.

(1) MÜLLER-THURGAU, H., *Ueber die Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiete der Weinbereitung*. Beri. d. XII Deutsch Weinbaukongr. in Worms. Mainz, 1891, p. 128.

(2) KOCH ALF., *Ueber die Ursachen des Verschwindens der Säure bei Gärung und Lagerung des Weines*. Weinbaukong. Colmar. Weinbau und Weinhandel, t. 18. No 40, 1900.

(3) SEIFERT, W., *Ueber die Säureabnahme in Wein und den dabei sich vollziehenden Gärungsprozess*. Mitt. a. d. Gärungsphysiol. Lab. Klosterneuburg, 1901.

Además de los micrococos, son gérmenes activos de la fermentación maloláctica, el *Bacterium gracile* MÜLLER-THURGAU, anteriormente mencionado como fermento manítico, y algunos bacterios maníticos como el *Bacterium intermedium*, que destruyen el ácido málico sin formar acidez volátil.

Los diversos micrococos malolácticos se distinguen por la fermentación de azúcares y glucósidos, y algunos por el diámetro de sus elementos.

5. La viscosidad, grasitud o ahilamiento

Esta alteración, como su nombre lo indica, se caracteriza por la producción en los mostos o vinos atacados de una sustancia viscosa que dá al líquido consistencia de aceite, grasosa, y que es la causa de que se vierta silenciosamente de los recipientes que lo contienen, escurriéndose lentamente, y de que permita la formación de hebras como los jarabes. Hay producción de ácidos volátiles y de CO₂.

Los típicos agentes de la alteración son bacterios, estudiados por numerosos autores.

PASTEUR señaló en vinos, gruesos elementos esféricos reunidos en rosario.

KRAMER en 1889 describió un *Bacillus viscosus* vini que formaría la sustancia viscosa a expensas de glucosa, de la cual se originaría además CO₂ y manita.

BOERSCH en 1893 señaló sarcinas que consideró vecinas de la *Sarcina flava* DE BARY, pero no consiguió reproducir la alteración. El germen aislado según BEHRENS, 1896, es un micrococo.

ADERHOLD en 1894, atribuyó la enfermedad a un *Diplococcus* I, sin conseguir reproducirla.

MAZE Y PACOTTET (1904) aislaron de vinos grasos, un bastoncito que se comportó como fermento manítico, el que también encontraron en vinos torcidos o amargos.

LABORDE al mismo tiempo en 1904, aisló de vinos grasos dos bastoncitos: N° 1 y N° 2. El N° 1 dá fermentación alcohólica de la glucosa y fermentación manítica de la levulosa. El N° 2 dá los mismos productos, pero no desprende CO₂ y no forma manita de la levulosa (1).

Las investigaciones más completas sobre la viscosidad de los vinos, son las efectuadas por KAYSER y MANCEAU (1906 a, 1906 b, 1908, 1909), quienes aislaron de vinos grasos bacterios que estudiaron sin

(1) LABORDE, J., *Sur les ferments des vins gras ou filants*. Extract. d. Procés. verb. d. séances de la Soc. d. Scienc. phys. et Natur. de Bordeaux, 1904.

darles nombres. Son éstos, bastoncitos, capaces de dar fermentación manítica, que morfológica y fisiológicamente pueden separarse en dos grupos. Igualmente constataron la presencia de cocos en rosarios, análogos a los dibujados por PASTEUR. Con los gérmenes aislados reprodujeron la alteración en vinos sanos, estudiando las condiciones que influyen en la misma.

Los microorganismos estudiados por KAYSER o MANCEAU deben considerarse como los típicos representantes que causan la viscosidad.

Es interesante hacer notar que las características de esos bacterios son análogas a las que causan la misma alteración en otras bebidas fermentadas, como comprobó KAYSER en la sidra (1911), y en la cerveza (1913).

Además de los bacterios mencionados, se han señalado en los mostos o vinos, la presencia de otros microorganismos capaces de provocar la viscosidad, sea por degeneración de la membrana celular en algunos casos, por productos del metabolismo en otros, etc., como por ejemplo *Dematium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Torulas*, y aún bacterios acéticos del grupo de *Bacterium rancens*.

6. El amargo

Esta es una alteración propia de los vinos tintos envejecidos en botellas, que se presenta especialmente en Francia e Italia. Se caracteriza por el sabor amargo penetrante, característico, precipitación de la materia colorante y formación de ácidos volátiles y CO_2 .

Como agente de la enfermedad describió PASTEUR bacterios en forma de bastoncitos gruesos, que se incrustan de materia colorante.

Después de PASTEUR, numerosos autores estudiaron los gérmenes presentes en los vinos amargos, pero hasta el presente puede decirse que no se ha aislado un bacterio en cultivo puro, que pueda considerarse el típico representante que cause la enfermedad, pues faltan las rigurosas pruebas científicas que así lo aseguren.

Estudiaron bacterios de los vinos amargos: PERRONCITO y MAGGIORA en 1887, quienes cultivaron un bastoncito grueso con el que habrían reproducido la alteración; ADERHOLZ en 1894, que no hizo cultivos puros; LABORDE (1898), quien encontró gérmenes con características análogas a los maníticos o torcidos; BORDAS, JOULIN y DE RACKOWSKI (1898 a, 1898 c), quienes aislaron un bastoncito móvil con el que habrían reproducido la enfermedad; WORTMANN en 1900 quien citó un *Bacillus vini* que no tuvo en cultivo puro y que lo había encontrado en vinos no amargos; y, finalmente, MAZE y PACO-

TTET (1904) quienes encontraron gérmenes análogos a los de LABORDE, evidentemente bacterios maníticos.

Uno de los autores que más se ocupó del estudio de los vinos amargos es VOISENET (1910 a 1929) quien aisló un bastoncito móvil, aerobio al que llamó *Bacillus amaracrylus*, cuya principal característica es fermentar la glicerina produciendo acroleína, que daría sabor amargo al vino. Este germen el autor lo encontró también en las aguas, y lo considera vecino al coli-bacilo y bacilos tíficos y paratíficos.

Las investigaciones de VOISENET sobre el *Bacillus amaracrylus*, no son aceptadas por la mayoría de los investigadores. LABORDE (1917 b), estudió gérmenes de las aguas capaces de dar acroleína de la glicerina, en forma exactamente igual a los estudios de VOISENET, y no obtuvo desarrollo en vinos. Como bien lo sostiene LABORDE, el *Bacillus amaracrylus* es, tal vez, una infección de los cultivos, que se aisló como el agente del amargo.

Finalmente, debe citarse a MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER quienes en 1894 encontraron en vinos suizos amargos, bacterios análogos a los dibujados por PASTEUR, con los que habrían reproducido la alteración (según KAYSER y DELAVAL, 1927), sembrando vinos sanos.

Además de los bacterios, se han señalado como causantes del amargor de los vinos, otros microorganismos, como *Botrytis cinerea*, *Penicillium glaucum* y *Raccodium cellare*.

En lo que respecta al origen del sabor amargo, no se conoce exactamente a que es debido; se sabe que es una consecuencia de la desaparición de la glicerina, que ya lo había demostrado PASTEUR; sin entrar a analizar las diversas investigaciones hechas, que por otra parte no lo demuestran en forma concluyente, parece que el amargo se debe a la polimerización, resinificación, etc., de productos aldehídicos, formados, según TRILLAT (1903-1906) y TRILLAT SANTON (1910) a partir de la aldehído etílica, y según VOISENET, a partir de la acroleína o aldehído acrílica. Esta última substancia fué encontrada también por WARCOLLIER y LE MOAL (1932) en sidras y peradas anormales.

Algunos autores atribuyeron el amargo a descomposición de substancias tánicas, opinión que no comparten MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER en base a sus observaciones.

Debe citarse finalmente, la importancia que tiene la secreción de oxidasas de amargor, por parte de los bacterios de la enfermedad, que cita MATHIEU (1928), las que DUCLAUX anteriormente había señalado.

Con toda seguridad, como bien lo sostiene PASTEUR cuando dice: «J'ai vérifié maintes fois que l'effet d'amertume était du uniquement a une action chimique», el amargo se debe muchas veces a puras reacciones químicas o física-químicas.

7. Otras alteraciones

Finalmente, debe mencionarse el *enturbiamiento* o *azul del vino champagne*, que según MAZE y PACOTTET es producido por el *Coccus anomalous* por ellos descriptos (1904-1907), pero que según MANCEAU (1907), lo originan los fermentos de la viscosidad, actuando solos o asociados con levaduras o bacterios aerobios, aislando entre estos últimos, un bastoncito, dos cocos y una sarcina.

La *fermentación butírica*, alteración completamente excepcional que puede producirse en vinos muy anormales, por verdaderos fermentos butíricos.

El *olor a rata* o «Maüsel-geschmack» de los alemanes, caracterizado por el olor a acetamida (orín de rata), que lo causa según MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, el *Bacterium mannitopoeum*, al atacar glucosa, levulosa o sacarosa, y por último:

La *alteración sulfhídrica*, caracterizada por la presencia en abundancia de SH_2 , que se origina al parecer, por influencia de la levadura sobre el azufre libre, o compuestos de azufre, debido a la secreción de reductasas (hidrogenasas).

No se conoce alteración sulfhídrica en vinos por acción de bacterios ⁽¹⁾.

II. ANTECEDENTES ARGENTINOS

La existencia de alteraciones bacterianas en los vinos argentinos, es conocida desde hace mucho tiempo, y, si bien en la actualidad, con los progresos de la técnica vinícola, este asunto ha perdido en gran parte la importancia económica y el peligro que en otras épocas tuvo,

(1) He tenido oportunidad de observar un vino con elevado contenido en SH_2 , que presentaba un olor insoportable. Se trataba de un vino de *Vitis labrusca*, de la zona vinícola de Perico del Carmen (Jujuy). La observación microscópica denotó abundante presencia de gérmenes, pero un rápido estudio de éstos, por los procedimientos que mencionaré más adelante, demostró que se trataba de gérmenes corrientes de alteraciones.

Pude identificar dos especies bacterianas: un fermento manítico y un bastoncito filiforme capaz de destruir ácidos málico, cítrico y tartárico, evidentemente una cepa del *Bacterium acidovorax* que más adelante describiré.

La producción de SH_2 en este caso no debe, por lo tanto, atribuirse a actividad bacteriana, obedeciendo tal vez su existencia, a algunas de las causas anteriormente enumeradas, por cuanto la formación de SH_2 en vinos, por reacciones químicas, no ha sido aún comprobada.

en los comienzos del presente siglo constituyó un gran problema a resolver en la enotecnia argentina.

Ya en 1903 en los informes de la Comisión Nacional encargada de investigar el estado de la industria, manifestaba P. N. ARATA, refiriéndose a las enfermedades de los vinos, que esta era la «condición de nuestros vinos de Cuyo, mal elaborados», señalando las diversas causas de deficiencia de técnica que la ocasionaban.

Puede formarse una idea aproximada de la importancia que en esa época tenían las alteraciones de los vinos, en la observación del estudio de los ingenieros agrónomos P. y J. LAVENIR (1905), sobre la composición del vino de Mendoza, en el cual, de 377 muestras analizadas, 82 presentaban caracteres de vino manítico, es decir, que el 21.75 % de los vinos investigados tenían esta alteración. A título ilustrativo transcribo un extracto de los datos analíticos de los principales vinos enfermos estudiados, de Mendoza (cuadro N° 1).

A pesar de que las enfermedades de los vinos constituyó un gran problema, no se ha efectuado en el país un estudio de carácter científico que tuviera por objeto el conocimiento de la flora bacteriana normal o anormal del mosto o del vino, y, por lo tanto, la bibliografía de este asunto es completamente nula.

PACOTTET en su libro sobre la vinificación en la provincia de Mendoza (1911) se refiere también a las alteraciones bacterianas, transcribiendo íntegro el estudio realizado en vinos europeos conjuntamente con MAZE (1904). Con respecto a los vinos sudamericanos (Argentina, Chile), manifiesta haber estudiado los microbios comparativamente con los encontrados en vinos europeos, sosteniendo no haber observado diferencias como «tampoco otras variedades de microbios», «Los más resplandidos, dice, son los microbios de la graise y de la tourne». Además, dicho autor manifiesta haber encontrado en vinos blancos de Chile y Argentina, en botellas, el *Coccus anomalus* de los vinos de champagne. Con respecto a los microbios de la manita, dice que el empleo de refrigerantes ha impedido su desarrollo.

Como veremos más adelante, si bien es cierto que en los vinos argentinos, se constata la existencia de algunas especies bacterianas idénticas a las descritas en Europa, las presentes investigaciones autorizan a afirmar la existencia de bacterios completamente diversos, que, aún pudiéndose comprender en los grupos conocidos, presentan diferencias morfológicas o fisiológicas suficientes para desvirtuar las afirmaciones de PACOTTET.

Recuerdo a propósito, que con respecto al problema de las enfermedades de los vinos, manifestaba el ingeniero agrónomo JOSE ALAZ-

CUADRO N° 1

Composición química de algunos vinos manifiestos argentinos, según P. y J. LAVERNIA

Número de muestra Año de cosecha	5 1902	38 1902	39 1902	42 1902	98 1902	102 1902	109 1902	253 1902	317 1903	324 1903	340 1902	352 1902	359 1902
Clase de uva	Malbec	Cabernet Sauvig- non	Cabernet Sauvig- non	Uvas tintas varias	Criolla carlón	Malbec	Uvas tintas varias	Uvas tintas varias	Alicante bouschet enblanco	Mezcla diversas variedad.	Uvas tintas varias	Uvas tintas varias	Criolla carlón
Densidad a 15° C.	0,9986	1,014	0,9976	0,9978	1,0062	0,9992	1,0134	1,0054	1,0080	1,0050	0,9997	0,9988	1,0010
Alcohol a 15° C. en volumen.	13,30	13	13,40	12,40	13,20	13	12,30	11,30	11,80	11,20	12,20	12,30	12,40
Extracto seco a 100° C. sin azúcares reductores	36,169	52,905	36,575	33,792	40,360	32,643	47,242	35,065	53,380	35,700	33,185	37,405	38,452
Extracto seco sin azúcares re- ductores y sin manita.	27,597	32,247	28,745	28,720	25,020	26,716	28,364	29,305	43,882	30,584	26,365	29,961	27,206
Acidez total en H ₂ SO ₄	6,272	7,985	6,664	5,513	6,358	6,236	7,257	4,020	6,232	5,0088	5,027	6,047	7,056
Acidez volátil libre en H ₂ SO ₄	2,208	3,479	2,499	2,030	2,931	3,457	3,632	2,381	2,566	2,019	2,616	2,009	2,485
Acidez fija en H ₂ SO ₄	4,064	4,506	4,165	3,483	3,427	2,779	3,625	1,639	3,666	3,069	2,411	4,038	4,571
Manita	8,572	20,658	7,830	5,072	15,340	5,927	18,678	5,760	9,498	5,116	6,820	7,444	11,246
Polarización	—0° 10'	—2° 50'	—0° 26'	—0° 19'	—2° 30'	—1° 10'	—2° 45'	—4° 31'	—0° 88'	—3° 50'	—2° 5'	—1° 00'	—0° 27'
Azúcares reductores	1,058	14,457	1,100	V	10,200	4,515	20,908	9,259	4,620	10,500	3,265	1,060	1,820
Bitartratos	1,855	1,856	1,505	2,081	1,328	2,273	1,805	2,106	—	—	1,924	1,366	1,629
Acido tartárico libre	0,056	0,750	0,165	0,238	—	0,045	0,120	0,060	—	—	0,050	0,195	0,103
Cenizas totales	3,660	4,579	4,796	4,796	4,367	3,306	5,898	5,325	5,684	4,012	4,068	5,214	4,758
H ₂ SO ₄ en K ₂ SO ₄	1,012	0,833	0,467	0,662	0,892	0,215	0,538	0,504	0,202	0,182	0,294	0,986	0,412

RAQUI⁽¹⁾, uno de los principales propulsores de la técnica vinícola en el país, «que eran necesarias investigaciones propias para opinar respecto de lo que ocurría entre nosotros».

En general se han aplicado en el país, en la lucha contra las alteraciones bacterianas, las normas técnicas de los principales países de Europa, adaptadas a nuestra modalidad vinícola, sin ocuparse de la investigación científica de los agentes que la causan, o del estudio de otros procesos bacterianos comunes en el vino, como la desintegración de la acidez, que no lo perjudican en sus caracteres orgalépticos.

Las alteraciones bacterianas de los vinos, en el país, al principio del corriente siglo, era un problema generalizado en todas las zonas vinícolas.

En las regiones de clima cálido como en las de Cuyo, las alteraciones lactomaníticas constituían uno de los mayores inconvenientes de la industria, como se observó en el estudio de los ingenieros LAVENIR, agravado por su presentación durante la fermentación alcohólica del mosto. El torcido igualmente contribuía a complicar el proceso de la obtención de vinos sanos.

Con el progreso de la técnica vinícola y la generalización de las operaciones de acidificación y refrigeración de los mostos, grandes preventivos de las alteraciones maníticas, y de la sulfitación, que además favorece la fermentación alcohólica normal, como así mismo de la pasteurización de los vinos, las alteraciones bacterianas perdieron mucha importancia en la zona de Mendoza, y en gran parte en San Juan.

Actualmente solo constituye un problema en las zonas vinícolas de enotecnia atrasada, en donde la vinificación se efectúa sin seguir a veces preceptos elementales de higiene, y sin el empleo de las maquinarias o procedimientos modernos que tienden a eliminar esos inconvenientes.

Es así como se observan frecuentemente vinos enfermos en La Rioja y Catamarca, con alteraciones lactomaníticas, especialmente favorecidas por el clima, y agravadas por el vino ligeramente abocado que se produce en la zona.

Igualmente en otras regiones vinícolas pequeñas, como Jujuy, Entre Ríos, etc., es frecuente la existencia de vinos enfermos.

En Mendoza y San Juan, pero especialmente en la primera provincia, puede considerarse un verdadero accidente la presencia de enfermedades, que está relegado, por otra parte, en la generalidad de los casos, a bodegas pequeñas, poco higiénicas.

(1) ALAZRAQUI, J., *Apuntes de Enotecnia* (publicados por el Cent. Est. Agron. Buenos Aires, 1927).

En San Juan suelen ser frecuentes aún las alteraciones lactomaníticas, favorecidas por el vino dulce que se elabora. En Mendoza este inconveniente no se presenta, dado que se producen casi totalmente vinos secos, de mayor conservación; pero con todo suelen encontrarse vinos hechos, con bastante posterioridad a su elaboración, y ya en los centros de consumo, presentando la enfermedad del torcido.

III. INVESTIGACIONES PROPIAS

De las consideraciones precedentes se deduce la importancia de carácter científico y práctico que presenta la investigación de la flora bacteriana del mosto y del vino. Es indudable que su estudio debe ser posterior al conocimiento del agente normal de la fermentación vinaria, pues es lógico que debe conocerse primero la levadura y luego la flora bacteriana normal o anormal del mosto.

Con respecto al primer punto, se han hecho ya en el país algunos estudios que no es del caso citar aquí, los que si bien no han resuelto el problema del conocimiento de nuestras especies y variedades de levaduras, dan por lo menos una orientación que permite aplicar a la práctica industrial sus resultados.

No ocurre lo mismo, como hemos visto, con respecto a la flora bacteriana del mosto; por eso he considerado útil dar a conocer los resultados, de las investigaciones efectuadas, las que lejos de pretender resolver el problema de las alteraciones bacterianas de los vinos en la República Argentina sólo constituye una contribución a su conocimiento, basadas en experiencias personales.

Durante todo el proceso de la vinificación, se encuentra el mosto en la posibilidad de contaminación bacteriana, ya sea por la flora microbiana acarreada con las uvas, por la falta de limpieza de las vasijas de fermentación o locales respectivos, por las operaciones enotécnicas correspondientes, etc.; el vino hecho presenta igualmente durante su manipuleo, numerosas ocasiones de contaminarse. Por estas causas, es difícil en presencia de un vino alterado, establecer el origen de los gérmenes que contiene, pero, con toda probabilidad, los gérmenes de las alteraciones provienen en la generalidad de los casos, del mosto original.

He utilizado en las investigaciones, vinos alterados encontrados en los centros de consumo del país, Capital Federal especialmente, y vinos alterados obtenidos directamente en las bodegas de las zonas de producción. He investigado vinos en elaboración, vinos hechos, y en algunos casos vinos de algunos años de estacionamiento; en cuanto a

los tipos, algunos tintos, otros blancos, algunos secos, otros dulces y con respecto a las zonas correspondientes a Mendoza y San Juan, La Rioja, Catamarca, Jujuy, Río Negro y Capital Federal. En síntesis, he tenido oportunidad de examinar los diversos tipos de vinos que se obtienen en el país; los resultados obtenidos tienen pues el valor que de esto puede deducirse.

Por otra parte, la circunstancia de haber constatado la existencia de las mismas especies bacterianas en zonas vinícolas geográficamente bastante separadas, autorizan a dar un valor casi general a los resultados obtenidos.

Sin embargo, creo que las observaciones efectuadas conviene ratificarlas en las zonas de elaboración, y durante los diversos períodos de la misma, para poder así aclarar las inevitables dudas restantes.

Los vinos utilizados, como he dicho, tienen origen muy diverso; algunos provienen de las grandes zonas vinícolas de Cuyo, mientras que otros son originarios de comarcas de pequeña elaboración y menos importantes como Río Negro, La Rioja y Catamarca y aún vinos elaborados en la propia Capital Federal.

Estos vinos han sido obtenidos, en algunos casos, en las propias bodegas de elaboración y existe en consecuencia mayor seguridad de que su composición química sea el fiel resultado de la alteración bacteriana presente. Otros, en cambio, han sido conseguidos cuando se encontraban ya en los centros de consumo, sea personalmente o bien de las muestras tomadas oficialmente para el control técnico. En este último caso, la confianza que puedan suministrar los datos analíticos es más limitada, dado el manipuleo a que se somete el vino antes de su expendio.

Sin embargo, de cualquier origen que sea el vino, existen ciertos datos, que, correlacionados con la presencia de gérmenes, hacen indudable la consideración de enfermedad; tal es, como caso general, la acidez volátil elevada, encontrándose el vino en condiciones de anaerobiosis que lo pone al abrigo del desarrollo de bacterias acéticas, y casos particulares, como la presencia de sustancias nuevas que no se presentan en los vinos normales, como la manita, y que no se usan para adulterar vinos, o la desaparición de algunos componentes, como el extracto que en vinos nuevos sólo ocurre en presencia de microbios que lo destruyen.

Indudablemente, lo más inobjetable sería que el investigador poseyera los vinos en alteración, cuyo inconveniente no siendo en las zonas propias de elaboración, es obvio mencionar, o bien que se guardaran muestras de los vinos alterados analizados, durante un cierto tiempo, para volverlos a analizar y constatar las alteraciones químicas ocurri-

das. Este último procedimiento, si bien factible, no está exento de algunos inconvenientes, como sería por ejemplo el caso de un vino que ya se encuentre en estado avanzado de alteración y que ofreciese un mal substrato nutritivo para el ulterior desarrollo de los gérmenes.

No ha sido, por otra parte, mi objeto, el estudio puramente químico de los vinos alterados, sino más bien su estudio bioquímico, para lo cual, una vez aislado el germen, son suficientes los datos analíticos más importantes que influyen en la calidad del vino, que sean resultado de la actividad microbiana, y que permitan asegurarse que los microorganismos aislados no constituyen gérmenes accidentales.

Por esto, considero que del conjunto de datos analíticos, es posible sacar una conclusión aunque sea aproximada del tipo de alteración presente, y luego con el germen al estado puro, reproducir las alteraciones observadas en el vino original, sea en medios nutritivos artificiales, como he procedido, o bien en vinos sanos esterilizados y conseguir así la comprobación.

Las investigaciones que he efectuado, consistieron en el estudio de la composición química de los vinos enfermos, determinando en base a los datos analíticos, los componentes desaparecidos y los nuevos productos formados, para establecer, por comparación con la composición normal del vino, el tipo de alteración.

Al mismo tiempo, efectué el aislamiento de los gérmenes presentes, directamente del vino, y, una vez obtenidos los bacterios en cultivo puro, procedí a su estudio morfológico y fisiológico. Caractericé las diversas especies y comprobé en cultivos artificiales, la fermentación de las sustancias desaparecidas en el vino y la producción de compuestos presentes en los vinos alterados, que no se encuentran en los vinos normales. Demostré en esta forma, que los gérmenes aislados constituían los verdaderos agentes de la alteración. He considerado innecesario, por esto, la reproducción artificial de la misma en vinos sanos, asunto que, por otra parte, debe ser objeto de investigación especial y que ha sido subsanado con el método de aislamiento adoptado.

IV. METODOS SEGUIDOS EN LAS INVESTIGACIONES REALIZADAS

a) METODOS UTILIZADOS EN LAS INVESTIGACIONES QUIMICAS

Las investigaciones químicas efectuadas, consistieron en los análisis de los vinos alterados, de los que se aislaron los gérmenes de las enfermedades, y las determinaciones efectuadas en el estudio fisiológico.

gico de los bacterios en cultivo puro. De estas últimas me ocuparé más adelante; trataré aquí el método seguido en el análisis de los vinos.

Se hicieron en éstos algunas de las determinaciones analíticas corrientes en el control oficial de los vinos, las que se efectuaron en la Sección Policía del Vino de la Oficina Química Nacional. Ellas fueron: densidad, alcohol, extracto, cenizas, azúcar reductor y acidez total; siguiéndose el método establecido en las normas oficiales de análisis de vinos (1).

Además efectué personalmente otras determinaciones en el Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad, que consistieron en: acidez volátil, ácido tartárico total, ácido láctico y manita.

Los métodos seguidos en estas determinaciones fueron los siguientes:

Acidez volátil.

Se determinó por el método BORGMANN:

50 c.c. de vino (0,25 c.c. vino + 25 c.c. H₂O destilada en vinos con mucha acidez volátil), se ponen en un balón efectuándose el arrastre de los ácidos volátiles con corriente de vapor de H₂O. El destilado se titula con NaOH y fenoltaleína como indicador. Para la acidez volátil total se agregan unos cristales de ácido tartárico en el mismo balón de destilación.

Manita.

Se determinó por el método SEGOU (2) operando sobre 100 c.c. de vino:

Se evaporan 100 c.c. de vino, colocados en un vaso de precipitación, hasta consistencia siruposa, en baño-maría. Se deja en un sitio fresco uno o dos días para favorecer la formación de cristales. Se extrae con alcohol de 85° saturado de manita a la temperatura de operación, filtrando el líquido y lavando varias veces el filtro y el vaso. Una vez seco el filtro, se coloca sobre el vaso original extrayéndose con 100 c.c. de alcohol de 85°. Se filtra, evitando la evaporación del alcohol, y se toma una parte proporcional del filtrado, que se evapora a baño-maría hasta consistencia siruposa, en cristizador tarado; después de 24 horas se pesa la manita cristalizada.

En vinos muy dulces, conviene hacer dos veces la extracción con alcohol saturado de manita.

Acido tartárico total.

La determinación se hizo siguiendo el método de HALENKE y MÖLINGER (3) operando sobre 100 c.c.:

Se concentra a la mitad el vino, se agregan 2 c.c. de ácido acético glacial,

(1) Norma de interpretación y clasificación de los productos regidos por las leyes de la Aduana y de Impuestos Internos. Digesto del Min. de Hac. de la Nac. Tomo II, pág. 369 y sig. 1928.

(2) J. Pharm. Chim. 1893. (5), 29-103.

(3) HALENKE y MÖSLINGER, Zeits. Analyt. Chem., 1895, t. XXXIV, p. 270.

0,5 c.c. de una solución al 20 % de acetato de K., y 15 gramos KCl. Después de agitar, se agregan 20 c.c. de alcohol de 95° y se frota las paredes del vaso; se deja cristalizar en sitio fresco y después de 24 horas se filtra por Gooch, lavando con 20 c.c. de una solución formada por 100 c.c. de agua destilada, 20 c.c. de alcohol de 95° y 15 gramos de KCl. Se coloca el filtro en el vaso original, se agrega H₂O destilada y se titula en caliente con NaOH y fenolftaleína. Acido tartárico, total por litro es igual a $0,375 \times (\text{c.c. álcali } N/4 + 0,6)$.

Acido láctico.

Como no existe en el país ningún estudio sobre la determinación del ácido láctico en nuestros vinos, y no teniendo mi propósito ensayar métodos, elegí entre los diversos procedimientos de determinar el ácido láctico en los vinos, el que consideré más adecuado.

El método más conocido es el de MOESLINGER ⁽¹⁾ basado en la extracción del lactado de bario soluble en alcohol al 85 %, que modificó BARAGIOLA ⁽²⁾.

BONIFAZI ⁽³⁾, modificó el procedimiento MOESLINGER separando acetato y lactato de bario soluble en alcohol, y a su vez MICHEL (1931). introdujo al método BONIFAZI una modificación análoga a la de BARAGIOLA con respecto al original de MOESLINGER.

He considerado conveniente proceder de acuerdo al método MOESLINGER modificado por BARAGIOLA, pero con la técnica de BONIFAZI adoptando las precauciones que se deducen de los trabajos de PARIS (1907) y de SEMICHON-FLANZY (1931) en lo que respecta al arrastre de ácido láctico, en la determinación de la acidez volátil del vino.

Procedí en la siguiente forma:

20 c.c. de vino se colocan en una cápsula de porcelana de 50-100 c.c. de capacidad, se agregan 2 c.c. de solución de BaCl₂ al 10 %, se neutraliza con agua de barita saturada en caliente, agregada gota a gota. El viraje de la materia colorante y el papel de tornasol sirve de indicador. Se concentra a baño-maría hasta unos 20 c.c., controlando la reacción neutra con HCl diluido o agua de barita. Se lleva a un frasco de vidrio de 100 c.c., de tapa esmerilada, se lava la cápsula con 3-5 c.c. de agua, frotándose las paredes con varilla de goma, llevándose el líquido al frasco haciendo un total de 25 c.c. Se agrega alcohol de 95°-96° gota a gota (se continúa lavando con

(1) MOESLINGER, W., 1901. *Ueber die Säure des Weines und den Säurerückgang*. Zeitsch. Unters. Nahr. u. Genussmitt., 4: 1120.

(2) BARAGIOLA, W. I. u. GODET Ch., 1912. *Die Wertung der Milchsäure bei der Weinbeurteilung*. Mitt. a. d. geb. d. Lebensmittel untersuchung u. hygiene, 3: 240.

— BARAGIOLA, W. I. u. SCHÜPLI, O., 1914. *Zeits. Unters. Nahr. u. Genuss*, 27: 841-83.

(3) BONIFAZI, *Annales de Chimie Analytique*, 1926, p. 193.

— BONIFAZI-FERRE, *Ann. Fals. et Fraud*, 1928, p. 83.

las primeras porciones la cápsula), agitando hasta llegar a 100 c.c. Se deja unas horas hasta un día; se filtra por papel seco y 85 c.c. del filtrado se adicionan de 15 c.c. de una solución al 10 % de Na_2SO_4 , se agita, se deja reposar 10-15 minutos y se vuelve a filtrar por papel seco, evitando en ambos casos la evaporación del alcohol. 70-80 c.c. del filtrado se evaporan a sequedad al baño-maria, en cápsula de cuarzo (o platino). Se incinera a la llama hasta cenizas blancas (agregando unas gotas de agua destilada).

Se titula alcalinidad de las cenizas en la cápsula fría, con exceso de HCl $\text{N}/10$ (10-20 c.c.) y fenoltaleína, llevando al baño-maria hasta cerca de temperatura de ebullición y titulando el exceso de ácido en caliente con NaOH $\text{N}/10$ hasta comienzo de coloración rosada.

Se obtiene así el dato correspondiente al ácido láctico + ácidos volátiles. Estos se determinan aparte en la forma que sigue: 50 c.c. de vino se colocan en un balón de 250-500 c.c. sobre tela de amianto, se destila con corriente de vapor de H_2O manteniendo el volumen constante y recogiendo 200 c.c. en una media hora. En vinos muy acéticos se usan 25 c.c. + 25 c.c. de agua.

Conocida la acidez volátil se efectúa la corrección al dato de la alcalinidad de las cenizas.

b) METODOS UTILIZADOS EN LAS INVESTIGACIONES BACTERIOLOGICAS

1. El aislamiento y cultivo de los bacterios de los vinos

Uno de los puntos de más importancia en el estudio de los gérmenes que causan alteraciones en los vinos, es la seguridad que debe tenerse de que los microbios aislados sean los verdaderos agentes de las mismas.

El procedimiento más seguro, es la reproducción artificial de la alteración, mediante la infección de vinos sanos con cultivos puros del bacterio aislado. Pero a veces es difícil conseguirlo y aún imposible, por desconocerse las reales condiciones biológicas del medio en el momento de producirse la proliferación del germen y comienzo de la alteración. Circunstancias especiales de riqueza en sustancias nitrogenadas, en azúcar, poco grado alcohólico, reacción del medio, o tal vez de interrelaciones entre todos los factores que favorecen la actividad bacteriana, pueden obrar para dar oportunidad a la infección. Con toda probabilidad, dado que los gérmenes deben estar constantemente en todo el manejo del vino en contacto con éste, su desarrollo es la consecuencia de adaptaciones progresivas a las diversas condiciones antisépticas que se crean, como por ejemplo el grado alcohólico en los vinos todavía no hechos, y en determinado momento se desarrollan activamente favorecidos por desequilibrios físicos o químicos que puedan producirse, o biológicos como por ejemplo: en los mostos, aprovechando una inactividad pasajera de la levadura.

Por otra parte, un vino sano es antiséptico por definición, por lo tanto, solo alterando su normal equilibrio se puede a veces conseguir la reproducción de una alteración. Es así que se recurre en ciertos casos, a la dilución, para disminuir el grado alcohólico, al agregado de substancias nitrogenadas o de azúcar, para dar alimento al germen, etc.

He salvado el inconveniente de la reproducción artificial de la alteración, con el aislamiento directo de los gérmenes del vino alterado, procedimiento que permite tener la certeza de su acción, que es corroborada luego con su comportamiento fisiológico en medios nutritivos artificiales.

Como medio de cultivo y aislamiento de los gérmenes de las alteraciones de los vinos, han sido utilizados por los diversos investigadores los más variados y todos han efectuado previamente al aislamiento, cultivos de enriquecimiento.

Para citar los principales mencionaré a LABORDE que utilizo jugo de uva a veces diluido con agua de levadura, aislando sobre placas; a MAZE y PACOTTET que usaron cultivos previos de enriquecimiento en anaerobiosis, en caldo de porotos con 3 % de sacarosa, neutro o débilmente ácido, aislando sobre placas de gelatina del mismo medio; a KAYSER y MANCEAU que usaron jugo de uva desacidificado, caldo de porotos, agua de levadura, agua de «touraillons», en anaerobiosis; a FORTI que usó caldo al 2,5 % de extracto Liebig glucosado y acidificado, aislando sobre gelatina; a MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER que usaron como medio de cultivo, jugo de peras poco ácidas o de uva desacidificado y también agua de levadura con 2-3 % de azúcar y 1 % de ácido málico o tartárico, aislando en placas a la gelatina o agar.

He utilizado en las investigaciones, como *medio de aislamiento y de cultivo*, el mosto de malta y el de cereales respectivamente, utilizados para otros microbios de fermentaciones en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad. Estos medios han sido adaptados del Instituto Bacteriológico de la Institución Prusiana de Ensayos e Investigaciones de Lechería de Kiel (Alemania), siendo la primera vez que se usan para bacterios de los vinos.

La preparación se efectuó en la siguiente forma:

Mosto de Malta. Fórmula de Henneberg.

Se emplean 250 gramos de harina de malta para 1 litro de agua. Se calienta el agua a 50°, se agrega la malta y se mantiene en baño-maria 1/2 hora a 45° C., con el objeto de poner las diastasas en libertad, que pasan al líquido. Luego se sube la temperatura a 60-62° C. empleando para ello 1/2 hora y se mantiene una hora agitando a ratos. Se prueba por la reacción del iodo si

todo el almidón ha sido transformando, en cuyo caso no debe dar coloración, o por lo menos color azul poco intenso (granos de almidón difíciles de atacar). Si hay color azul intenso se sigue calentando a 60-62° hasta no dar reacción del iodo.

La menor temperatura al comienzo de la operación, tiene por objeto permitir la acumulación de dextrina, pues la amilasa tiene un óptimo a 57° C. mientras que la transformación de dextrina en maltosa es favorecida por una temperatura más elevada (62°).

Efectuada la sacarificación, se separan las partes sólidas por un lienzo (granos gruesos de almidón, glumelas, etc.), y se procede a la clarificación del líquido. Esto se puede hacer hirviendo y filtrando por papel; pero por sucesivos calentamientos vuelve a precipitar, por lo que conviene, para abreviar las operaciones, enfriar a 50° C., agregar clara de huevo y llevar 20'-30' a autoclave a 100° C. Una vez límpido, se reparte en tubos y se tindaliza 3-4 días a 100°, 1/2 hora por vez.

Para solidificar este medio he utilizado agar al 2 % previo arreglo de la reacción a pH 6, dado que el mosto es siempre lo bastante ácido como para dificultar una buena solidificación.

El agar de mosto de malta se prepara por la técnica corriente.

Mosto de cereales. Fórmula de Henneberg.

Se emplean 250 gramos de harina de cereales (compuesta por dos partes de malta y una de centeno) en un litro de agua. La preparación se hace como para el mosto de malta, hasta la sacarificación inclusive, pero en vez de filtrar, se deja en reposo un rato en probetas, y luego se decanta dejando sólo el precipitado más grueso. El líquido decantado con el precipitado más fino se reparte. Se puede preparar con CaCO_3 o sin él. En el primer caso, se agrega 3-4 % de CaCO_3 previamente esterilizado (1 hora a 160° C., calor seco) y se reparte agitando para homogeneizar la mezcla.

Cultivo de los bacterios de los vinos.

El cultivo se hizo en anaerobiosis. El dispositivo adoptado para ello, fué el del tapón de vaselina-parafina, que consiste en agregar a cada tubo, en el momento de distribuir el mosto de cereales, una mezcla de partes iguales de parafina y vaselina previamente licuada. Una vez retirados los tubos esterilizados, del autoclave y enfriados en posición vertical, queda formado un tapón impermeable al aire y cuyo espesor conviene que no sea menor de 0,5 cm. ni mayor de 1 cm. para que no sea dificultada la siembra.

En el momento de efectuar ésta, se calienta exteriormente el tubo a la altura del tapón, se inclina rápidamente y se deja enfriar, con lo que toma forma de pico de flauta quedando así, espacio suficiente para hacer la siembra. Efectuada ésta, se vuelve a calentar exteriormente el tapón con cuidado, y una vez licuada la mezcla, se deja enfriar

verticalmente para restablecer las condiciones de anaerobiosis. Si los medios de cultivo son viejos conviene hervir unos 15', dejar enfriar y entonces hacer la siembra.

Los bacterios de los vinos se cultivan muy bien en estas condiciones, incubando a 28-30°.

Se siembra con unas gotas del depósito separado por centrifugación, puesto que la sedimentación es un método muy largo para obtenerlo, o bien directamente con unos 2-3 c.c. del vino.

A los dos o tres días (a veces más) hay desarrollo, que se manifiesta casi siempre por enturbiamiento fuerte del medio, y por el levantamiento del tapón de vaselina-parafina, debido a la formación de gas.

El mosto de cereales en anaerobiosis y con CaCO_3 (igualmente desarrollan sin éste), constituye un excelente medio de enriquecimiento y conservación de los bacterios de los vinos. La anaerobiosis tiene la gran ventaja de poder eliminar microbios aerobios siempre presentes en los vinos alterados, como los bacterios acéticos, muchas de cuyas especies desarrollan bien en tubos abiertos de mosto de cereales.

El aislamiento por el método directo.

He efectuado los aislamientos en cajas de Petri, sobre agar de mosto de malta (1), sembrando con material proveniente directamente del vino.

Este aislamiento directo de los bacterios, sin previo cultivo de enriquecimiento, que por primera vez se cita en la bacteriología de los vinos, tiene la gran ventaja de hacer casi innecesaria la reproducción artificial de las alteraciones, que, como antes dije, presenta a veces muchas dificultades. Además es el único procedimiento que permite conocer de inmediato la flora bacteriana del vino.

En los estudios hechos hasta el presente por otros investigadores, se han efectuado antes del aislamiento, cultivos de enriquecimiento. Este procedimiento no es objetable, si luego se efectúa la infección artificial de vinos sanos, para reproducir las alteraciones; en caso contrario queda siempre la duda de si el germen aislado es el verdadero agente que la causa, o un microbio accidental que se encontraba en el vino.

He aislado de un vino enfermo, por cultivo previo de enriqueci-

(1) El agar de mosto de cereales dá iguales resultados que el de mosto de malta, pero como queda muy turbio es preferible el último.

miento, un germen que si bien tiene muchas características comunes con los verdaderos causantes de las alteraciones, como más adelante veremos, presenta, en cambio, otras, que lo destacan como tal. Es evidentemente un microbio accidental que se encontraba en el vino, y que halló condiciones favorables para su desarrollo en el mosto de cereales.

Este ejemplo pone bien en evidencia la indiscutible ventaja del método de aislamiento directo que aquí se propone. Muchas de las polémicas que se han efectuado con respecto a los agentes de las alteraciones, probablemente obedecen a razones de esta índole.

La marcha del aislamiento en el método directo es la siguiente:

Se siembra, estriando en superficie de agar de mosto de malta, el depósito obtenido por centrifugación del vino enfermo, y en los muy alterados directamente del vino, empleando el método de la espátula corta (BEIJERINCK). Simultáneamente y en la misma caja, se estra un cultivo de enriquecimiento del mismo vino obtenido con anterioridad.

Una vez desarrolladas las colonias se comparan bajo el microscopio los diferentes tipos, de ambos orígenes. Se pican las diversas colonias llevando a mosto de cereales en anaerobiosis; en presencia de colonias iguales se toman las que provienen directamente del vino.

Para picar las colonias he utilizado con mucha eficacia, el dispositivo micromanipulador ideado por el ingeniero S. SORIANO (1934), que permite aislar bajo el microscopio, colonias pequeñísimas, lo que sería imposible de efectuar a simple vista.

Obtenido el desarrollo, se procede a una segunda siembra en superficie de agar de mosto de malta, haciendo un nuevo aislamiento que tiene por objeto la purificación del cultivo inicial.

Conseguido el nuevo desarrollo se hace una tercera siembra en superficie para controlar la pureza. Se llega así a obtener un cultivo puro.

Técnica del aislamiento.

En presencia de un vino alterado, lo primero que se efectúa es una observación microscópica, para tener una idea aproximada de su flora microbiana.

Se anota si hay bastoncitos o cocos, o bien ambos; en los primeros se observan las probables diferencias de forma. Pueden existir bastoncitos cortos o largos, gruesos o finos, etc.; lo mismo en cuanto al diámetro relativo y forma de los cocos.

Se hace enseguida una siembra del depósito centrifugado o bien del mismo vino, si está lo suficientemente velado como para revelar un completo desarrollo bacteriano, llevando a un tubo con mosto de cereales en anaerobiosis. Se incuba a 28-30° C.

Si en el vino había bacterios acéticos, como generalmente ocurre en los vinos alterados, las condiciones de anaerobiosis impiden su desarrollo, dado que esos gérmenes son estrictamente aerobios, desarrollándose activamente los microbios anaerobios, como son los causantes de las enfermedades de los vinos.

Una vez desarrollados los gérmenes, lo que se reconoce fácilmente por el levantamiento del tapón de parafina (si el mosto de cereales tenía Ca, porque algunos no forman gases), se hace una observación microscópica directa y se tiene así una idea aproximada de los microbios presentes. Estos son generalmente inmóviles, pero no es raro que en los cultivos de enriquecimiento, aparezcan gérmenes dotados de activos movimientos; puede constatar, a veces, enérgicos bacterios butíricos cuya presencia atribuyo a los esporos que puede contener el vino, puesto que las siembras se hicieron asepticamente.

Cuando ya se obtuvo el desarrollo se está en condiciones de proceder al:

Primer aislamiento.

Para ésto se estría con la espátula, sobre la placa de agar de mosto de malta, que se aprovecha para dos aislamientos: en una mitad, el cultivo de enriquecimiento y en la otra el vino directamente o centrifugado.

La operación debe hacerse lo más rápidamente posible a fin de evitar las infecciones, que casi siempre ocurre con los microbios del aire, esporos de hongos, etc., si bien son tan escasas que con toda facilidad se distinguen en la siembra efectuada. Por otra parte, con una espátula o bisturí estéril es siempre fácil eliminarlas cuando son pocas.

El aislamiento simultáneo del cultivo previo de enriquecimiento y del vino tiene la gran ventaja de permitir el conocimiento directo de la flora microbiana del vino, y de dar una idea aproximada de la proporción en que los diferentes gérmenes se encuentran presentes. Además, puede ocurrir que un determinado bacterio no forme colonias por el estriado directo del vino, o bien que forme muy pocas. En este caso, la observación de las colonias del otro cultivo nos permitirá aclarar las posibles dudas y hacer a veces aislamientos dobles, para mayor seguridad.

Si el estriado ha sido bien efectuado se tienen en la última estría colonias bien separadas, como puede observarse en las fotografías que se acompañan. Se incuba a estufa 28-30° C.

Picado de las colonias.

Una vez desarrolladas las colonias, lo que ocurre a los dos o tres días (a veces a los 4-5), se procede al aislamiento bajo el microscopio, utilizando el micromanipulador mencionado. Para ello se examinan con el microscopio, las diversas colonias formadas en las dos partes de la caja, que casi siempre son las mismas.

La observación microscópica del germen, mediante un rápido preparado, ayuda a veces a reunir o diferenciar tipos análogos.

A veces, sin embargo, en el estriado directo del vino, aparecen colonias diferentes, constituidas por microbios acéticos que en el cultivo de enriquecimiento no han desarrollado por la anaerobiosis; es fácil, sin embargo, eliminarlas, porque picándolas y haciendo el cultivo en anaerobiosis no hay desarrollo.

Las colonias picadas se hacen desarrollar en mosto de cereales con calcio, en anaerobiosis, incubándose en estufa a 28-30°.

Aislamiento de purificación.

Cuando ya se obtuvo el desarrollo de los gérmenes aislados, (2-4 días) se efectúan observaciones microscópicas de cada uno para conocer las diversas formas; se tendrá así una idea aproximada de la pureza de cada cultivo. Además, como se pican dos o tres colonias de un mismo tipo se elige el cultivo que parece más puro. Se hace entonces un segundo aislamiento que tiene por objeto la purificación del mismo.

Se procede en forma análoga al primer aislamiento, aprovechando una misma caja para cultivos que se sospeche sean de los mismos gérmenes.

Una vez desarrolladas las colonias, se examinan nuevamente bajo el microscopio, se pican algunas colonias iguales a las del primer aislamiento, y se llevan nuevamente a mosto de cereales con Ca, incubándose.

A veces hay colonias diferentes que pueden provenir, o bien de infecciones accidentales del cultivo o de la caja, con microbios banales, o bien a falta de pureza del cultivo.

En el primer caso se constata si realmente es una infección, lo que se reconoce fácilmente con un poco de práctica y que corrobora un preparado microscópico de una colonia picada con cuidado. En tal caso no se efectúa su aislamiento.

Si hay falta de pureza, se comprueba si el tipo de colonia y de germen (observación microscópica) responde a algunos de los otros tipos aislados, en este caso se elimina, para evitar una repetición innecesaria que alarga el aislamiento.

Si fuera algo nuevo, lo que puede ocurrir por imperfección del primer aislamiento, por formación de colonias superpuestas, etc., se procede como si fuera un nuevo aislamiento siguiendo después como en los otros casos.

Los cocos forman colonias muy pequeñas que demoran uno o dos días más en aparecer que algunos bastoncitos, como el *Bacterium acidovorax* (véase más adelante) o algunos maníticos, las que a veces pueden pasar desapercibidas, por su forma igual a otras de tipo más grande, pero que recién se están formando; por estas causas los cocos suelen aparecer como impurezas en los aislamientos de purificación.

Esta clase de aislamiento se debe repetir cuántas veces sea necesario, para obtener el cultivo al estado de pureza. En la generalidad de los casos basta uno o dos a lo sumo.

Control de pureza.

Desarrollados los gérmenes del segundo aislamiento, debe hacerse el control antes de considerarlo cultivo puro. Para ello se hace una observación microscópica y un nuevo estriado en agar de malta en superficie en cajas (una puede utilizarse hasta para cuatro gérmenes, haciendo la espátula corta). Debe constatar la uniformidad de las colonias, la ausencia absoluta de impurezas o infecciones, y la uniformidad en el preparado microscópico, preferible en este caso coloreado.

Otros métodos de aislamiento usados.

Además del agar de mosto de malta en superficie, en cajas de Pe-

tri, he ensayado otros medios nutritivos y otros procedimientos que también dieron buenos resultados.

Entre los medios de cultivo, probé con éxito el agar de caldo de porotos, utilizado por MAZE y PACOTTET, y el agua de levadura levulosada.

Como método de aislamiento diferente, usé el de LIBORIUS-VEILLON citado por HALL para aislamiento de anaerobios, procediendo en la siguiente forma:

Se siembra en tubos de agar de mosto de malta, de caldo de porotos, o de agua de levadura levulosada, directamente en la masa del agar mantenido a 42°-45° C. Se agita, se efectúan diluciones, empleando tres tubos en total, y se incuba a 28°-30° C.

Se obtienen así, en el tercer tubo, colonias perfectamente aisladas, si la siembra no ha sido muy densa. Resulta entonces muy fácil aislar las colonias bajo el microscopio, cortando el agar en rodajas, por medio del micromanipulador mencionado anteriormente.

Los aislamientos de purificación, se pueden hacer en la misma forma, o con el corriente método de las cajas, en superficie.

El procedimiento de los tubos, es conveniente, cuando no se puede hacer en superficie, como puede ocurrir en gérmenes acostumbrados a la anaerobiosis, y que en otras condiciones son poco activos.

Los gérmenes que he estudiado, fueron aislados todos en superficie de agar de mosto de malta.

2. *El estudio en cultivo puro de los bacterios aislados.*

Para el estudio en cultivo puro de los gérmenes estudiados, he seguido en sus lineamientos generales el método de la planilla bacteriológica preparada por el Comité de Bacteriólogos Norteamericanos, introduciendo en ella las modificaciones necesarias para el estudio del tipo de gérmenes en investigación.

A continuación detallo las diversas investigaciones efectuadas y los procedimientos seguidos en el estudio de la morfología, de las características del cultivo y de la fisiología.

Método de estudio de la morfología

Forma.

Se observaron los diversos cultivos hechos en medios sólidos o líquidos que se incubaron en todos los casos a 28°-30° C.

La observación en medios sólidos se efectuó haciendo preparados de

un cultivo en agar de mosto de malta en superficie, utilizándose el mismo para tomar las fotografías que se acompañan. Los preparados se hicieron una vez obtenido completo desarrollo (2-3 días), suspendiendo el material en una gota de una solución de rojo congo sobre el porta-objeto, haciendo luego un frotis.

Como medios líquidos utilicé mosto de cereales, caldo de carne ácido o alcalino y con azúcares o sin ellos, y agua de levadura con o sin hidratos de carbono. Las observaciones se hicieron una vez obtenido completo desarrollo haciendo preparados directos sin colorear.

El agua de levadura fué preparada por el método de BEIJERINCK usado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad, adaptado del Laboratorio de Microbiología de la Escuela Superior Técnica de Delft (Holanda).

Agua de levadura. Fórmula de Beijerinck.

Se emplean 200 gramos de levadura prensada por litro de agua.

Se deslie bien la levadura, previamente desmenuzada, en un mortero, empleando al principio poca agua. Luego se pasa a un Erlenmeyer de mucha capacidad completando el volumen. Se agrega clara de huevo, y se lleva a autoclave para coagular (15' a 20' a 115°-120° C. son suficientes); se filtra por papel y se completa el litro.

He comprobado que conviene dejar reposar dos o tres días antes de filtrar, a fin de favorecer la precipitación y obtención de un líquido claro.

Una vez repartido se esteriliza a 115° C. una media hora.

Como en la filtración siempre pasan sustancias en suspensión, esterilizan-do a alta temperatura hay nuevas precipitaciones, por lo que considero conveniente tindalizar a fin de aminorar el inconveniente; 3 días a 100°, 1/2 hora por vez basta.

El caldo se preparó por la fórmula «standard» (Com. Bact. Tech.).

Extracto de carne	3 gr.
Peptona	5 »
H ₂ O	1.000 cc.

Movilidad.

Se observaron todos los cultivos de medios líquidos, y como ningún germen presentara más movilidad que la correspondiente al movimiento browniano, se consideró innecesario hacer coloración de cilias. Se hicieron las observaciones en los cultivos jóvenes (24-48 horas), de mosto de cereales, agua de levadura con hidratos de carbono o ácidos, etc.

Esporulación.

Además de la observación microscópica negativa, en todos los cul-

tivos viejos, se constató la falta de esporos en la siguiente forma: de un cultivo viejo (15 días) en superficie de agar de mosto de malta, se sembró en mosto de cereales en anaerobiosis. Se mantuvieron los tubos sembrados en agua a 85° C., durante 10 minutos; luego se incubaron a 28-30° C. dos semanas. La falta de desarrollo hizo innecesaria la coloración de esporos.

Coloración de Gram.

Se hizo por el método de KOPELOFF (1) usando material de agar de mosto de malta en superficie, de 48 horas de incubación a 28-30° C.

El método de KOPELOFF se efectúa como sigue:

Solución A

Violeta de genciana o cristal violeta	1 gr.
Agua destilada	100 cc.

Solución B

Bicarbonato de sodio	1 gr.
Agua destilada	20 cc.

En el momento de usarse se mezclan 30 gotas de la solución A con 8 gotas de la B.

Después de fijar el material, se colorea con violeta de genciana alcalinizado, durante cinco minutos o más, se lava con solución de iodo, se vuelca y se agrega más solución de iodo, dejándola actuar dos minutos. Se vuelca y se seca con papel de filtro (sin lavar). Se decolora con acetona pura, agregándola gota a gota al porta-objeto inclinado (no se debe tardar más de 10 segundos).

KOPELOFF y COHEN aconsejan también una mezcla de acetona y alcohol ético al 50 %. BURKE (2) también recomendó 50 % de acetona en éter.

Se deja secar al aire y se colorea durante 10 a 30 segundos con el colorante de contraste; se seca y se examina a inmersión.

La solución de iodo se prepara así:

Iodo	2 gr.
NaOH.N/1	10 cc.
Agua	hasta 100 cc.

Método de estudio de las características de cultivo

Colonias.

Se estudiaron las colonias formadas sobre agar de agua de levadura

(1) KOPELOFF, N. and BEERMAN, P., 1922. *Modified Gram Stains*. J. Inf. Dis. 31:480-82.

— KOPELOFF, N. and COHEN, P., 1928. *Further studies on a modification of the Gram Stain*. Stain Tech. 3:64-69.

(2) BURKE, VICTOR, 1921. *The Gram stain in the diagnosis of chronic gonorrhea*. J. Amer. Med. Assoc., 77:1020.

con uno por ciento de levulosa (2 % de agar), en cajas de Petri, estriando en superficie. Se incubó 28-30° C. Después de tres días se fotografiaron.

Desarrollo en estria.

Se hizo su estudio haciendo desarrollar sobre agar de mosto de malta (2 % de agar) sembrando de un cultivo fresco de mosto de cereales, e incubando a 28-30° C.

Licuación de gelatina.

Se usó como medio agua de levadura con 0,5 % de levulosa y 15 % de gelatina. No se agregó más azúcar a fin de evitar un comienzo de licuación por la acidez que se produce a expensas del mismo, debido al desarrollo del germen.

Se incubó a 28-30° y después de varios días (4-5) y una vez desarrollado activamente el germen, se constató si había licuación, enfriando el medio con hielo.

Desarrollo en diversos medios nutritivos.

Se utilizó además del mosto de cereales, agua de levadura con o sin azúcares u otras sustancias hidrocarbonadas, y caldo ácido o alcalino y con agregado de azúcar o sin él. Como en los otros casos se incubó a 28-30°, observándose el desarrollo durante varios días.

Método de estudio de la fisiología

Relaciones de temperatura.

Se efectuó su investigación haciendo desarrollar el germen en agar de mosto de malta en superficie, en tubos, sembrando de un cultivo joven de mosto de cereales. La incubación se hizo a temperatura ambiente (15-20°) a 25°, a 30°, 37° y 42° C.

Se observó la temperatura a la cual apareció primeramente el desarrollo y la evolución del mismo en los diversos tubos después de unos días, comparándose finalmente el desarrollo máximo alcanzado en los diversos tubos.

Relación con el oxígeno.

El ensayo se hizo en tubos de agar de mosto de malta (2 % de agar) en punción. La siembra se efectuó incorporando al medio manteni-

dó a 42-45° C. una gota de cultivo fresco de mosto de cereales, agitando para repartir en toda la masa y enfriando con agua corriente. Se incubó a 28-30° C. y se observó el desarrollo de las colonias cuando aparecieron. De la distribución y cantidad de las mismas en profundidad se dedujo la relación con el oxígeno.

Formación de gases.

Se constató en el anterior ensayo; los gérmenes que formaron gases rompieron el agar, algunos energicamente. Además, se ensayó en mosto de cereales sin calcio en anaerobiosis; los productores de agar, una vez desarrollados levantaron el tapón de parafina mientras que los otros desarrollaron bien en las condiciones anaerobias sin levantarlo.

Se observó concordancia de resultados con los dos métodos, en todos los casos.

Prueba de la catalasa.

El ensayo se hizo sobre el cultivo en superficie de agar de mosto de malta, a los tres días y cuando el desarrollo era activo.

La prueba se efectuó tocando el medio con la extremidad del ansa sumergida en agua oxigenada, considerándose negativa sino había desprendimiento de burbujas.

Cultivo en leche.

Se efectuó en leche descremada tornasolada, haciéndose durante un mes las observaciones de acidificación, reducción del indicador, coagulación y redisolución de coágulo.

Hidrólisis del almidón.

Se usó el método ECKFORD (1): Se agrega 0,2 % de almidón soluble al caldo (usé agua de levadura) y se incubó 7 a 10 días. Se examina al segundo, cuarto, séptimo y décimo días, para ver hidrólisis de almidón, reducción de la solución de Fehling y producción de ácidos, haciendo toques sea con solución de iodo, de licor de Fehling, o de indicador de pH adecuado.

Para el iodo, coloración azul indica hidrólisis negativa, coloración parcial hidrólisis con producción de eritrodextrina y coloración clara, hidrólisis completa con producción de dextrina y tal vez de glucosa.

(1) ECKFORD, MARTHA, O., 1927. *Thermophilic bacteria in milk*. Amer. J. of Hyg., 7: 201-221 (ver pág. 208).

En caso de completa reducción debe dosarse el azúcar con licor de Fehling.

Influencia de la reacción del medio.

Se utilizó agua de levadura con 1 % de levulosa de pH 5,8 que se repartió en tubos de ensayo (7 c.c. por c/u.) esterilizándose a 115° C. durante 1/2 hora.

Se hizo entonces una serie de tubos de pH más ácido o más alcalino, agregándose ácido o álcali estéril.

Para el primer caso se usó una solución diluída de HCl previamente esterilizado por tindalización (3 días 1/2 hora por vez a 100° C.), que se agregó asépticamente. Se adicionó por tubo 0,2 c.c., 0,5 c.c. y 1 c.c. obteniéndose, respectivamente, pH 5, 4,3 y 3,5.

Para la serie alcalina se utilizó NaOH n/10 también previamente esterilizada por tindalización, que se agregó asépticamente, en cantidades de 0,4 y 0,6 c.c. por tubo obteniéndose pH 6,7 y 7,6, respectivamente.

Se obtuvo en esta forma la siguiente serie total de valores pH: 3,5; 4,3; 5; 5,8; 6,7 y 7,6.

Para la constatación del pH se siguió el procedimiento colorimétrico con los indicadores de CLARK y LUBS (bromotimol azul, bromocresol púrpura, metil rojo y clorofenol azul). El valor pH más ácido es aproximado.

Se procedió entonces a sembrar cada tubo con un ansa de un cultivo joven de mosto de cereales, y se incubó a 28-30° durante 10 días. Se observó el desarrollo durante este tiempo y al final del mismo se dosó la acidez total en cada tubo, calculándola sobre un mismo volumen, para obtener datos comparables.

Influencia del alcohol.

Se usó agua de levadura con 1 % de levulosa que se repartió en tubos con 7 c.c. c/u., esterilizando a 115° durante 1/2 hora. Luego se agregó a cada tubo asépticamente alcohol de 95°. Se obtuvo así una serie con 6,33, 8,53 y 11,85 % de alcohol en volumen.

Se sembró cada tubo con un ansa de un cultivo joven de mosto de cereales y se incubó a 28-30° durante 10 días. Se observó el desarrollo en ese tiempo y luego se dosó la acidez total, calculándose sobre un mismo volumen por tubo, para obtener datos comparables.

Influencia del SO₂.

Se usó H₂O de levadura con 1 % de glucosa que se esterilizó a

115° C. durante 1/2 hora repartiéndose en tubos, 8 c.c. en cada uno.

Se agregó entonces a cada tubo asépticamente el SO₂, obteniéndose una serie gradual.

El SO₂ se adicionó en forma de sal de K. Se hizo una solución al 5 %, más o menos, de metabisulfito de K, que se esterilizó por tindalización (3 días a 100°, 1/2 hora por vez); se dosó entonces el SO₂ que contenía, y luego se agregó a los tubos en las cantidades deseadas, asépticamente.

Se sembró con un ansa de un cultivo joven de mosto de cereales y se incubó a 28-30°. Después de una semana o más (según el caso), de desarrollo, se dosó la acidez total calculándose con el mismo contenido de líquido por tubo para obtener datos comparables.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias.

Para los ensayos de fermentación he utilizado dos procedimientos:

1) El aconsejado por el Comité de Bacteriólogos Norteamericanos o sea la fermentación en medio sólido y constatación de la misma, por la variación del pH, usando indicadores adecuados. 2) La fermentación en medio líquido, comprobándose la misma por el dosaje de la acidez producida.

Con algunos gérmenes (bacterios maníficos) usé sólo este último procedimiento, dado que en el medio básico empleado para la fermentación no se desarrollaban bien, y no investigué otro que fuera conveniente (1).

Fermentación en medio sólido.

He usado como medio básico para el estudio de la fermentación por este procedimiento, la digestión de caseína. Este medio se preparó por la fórmula usada en nuestro Laboratorio que es una modificación introducida por el ingeniero S. SORIANO al método de KULP y RETTGER (2) de fermentación de hidratos de carbono, para lactobacilos.

La fórmula adoptada ha sido la siguiente:

H ₂ O destilada	900 cc.
Digestión de caseína	100 cc.
Extracto de carne	3 gr.
Peptona	10 »
Bromo cresol púrpura	0.02 gr.
Agar	5 gr.

(1) En la digestión caseína ensayada hubo desarrollo y fermentación neta con levulosa en todos los casos, solo a veces con otros azúcares.

(2) KULP y RETTGER, *Journ. of Bact.* 9: 357-94, 1924.

Véase también HUNT y RETTGER, *Journ. of Bact.*, 20: 61-83, 1930; y la modificación a la fórmula de KULP y RETTGER, usada por WEAVER, *Journ. of Infect. Diseases*, 51: 273-79, 1932.

Se prepara primeramente de digestión la caseína usando la siguiente fórmula:

Caseína en polvo	10 gr.
Carbonato de Na. al 1 %	100 cc.
Tripsina fresca (o pancreatina)	0,15 gr.

Se calienta la solución de carbonato de sodio hasta ebullición, se agrega poco a poco la caseína, hirviendo siempre y agitando, hasta que esté disuelta. Se enfría a 40°, se agrega la tripsina disuelta previamente en un poco de agua, luego 1 c.c., aproximadamente, de cloroformo; se agita bien, se tapa con un tapón de goma o corcho con un dispositivo de tubo de goma con lengüeta que sirva de válvula de seguridad para los gases, y se hace digerir a 37° durante 48 horas.

Se prepara entonces el caldo disolviendo el extracto y la peptona en 900 c.c. de agua, en caliente. Se agrega la digestión de caseína, se agita, se enfría a 50°, más o menos, se agrega clara de huevo y se lleva a autoclave 1/2 hora a 115° para coagular.

Se filtra por algodón, se arregla la reacción a pH 6,6 con ácido clorhídrico diluido, se incorpora el indicador y el agar, y se lleva a autoclave para disolver (10-15 minutos a 110° bastan).

El indicador puede agregarse cómodamente de la solución alcohólica usada corrientemente en la determinación colorimétrica del pH. La evaporación del alcohol al llevar a autoclave, evita la dilución.

Se filtra por algodón, se reparte en tubos (7 a 8 c.c. más o menos) y se esteriliza a 120°, 20 minutos.

Los azúcares u otras sustancias se esterilizaron por tindalización, tres días a 100° 1/2 hora por vez y se agregaron asépticamente. Para esto se calentaron los tubos al baño-maría, y una vez licuado el agar, se enfrió a 42-45° (para evitar desdoblamiento de azúcares, etc.), se incorporó la sustancia, agitando para homogeneizar, y se enfrió en la corriente de agua.

Las sustancias se adicionaron al 1 %, preparándose soluciones acuosas concentradas (10 %). Practicamente, para los tubos de 7-8 c.c. se agrega un c.c. de la solución concentrada.

La siembra se hizo en punción, con un ansa de cultivo fresco de mosto de cereales, incubándose a 28-30° durante 1 o 2 semanas. La constatación de la fermentación se tuvo en la acidez producida que hizo virar el indicador.

Como medidas de seguridad se tuvo la precaución de incubar los tubos antes de la siembra para eliminar los que pudieran estar infectados. Se pusieron en todos los casos testigos estériles y testigos del medio sin azúcar, pero sembrado.

En todos los ensayos que resultaron negativos se combinó la prueba con un germen que diera positivo a fin de asegurarse la posibilidad de fermentación en ese medio.

Además de la digestión de caseína he ensayado otros medios, pero ofrecieron dificultades para comprobar la fermentación. Esto ocurrió, por ejemplo, con el agua de levadura y el agua de levadura autolizada, que en los tubos sembrados sin agregado de azúcares u otras sustancias fermentativas, después de la incubación presentaron viraje del indicador. Ello se debía, sin duda, a las pequeñas cantidades de sustancias hidrocarbonadas que tenía el medio. Aún haciéndolo fermentar previamente con colibacilo o levadura, se presentó este inconveniente.

Fermentación en medio líquido.

He seguido en estos ensayos, aproximadamente, el que utilizaron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER en sus investigaciones.,

Como medio básico usé agua de levadura. Aquellos autores también usaron este medio que prepararon en la siguiente forma: Un kilo de levadura prensada se deslíe y se calienta en 10 l. de agua corriente, agregándose 10 gramos de ácido málico. Este tiene por objeto asegurar la esterilización que se efectúa a 100° C. Después de más de dos semanas se filtra y se reparte. La fermentación la efectuaron en frascos de 100-400 c.c. de capacidad usando cierres de fermentación.

En mis ensayos usé agua de levadura preparada según la fórmula de BEIJERINCK, que ya mencioné, y además agua de levadura autolizada preparada según la misma fórmula haciendo la autólisis por el método empleado en el Laboratorio que es el siguiente (1):

200 gramos de levadura prensada se desmenuzan con las manos. Se coloca en un Erlenmeyer grande, se rocía con poco cloroformo y se agita durante un buen rato hasta que se haga dificultoso por los grandes grumos que se forman. Se tapa entonces dejando una válvula de seguridad, como en la digestión de caseína, y se deja en estufa a 37-40° durante 24 horas.

Se agrega agua hasta 1 litro, agitando para hacer una pasta homogénea y se elimina en lo posible el cloroformo al baño-maría, o con refrigerante para recuperarlo. Se entibia a 50° más o menos, se agrega clara de huevo y se lleva a autoclave para coagular a 120° durante 15 minutos.

Se filtra por papel, se reparte y se esteriliza a 120° durante 20 minutos.

Por los dos métodos de preparar el H₂O de levadura se tiene un líquido con pH más o menos 6, que es el más conveniente para los gérmenes que he estudiado. Tanto con el agua de levadura autolizada,

(1) Las diversas elaboraciones de ambas formas de preparar el agua de levadura, que he utilizado, se distinguen por un número entre paréntesis. Cuando no se menciona que agua de levadura se utilizó, se entiende que corresponde la corriente, sin autólisis.

como con el agua de levadura corriente, he hecho los ensayos de fermentaciones en tubos comunes con 7 u 8 c.c. de líquido. Las sustancias se agregaron como en el medio sólido, asépticamente, de soluciones concentradas previamente esterilizadas por tindalización. Se adoptaron las mismas precauciones que con el otro procedimiento.

La siembra se efectuó también de un cultivo fresco de mosto de cereales agregando dos o tres gotas pequeñas. Después de incubar a 28-30°, durante cierto número de días, se dosó la acidez total con NaOH $n/10$ y fenoltaleína y se dedujo la fermentación de la diferencia de acidez entre el medio con la sustancia fermentativa; sembrado; y el medio sembrado, pero sin agregado de sustancia.

Fermentación de ácidos.

Este estudio debió hacerse forzosamente en medio líquido. He probado hacer el ensayo en medio sólido, con las sales de los ácidos, constatando la fermentación por el viraje de los indicadores hacia el rango alcalino en caso positivo, debido a la fermentación del grupo orgánico del ácido, pero he tropezado con muchos inconvenientes en todos los casos, aún cuando usara sales neutras. Por este motivo decidí ensayar la fermentación en medio líquido, lo que permitió, además, comprobar la producción de ácidos volátiles y ácido láctico, de tanta importancia en los bacterios de los vinos.

Se empleó levadura preparada por los métodos mencionados, que se repartió en tubos de ensayos grandes, en cantidad de 50 c.c. y a veces en Erlenmeyers de 200-250 c.c. de capacidad, en cantidad de 100-150 c.c.

Después de la esterilización, se agregaron asépticamente los ácidos o sales estudiados, de soluciones concentradas, esterilizadas previamente por tindalización (3 días $1/2$ hora por vez a 100°). A los tubos testigos se agregó agua destilada estéril, a fin de compensar diluciones.

Se sembró con 4-5 gotas de un cultivo fresco de mosto de cereales y se incubó a 28-30°, durante un tiempo variable.

Se colocaron en todos los casos testigos estériles del medio sin sustancia agregada y con ella, y testigos sembrados del medio sin adición de sustancia.

Se dosó al final de la fermentación la acidez total, la acidez volátil, acidez fija, y el ácido láctico en cada tubo, y por comparación con los correspondientes testigos se tuvo el índice de la fermentación.

Los detalles de la interpretación de la misma los daré en cada caso, lo mismo que las modificaciones que a veces introduje a este proce-

dimiento. Los métodos usados en estas determinaciones químicas fueron:

Acidez total. Sobre 5 o 10 c.c. con NaOH N/10 y fenolftaleína.

Acidez volátil. Sobre 10 c.c. por arrastre con corriente de vapor en el volatímetro CAZENAVE, dosando la acidez sobre los 100 c.c. de destilado, con NaOH N/10 y fenolftaleína. El agua de levadura es un líquido muy denso y forma mucha espuma; por esto la destilación fué a veces dificultosa, siendo necesario en ciertos casos hacerla en balones grandes como en la acidez volátil de los vinos.

Acidez fija. Por diferencia.

Acido láctico. Se determinó por un procedimiento análogo al usado en los vinos. 20 c.c. del agua de levadura cuidadosamente decantada a fin de evitar arrastre de la masa bacteriana, se adicionan de 2 c.c. de BaCl_2 al 10 % y se neutraliza gota a gota con agua de barita saturada en caliente, agregando unas gotas de fenolftaleína. Se sigue el método como en los vinos, con la diferencia que se lleva a una probeta de 50 c.c., para lo cual la concentración al baño-maria se hace hasta 10.12 c.c.; 40 c.c. del filtrado alcohólico se adicionan de 5 c.c. de la solución de Na_2SO_4 , siguiéndose luego en la misma forma que para los vinos.

El método utilizado es análogo al que usaron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER en sus ensayos, quienes emplearon el procedimiento original de MOESLINGER.

Los mismos métodos químicos usados para la fermentación de ácidos, fueron empleados para el estudio de los productos de la fermentación de glucosa, levulosa, glicerina y manita que también se hicieron en tubos de ensayos con 50 c.c. de medio fermentativo.

V. RESULTADOS OBTENIDOS

a) LOS VINOS ESTUDIADOS. SU COMPOSICION QUIMICA Y ALTERACION

Si bien he tenido oportunidad de hacer observaciones en numerosos vinos, solamente de once de ellos estudié los gérmenes aislados. Por eso incluyo únicamente los datos de origen y composición de los últimos.

Pude constatar dos tipos de alteraciones en los vinos estudiados: las fermentaciones lactomaníticas y el torcido; agrupo, en consecuencia, de acuerdo a esto, los vinos cuyo origen, características organolépticas y composición química describo a continuación. Las cifras del análisis, correspondiente a los vinos en que el mismo se efectuó, se encuentra en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2

Composición química de algunos de los vinos estudiados

Número de orden del vino	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Densidad	1,039	1,006	0,9935	1,0085	0,996	0,997	0,994	0,993	0,995
Alcohol por ciento en volumen	14	12,20	14,15	13,90	14,10	11,90	11,80	12,60	9,70
Extracto seco libre de azúcar, a 100° C.	54,25	42,67	28,65	36,05	32,40	21,12	17,50	18,40	14,80
Cenizas ‰	2,40	3,92	5,30	4,60	2,40	3,40	1,30	2,64	—
Azúcar reductor en glucosa ‰	91,15	10,25	—	26,95	—	—	—	—	—
Acidez total en H_2SO_4 ‰	5,90	7,27	2,42	5,30	7,06	5,05	7,37	6,32	—
Acidez volátil total en ácido acético ‰	3,41	3,43	1,32	3,64	2,73	3,11	3,60	3,18	2,88
Acidez volátil libre en ácido acético ‰	—	—	1,03	—	—	—	3,43	—	—
Acido tartárico total ‰	1,05	—	1,40	0,84	1,30	0,32	0,96	0,46	—
Acido láctico total ‰	5,10	5,02	2,51	1,80	3,48	2,05	2,69	3,79	4,06
Manita ‰	—	7,85	?	?	5,95	0	0	0	0
Observación polarimétrica	-7°46	-1°14	-0°46	-3°47	-0°	-0°	-0°	-0°	-0°

1. *Vinos con fermentación lactomanítica*

Vino N° 1

Origen. Provincia de Catamarca, Dto. Pomán. Tomado directamente del envase original en la bodega.

Caracteres organolépticos. Vino blanco de olor fuertemente acético, gusto agridulce y de aspecto turbio.

Observación microscópica. Presentaba tres formas bacterianas fácilmente diferenciables: un bastoncito fino aislado o unido de a dos, un bastoncito grueso en cadenitas sinuosas, y un coco en forma de diplococo o cadenitas cortas.

Como sólo se disponía de unos centímetros cúbicos no pudo efectuarse el *análisis químico*, siendo únicamente posible la caracterización de manita por evaporación, presentándose abundantísimos cristales. Se trataba, evidentemente, de un vino blanco común de la zona, con fermentación manítica.

Vino N° 2

Origen. Provincia de Catamarca, Dto. Pomán. Tomado directamente del envase original en la bodega.

Caracteres organolépticos. Vino blanco, de olor penetrante, de sabor desagradable, agridulce y aspecto turbio que se manifiesta intensamente al agitarlo.

Observación microscópica. Como en el caso anterior se podían diferenciar tres formas bacterianas: los bastoncitos finos unidos de a dos, los bastoncitos gruesos en cadenitas, y los cocos de a dos.

Tampoco se pudo analizar este vino, constatándose solamente la abundante presencia de manita.

Constituía este un caso completamente análogo al anterior: un vino blanco con fermentación manítica. Como podrá verse más adelante, presentaban exactamente los mismos gérmenes, dos de ellos: el coco y el bastoncito fino, sólo encontrado en esos vinos.

Vino N° 3

Origen. Encontrado en el comercio, personalmente, y proveniente de San Juan. El envase en que fué hallado estaba completamente lleno, no había por lo tanto condiciones de aerobiosis que favorecieran la acetificación.

Caracteres organolépticos. Vino blanco de uva moscatel de olor

acético y el natural del vino moscato, gusto muy dulce y agridulce, aspecto turbio; al agitarlo se mueven en su interior ondas pesadas y se desprenden burbujas. Dejándolo reposar, después de mucho tiempo se forma un abundante depósito, en el fondo, quedando el líquido completamente límpido.

Observación microscópica. Se pudo advertir la presencia de bastoncitos gruesos, cortos y largos unidos en cadenitas.

Composición química. Es difícil juzgar en presencia de los datos analíticos de un vino encontrado en el comercio, cuales son las transformaciones que ha sufrido en su composición natural, por la acción bacteriana, como ocurre en el presente caso, dado la alcoholización a que se somete este tipo de vino al salir de bodega y el agregado de azúcar. Pero, la presencia de manita en abundancia, la acidez volátil elevada y la cantidad de ácido láctico (5,1 o/oo) muy superior a lo que parece ser lo normal en nuestros vinos, que, según veremos más adelante, oscila alrededor de 1,5 o/oo (vinos tintos de Mendoza), y, además, el extracto elevado, muy por encima de lo normal de este tipo de vino en esa zona, indican que presentaba una alteración lactomanítica muy pronunciada.

Vino No 4

Origen. Encontrado personalmente en el comercio de la Capital Federal, pero siendo un vino proveniente de San Juan.

Caracteres organolépticos. Vino criollo, de olor netamente acético y pronunciado, sabor acético agridulce muy pronunciado, aspecto turbio, presentando al agitarlo especies de nubes pesadas formadas por el levantamiento del depósito bacteriano y desprendimiento de burbujas; puesto en reposo se aclara depositando en el fondo el precipitado.

Observación microscópica. Presencia abundante, sin centrifugar el vino, de bastoncitos gruesos cortos y largos, a veces unidos en cadenitas.

Composición química. Por las mismas consideraciones que en el caso anterior (vino No 3), el presente vino debe considerarse presentando fermentación lactomanítica, como se comprueba por su acidez total y volátil muy elevadas, su alto contenido en ácido láctico y por la presencia de manita.

Vino No 5

Origen. Encontrado en la bodega que lo elaboraba en la Capital Federal, al final de la fermentación. Vinificación en condiciones

completamente deficientes en cuanto a técnica e higiene; materia prima (uva criolla y blanca de Cuyo), poco seleccionada, y de cosecha anormal en época y rendimiento.

Caracteres organolépticos. Vino blanco de olor acético y de aceitunas frescas, característico, sabor amargo metálico, repugnante que dejaba larga sensación en el paladar, aspecto completamente turbio, difícil de clarificar; sin embargo, después de un largo tiempo de reposo quedó perfectamente límpido, probablemente por inactividad del microbio, al concluirse las materias fermentescibles.

Observación microscópica. Corroboró la anterior observación por la existencia de gérmenes en cantidad no muy elevada, lo que era indicio de que la alteración había sido encontrada en sus comienzos. Los microbios presentes eran bastoncitos cortos y gruesos, de a dos, tres o cuatro y escasas cadenas, y además cocos aislados o de a dos.

Composición química. Como puede verse por los datos de la acidez total y ácido tartárico, se trataba de un vino que seguramente no había sufrido ninguna corrección de su acidez, pero conservando tal vez inatacado su ácido tartárico.

La acidez volátil muy elevada, tratándose de un vino recién elaborado, y el extracto alto, considerando que era vino blanco.

Resulta algo difícil con estos datos establecer el tipo de alteración presente; máxime si se tiene en cuenta que no se pudo caracterizar netamente la manita, sino apenas unos cristales aciculares, poco diferenciables. Llama también la atención el contenido elevado de cenizas (¿vino adulterado?).

Pero, dado que el ácido tartárico parecía que no había sido atacado y por sus caracteres organolépticos y regular contenido en ácido láctico, puede suponerse que presentaba una fermentación láctica.

Efectivamente, una muestra del mismo vino dejada embotellada en condiciones anaerobias, presentaba después de 10 meses una acidez volátil total de 2,41 o/oo en ácido acético y su contenido en ácido láctico había subido a 5,26 o/oo de 2,51 c/oo que se dosó al aislar los gérmenes.

Vino N° 6

Origen. Encontrado en el comercio de la Capital Federal, proveniente de la provincia de San Juan.

Caracteres organolépticos. Vino criollo acaramelado, olor acético, gusto ácido pronunciado, aspecto turbio. Dejado en reposo se clarifica formando un depósito en el fondo del recipiente que con la agitación se eleva.

Observación microscópica. Se reconocieron bastoncitos gruesos en cadenitas, o bien unidos de a dos o tres y además un coco a veces en diplococo.

Composición química. La interpretación de los datos analíticos de este vino ofrece mayores dificultades que el anterior, pues, salvo la acidez volátil elevada, los demás datos no ayudan mayormente. Además, no se pudo caracterizar la manita en forma indudable y su contenido en ácido láctico no es muy elevado. Pero, probablemente se trata de un vino originariamente pobre en ácido láctico, que sufrió fermentación láctica.

Vino N° 7

Origen. Encontrado personalmente en el comercio, en la Capital Federal, ignorándose su procedencia exacta, si bien parecía originario de San Juan o Mendoza.

Caracteres organolépticos. Vino tinto, único vino tinto manítico que he encontrado; olor acético pronunciado, sabor agrídulce. Aspecto turbio y deposición análoga a los otros vinos maníticos.

Observación microscópica. Bastoncitos pequeños de a dos.

Composición química. Los datos analíticos que permiten hacer un juicio rápido de la alteración son: el extracto muy elevado en relación a lo normal en los vinos tintos de Cuyo, lo que se explica por la manita presente, la acidez volátil elevada, y el contenido en ácido láctico relativamente grande.

Se trata de un vino con fermentación lactomanítica.

2. Vinos torcidos

Vino N° 8

Origen. Encontrado en el comercio, en la Capital Federal, siendo originario de Mendoza.

Caracteres organolépticos. Vino tinto, de olor acético y penetrante, característico, sabor acre-insípido, desagradable. Aspecto turbio y decolorado, con la materia colorante parcialmente precipitada y oxidada, formándose con el reposo un depósito en el fondo del recipiente, fácilmente disgregable por agitación y que se eleva en el líquido.

Observación microscópica. - Presentaba bastoncitos finos y largos, unidos en cadenas cortas, y en algunos casos de a dos y de a cuatro.

Composición química. Observando los datos del análisis, llama la

atención la desaparición del ácido tartárico y la disminución del extracto. Estos datos unidos a la acidez volátil elevada, al buen contenido en ácido láctico y a la ausencia de manita, indican un caso evidente de fermentación tartárica, que se corrobora con los caracteres organolépticos del vino.

Vino No 9

Origen. Encontrado personalmente en el local elaborado en la Capital Federal. Hecho con uvas tintas, de variedades francesas de Cuyo.

Caracteres organolépticos. Vino tinto, de olor acético y penetrante, característico, sabor acético-amargo-acre desagradable. El aspecto es bastante velado, con la materia colorante en estado anormal, presentándose como decolorado. Con el reposo se forma un depósito incoherente en el fondo del recipiente, que con la agitación se eleva en la masa, como en los vinos maníticos.

Observación microscópica. Presentaba bastoncitos finos y largos unidos en cadenitas, y cocos de a dos.

Composición química. Como puede verse, este vino presenta elevada acidez volátil y buen contenido de ácido láctico; además, como en el vino anterior, su extracto estaba completamente disminuído en relación a lo normal en estos tipos de vino. Si bien el ácido tartárico no desapareció completamente, se presume que tiene que haber sido mucho menor que su contenido original, aunque no lo he podido comprobar, dada la precipitación y oxidación parcial de la materia colorante que se observó. Se trata también de un caso de fermentación tartárica.

Vino No 10

Origen. Encontrado personalmente en el local elaborado, en la Capital Federal.

Caracteres organolépticos. Vino tinto de olor penetrante, acético, gusto amargo-acre-desagradable. Aspecto velado y decolorado, con algo de depósito y precipitación de la materia colorante.

Observación microscópica. Abundancia de bastoncitos finos y largos unidos de a dos o tres o en cadenitas enmarañadas, y además cocos de a dos.

Composición química. La conclusión que se saca de los datos analíticos de este vino son análogas a los dos anteriores: extracto sensiblemente disminuído, ácido tartárico desaparecido, gran conte-

nido en ácido láctico y ácidos volátiles; por consiguiente, de acuerdo a sus caracteres organolépticos, puede considerarse con fermentación tartárica.

Vino N° 11

Origen. Encontrado en el comercio en la Capital, siendo proveniente de Río Negro.

Caracteres organolépticos. Vino blanco, tipo semillón, de olor acético pronunciado, y sabor acre-ácido, desagradable. Aspecto turbio, pero con el reposo se aclara depositándose abundantemente una masa fácilmente disgregable, que se eleva en nubes al agitar.

Observación microscópica. Abundante presencia de bastoncitos finos.

Composición química. Las determinaciones que faltan en el análisis no se pudieron efectuar por no existir material, dado que era una muestra muy reducida.

De los datos que existen no se puede formar un juicio completo de la alteración, pero, considerando que el extracto es muy bajo, con todo que se trata de un vino blanco, y que su acidez volátil y ácido láctico son elevados, y que hay ausencia de manita, puede deducirse de acuerdo a los caracteres organolépticos, que se trata de un vino con fermentación tartárica.

b) LOS BACTERIOS AISLADOS, SUS CARACTERISTICAS Y AGRUPACION

De los once vinos estudiados, he aislado, por los procedimientos que mencioné, 22 cepas bacterianas.

Estos gérmenes tienen un conjunto de características semejantes: son anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles, no licuantes de gelatina, Gram positivos, no segregan catalasa, no hidrolizan el almidón, desarrollan escasamente en leche y en medios nutritivos sin alimentos hidrocarbonados, son activos fermentadores de azúcares y otras sustancias ternarias.

Por sus caracteres morfológicos y fisiológicos, los gérmenes estudiados pueden agruparse en ocho especies.

Como las características de cinco de las ocho especies difieren fundamentalmente de las descriptas hasta la fecha, he resuelto considerarlas como nuevas dándoles nombres, hasta tanto no se haga un estudio comparativo con todas las cepas de bacterios de los vinos que se conocen. La clasificación de las cepas estudiadas fué hecha siguiendo

do el criterio MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, que son los autores que más se ocuparon del estudio de los bacterios de los vinos, quienes atribuyeron mucho valor a la fermentación de sustancias para separar las diversas especies.

Sin dejar de considerar la importancia que tienen los modernos conocimientos sobre los bacterios de las fermentaciones, y los estudios sobre clasificación de fermentos lácticos (como son los de los vinos) de ORLA-JENSEN (1919), he seguido aquel criterio por no disponer de todas las cepas de los bacterios de las enfermedades de los vinos, para estudiarlas comparativamente y establecer su posición taxonómica actual.

Es necesario hacer resaltar el valor que tendría una revisión general de las especies conocidas, pues muchos gérmenes, como los bacterios maníticos por una parte y los micrococos malolácticos por otra, y tal vez los bacterios del torcido, presentan tantas semejanzas en la fermentación de sustancias, que quizás no sea más conveniente considerar a cada grupo constituyendo una especie, quedando entonces las actuales especies como variedades, siendo que la morfología en la mayor parte de los casos es análoga.

Las diversas especies estudiadas, que describo en detalle en el capítulo siguiente, pueden reunirse en cuatro grupos, de acuerdo a sus características y acción sobre los constituyentes del mosto o del vino.

Un grupo está constituido por los bacterios maníticos de los que aislé nueve cepas, agrupadas en cuatro especies; ellas son:

Cepa 5. *Bacterium Gayoni* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Cepas 22, 29, 30, 1, 3a, 3b. *Bacterium intermedium* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Cepa 31. *Bacterium cocciforme* (n. spec.).

Cepa 21. *Bacterium Müller-Thurgau* (n. spec.).

Bacterium cocciforme, se designó así por la forma de sus elementos que son bastoncitos cortos de forma ovoide, pareciéndose a cocos, y a veces confundibles con éstos.

Bacterium Müller-Thurgau, se denominó en esta forma como homenaje al profesor doctor MÜLLER-THURGAU por sus importantes estudios sobre bacteriología de los vinos, realizados en colaboración con OSTERWALDER.

Con estas dos especies nuevas, se eleva a cinco el número de bacterios maníticos conocidos. Como todos los bacterios maníticos, los gérmenes estudiados son bastoncitos gruesos que tienen como característica principal, la de producir fermentación láctica de la glucosa, con formación de ácido láctico, acético, CO₂, etc., y fermentación lactománica de la levulosa. Además, algunas especies fermentan ácidos, co-

mo *Bacterium intermedium* y *Bacterium Müller-Thurgau* que fermentan ácido málico y *Bacterium cocciforme* que además de este ácido es capaz de fermentar el ácido cítrico. Ninguna especie de bacterio manítico fermenta el ácido tartárico. Estos gérmenes son los causantes de las alteraciones lactomaníticas.

Otro grupo está representado por los bacterios capaces de destruir el ácido tartárico y sus sales, formando ácidos volátiles, y de atacar la glicerina, originando el torcido. Estudié cuatro cepas, que se reúnen en una sola especie, muy vecina al *Bacterium tartarophthorum* de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Cepas 12, 15₁, 34e, 21a. *Bacterium acidovorax* (n. spec.); así denominada por su propiedad de atacar, además del tartárico, ácidos málico y cítrico. Es un bastoncito filiforme, como todos los del torcido, que pertenece al grupo típico de bacterios de vinos destructores de ácidos.

Otro de los grupos estudiados es el de los micrococos malolácticos. La característica principal de estos gérmenes es la de producir fermentación láctica del ácido málico, sin originar ácidos volátiles, siendo los bacterios más activos en el proceso de desintegración de la acidez del mosto.

Estudié 7 cepas que forman dos especies:

Cepas 15₂, 21₃, 22₃, 3z, 34r. *Micrococcus variococcus* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Cepas 30₃, 297. *Micrococcus multivorax* (n. spec.). así llamada por su propiedad de fermentar mayor número de sustancias, azúcares especialmente, en relación a los otros micrococos malolácticos conocidos.

Con esta especie se eleva a cuatro el número de micrococos malolácticos estudiados en vinos.

Y por último, el otro grupo de microbios aislados está constituido por bacterios capaces de producir la fermentación láctica del ácido málico, análogamente a los micrococos, es decir, serían un tipo análogo al *Bacterium gracile* MÜLLER-THURGAU, pero que no poseen como éste la propiedad de fermentar la levulosa dando manita, siendo capaces, en cambio, de destruirla. Carecen, además, como el *Bacterium gracile*, de la propiedad de fermentar el ácido tartárico.

Estudié dos cepas que reuní en una especie:

Cepas 30₃, 29₃. *Bacterium rectiforme* (n. spec.) así designada por las características morfológicas de sus elementos. Son bastoncitos finos, muy alargados, unidos de a tres o cuatro en forma recta.

Constituye este un grupo de gérmenes que pueden coadyuvar en la

destrucción de ácidos del mosto, y que, además, son capaces de influir en las alteraciones, por sus propiedades de fermentar la glicerina, por ejemplo, o de producir a veces ácidos volátiles en la destrucción del ácido málico.

c) LOS BACTERIOS AISLADOS EN RELACION AL TIPO DE ALTERACION
DE LOS VINOS ESTUDIADOS

Considerados en relación a los vinos de los cuales fueron aislados, los bacterios estudiados, por sus propiedades fisiológicas, responden ampliamente del tipo de alteración encontrada.

Los bacterios maníticos fueron todos aislados de vinos presentando la enfermedad de la manita, o bien picadura láctica, y ninguno fué encontrado en vinos cuyo ácido tartárico había desaparecido. Algunos de los bacterios maníticos, como *Bacterium Müller-Thurgau* y *Bacterium cocciforme*, se aislaron de un mismo vino.

El *Bacterium acidovorax*, fué encontrado en vinos cuyo ácido tartárico había desaparecido totalmente, o por lo menos en gran parte, vinos que no presentaban manita, y cuyos caracteres organolépticos, correspondían exactamente a esa enfermedad.

En ningún caso se encontró un germen que fuera aislado de un vino que presentara caracteres de alteración, contrarios a los que por sus propiedades fisiológicas, pudiera dar origen el microbio. Los bacterios maníticos fueron, pues, aislados de vinos con picadura láctica, y los bacterios fermentadores de ácido tartárico, de vinos torcidos.

Por lo que respecta a los micrococos malolácticos, fueron encontrados en casi todos los vinos, siendo raro aquellos que no los presentaran. Otros vinos investigados, de los que hice aislamientos, no estudiando, sin embargo, los gérmenes en cultivo puro, me permitieron constatar la presencia casi general de esos micrococos en los diversos vinos.

Es sabido que la fermentación maloláctica es un proceso normal en la vinificación, por lo tanto, la presencia de los micrococos en los vinos estudiados, puede ser debida a esta actividad. Pero, como esos vinos eran en su totalidad enfermos, habría que hacer investigaciones en vinos sanos, para tener la seguridad de que su presencia es debida a la fermentación maloláctica que hubieran ocasionado, o bien que por su acción han preparado el medio para el ulterior desarrollo de los microbios de las enfermedades, o aún que coadyuven la acción de estos.

Como anteriormente lo he mencionado, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER pudieron comprobar la intervención activa que corres-

ponde a veces a los micrococos malolácticos, o gérmenes parecidos, en los procesos de alteración de los vinos, y hasta pudieron en algunos casos reproducir esas alteraciones artificialmente.

En cuanto al *Bacterium rectiforme*, su aislamiento se hizo de dos vinos maníticos de la Provincia de Catamarca, que presentaban el mismo microbio manítico y el mismo micrococo maloláctico.

El *Bacterium rectiforme*, repito, es, probablemente, un germen intermediario entre los productores de enfermedades, especialmente del torcido, por su propiedad de atacar la glicerina, y los microbios malolácticos, por su actividad sobre el ácido málico.

Considerando en particular cada uno de los vinos estudiados analizo a continuación los gérmenes en ellos encontrados.

Vino N° 1

Se aisló un bacterio manítico (cepa 29₀ = *Bacterium intermedium* b), un coco (cepa 29₇ = *Micrococcus multivorax* b) y un bastoncito maloláctico (cepa 29₉ = *Bacterium rectiforme* b).

Coincidiendo con la observación del extracto, que presentaba manita, se encontró el germen correspondiente. Los otros dos bacterios probablemente hayan intervenido en forma accesoria en la alteración, por su propiedad de fermentar el ácido málico, o tal vez no hayan participado en la misma.

Debo advertir, sin embargo, que después de algunos meses no observé formación de cristales de manita al evaporar una parte del vino guardado, lo que podría atribuirse a una acción posterior del *Bacterium rectiforme* presente, capaz de destruir la manita.

Vino N° 2

Se aisló un bacterio manítico (cepa 30₁ = *Bacterium intermedium* c), un coco (cepa 30₅ = *Micrococcus multivorax* a) y un bastoncito maloláctico (cepa 30₃ = *Bacterium rectiforme* a). Caben exactamente las mismas consideraciones que en el caso anterior, incluso la destrucción de la manita que el vino presentaba en sus comienzos.

En los vinos 1 y 2 se encontraron los mismos gérmenes, lo que se explica fácilmente considerando que son vinos de una misma zona. Esta misma consideración puede hacerse con respecto a *Bacterium rectiforme* y *Micrococcus multivorax*, observados sólo en esos dos vinos.

Vino N° 3

Se aisló de este vino un solo germen (cepa 1 = *Bacterium inter-*

medium d) perteneciente al grupo de los bacterios maníticos, en concordancia, por lo tanto, con los datos del análisis químico.

Vino No 4

Como en el caso anterior sólo se aisló un bastoncito (cepa 5 = *Bacterium Gayoni*), del grupo manítico, en armonía con el tipo de alteración que presentaba.

Vino No 5

Se aislaron dos bacterios maníticos (cepa 22₁ = *Bacterium Müller-Thurgaui*, y cepa 22₂ = *Bacterium intermedium* a), y, además, un micrococo maloláctico (cepa 22₃ = *Micrococcus variococcus* c).

La existencia de los dos primeros puede correlacionarse con la alteración del vino. En cuanto al coco ha de haber intervenido en el proceso de fermentación de ácidos, que parece ser normal en los vinos; en casi todos los estudiados, encontré este tipo de bacterio.

Vino No 6

Se aislaron dos bacterios maníticos (cepa 3a = *Bacterium intermedium* c, y cepa 3b = *Bacterium intermedium* f) y un micrococo (cepa 3z = *Micrococcus variococcus* d). Los dos primeros responden de la alteración constatada y en cuanto al coco, caben las mismas consideraciones que en el caso anterior.

Vino No 7

Un solo germen se aisló de este vino (cepa 31 = *Bacterium cocciforme*) perteneciente al grupo manítico, concordante con el tipo de alteración observada.

Vino No 8

Se aisló un bacterio destructor de ácido tartárico y otros ácidos, (cepa 15₁ = *Bacterium acidovorax* b), y un coco (cepa 15₂ = *Micrococcus variococcus* a). El primero responde de la alteración observada: fermentación tartárica; y en cuanto al segundo, su presencia en vinos torcidos además de poder explicarse por su rol en la fermentación maloláctica de ácidos, podría suponerse, de acuerdo a las observaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, que más adelante analizaré, que haya contribuido, además, al desarrollo de la alteración.

Vino N° 9

Se aislaron un bacterio destructor de ácidos del mismo grupo del anterior (cepa 34e = *Bacterium acidovorax* c) y un coco (cepa 34r = *Micrococcus variococcus* e). Con las mismas consideraciones que en el caso anterior, hay concordancia entre el tipo de germen encontrado y la alteración observada.

Vino N° 10

También de este vino torcido se aisló un bacterio destructor de ácidos (cepa 21a = *Bacterium acidovorax* d), y un coco (cepa 3z = *Micrococcus variococcus* d).

Vino N° 11

Solamente se aisló de este vino un bacterio del tipo acidovorax (cepa 12 = *Bacterium acidovorax* a), lo que permite afirmar que la alteración presentada, era, como se suponía, una fermentación tipo tartárica.

VI. ESTUDIO EN PARTICULAR DE LOS BACTERIOS AISLADOS

a) **Bacterium Gayoni** MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER
(FERMENTO MANÍTICO DE GAYON y DUBOURG)

Cepas estudiadas. Una: N° 1.

1. *Morfología*

Forma. — Bastoncitos cortos de 0,8-0,9 μ de ancho por 1-1,4 μ de largo; aislados o agrupados de a dos o tres, de bordes y extremos rectos.

En mosto de cereales en anaerobiosis se presenta igualmente como bastoncitos cortos, unidos de a dos o tres, excepcionalmente algunos más alargados; no se observan cadenitas. En agua de levadura azucarada o no, forma bastoncitos cortos que se unen, pero en mayor número de artículos, constituyendo cadenitas cortas de seis a ocho segmentos aproximadamente.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram Positivo.

2. Características de cultivo

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosada forma abundantes colonias a los dos días; son de color blanquecino-amarillento que se vuelve amarillo neto al envejecer; especialmente en la parte central; forma irregular, groseramente poligonal; superficie completamente rugosa y estriada presentando un aspecto granuloso; algo elevadas en el centro; bordes lobulados-dentados, estructura interna completamente granulosa.

Desarrollo en estria. — Sobre agar de mosto de malta desarrolla intensamente a las 48 horas en forma difusa, elevada (desarrollo esparcido), con lustre brillante, aspecto húmedo, consistencia mantecosa. La estria es opalescente con superficie rugosa; color inalterado y sin olor.

Licueción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en distintos medios nutritivos. — En mosto de cereales en anaerobiosis desarrolla activamente a las 24-48 horas, en ausencia de carbonato de calcio forma gases. Desarrollan igualmente en aerobiosis. A medida que progresa el desarrollo se depositan los gérmenes, quedando el líquido completamente claro. Después de 11 meses de mantenimiento en este medio son capaces de desarrollarse.

En agua de levadura con o sin agregado de glucosa o levulosa, desarrolla activamente a las 24-48 horas. Con levulosa el desarrollo es más activo formándose un enturbiamiento amarillento; con glucosa el enturbiamiento es menor y más blanquecino. Después del desarrollo depositan formando una masa floculosa disgregable. Forma cadenitas cortas.

En caldo ácido o alcalino sin azúcares no desarrolla. En caldo ácido levulosado desarrolla activamente; en 9 días con 1 % de levulosa la acidez producida fué:

Testigo estéril	0,49 o/oo en H ₂ SO ₄
Con <i>Bacterium Gayoni</i>	2,25 » » »

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — En agar de mosto de malta en superficie desarrolla a temperatura ambiente (15-20° C) y en estufa a 25°, 30° y 37°; no desarrolla a 42° en diez días. A temperatura ambiente y a 25° hay buen desarrollo a los tres días en el primer caso y a las 24 horas a 25°. El desarrollo es muy bueno a 30° empezando a las 24 horas. Escaso desarrollo a 37° en tres días. *Temperatura óptima aproximada:* 30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Positiva. En agar de mosto de malta en anaerobiosis en tubos, desarrolla a las 24-48 horas, rompiendo enérgicamente el agar con los gases formados

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — A la semana de la siembra, incubando a 30°, acidifica el medio en forma progresiva hasta las tres semanas, en que se observa una intensa acidificación. Después de un mes de desarrollo no hubo coagulación. No reduce el tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°, dió los siguientes resultados ⁽¹⁾:

pH	Acidez producida en H_2SO_4 ‰
3,5	1,34
4,3	1,34
5	1,35
5,8	1,35
6,7	1,47
7,6	1,47

El desarrollo comenzó a las 24 horas en todos los valores pH, excepto en 3,5 y 7,6 que fué a las 48 horas; el valor pH óptimo aproximado fué igual a 5. Como puede verse en las cifras, la acidez producida no varía sensiblemente en los diversos valores pH estudiados.

Influencia del alcohol. — La acidez producida en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30° fué la siguiente:

Alcohol ‰	Acidez producida en H_2SO_4 ‰
0	1,35
6,33	1,35
8,53	1,65
11,85	1,47

Como puede verse, la resistencia al alcohol es muy elevada. El desarrollo comenzó a las 24 horas con 6,33 % de alcohol, con 8,53 % a las 48 horas y con 11,85 % a los 3 días.

(1) La acidez producida a que se refiere el cuadro, o los análogos, más adelante consignados, es la originada por la fermentación de la substancia agregada al medio, habiéndose descontado, por consiguiente, la acidez que se forma a expensas del medio básico.

Influencia del SO₂. — La acidez producida en HO₂ de levadura (22), con 1 % de glucosa, después de 12 días de incubación a 30°, fué la siguiente:

Agua de levadura sin SO ₂	2,63 o/oo en H ₂ SO ₄
» » » con 0,098 o/oo de SO ₂ ...	2,85 »
» » » » 0,185 » » »	2,75 »
» » » » 0,294 » » »	2,75 »
» » » » 0,500 » » »	1,59 »

Como los testigos estériles de toda la serie estudiada presentaban igual acidez (0,55 o/oo), puede deducirse de las cifras de la fermentación, que hay bastante resistencia al SO₂, pues sólo con 0,500 o/oo de SO₂ disminuyó sensiblemente la acidez producida.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — Como esta parte de la Fisiología constituye el punto principal del estudio del bacterio, tanto por su interés práctico, debido a los productos de fermentación originados, como por su importancia sistemática, se resumen en el cuadro que sigue los resultados (positivos o negativos) obtenidos, detallándose en el gráfico No 1 y los cuadros No 3, 4 y 5 que continúan, los diversos ensayos de fermentación efectuados ⁽¹⁾.

Bacterium Gayoni MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER
Fermentación

Glucosa	+	Arabinosa	—
Levulosa	+	Glicerina	—
Galatosa	+	Manita	—
Lactosa	+	Amigdalina	—
Maltosa	+	Dextrina	—
Sacarosa	+	Acido málico	—
Rafinosa	+	Acido tartárico	—
Xilosa	+	Acido cítrico	—

(1) Tanto en la descripción de este germen, como en la de los otros, sólo se incluyen, debido a la falta de espacio, los principales resultados positivos, excluyéndose los negativos.

En los gráficos, la acidez (que se expresa en H₂SO₄), se refiere a la originada por el germen en la fermentación del azúcar o sustancia agregada, hecha la deducción correspondiente de la acidez producida por el germen en el mismo medio de fermentación, durante el mismo tiempo, sin agregado de sustancia fermentescible, y que se conoció por el ensayo correlativo siempre efectuado. También se investigó en este último caso, si hubo desarrollo, por la observación microscópica o por la acidez, comparada con testigos estériles.

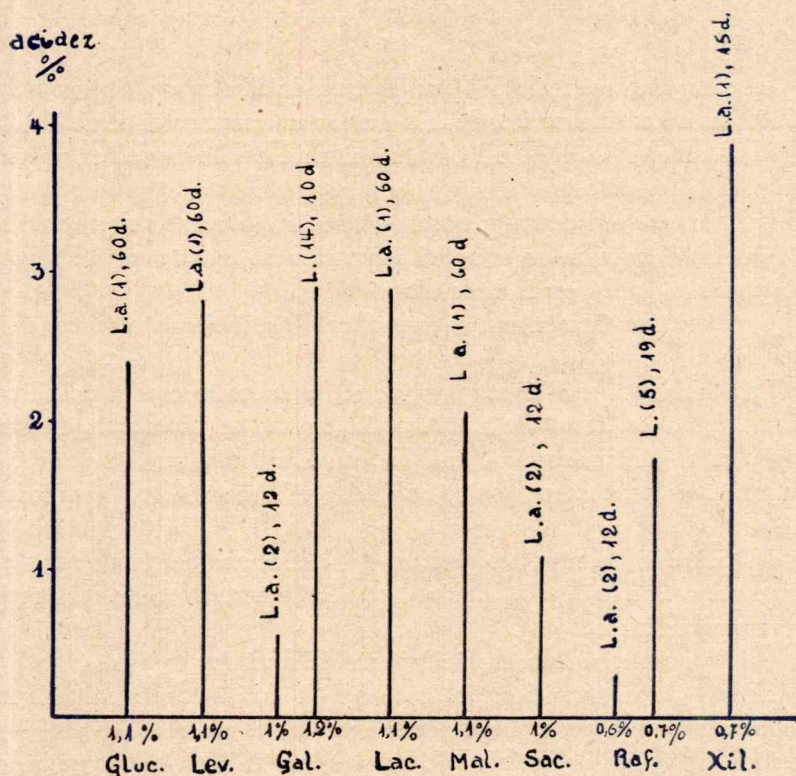
Se indica en los gráficos el por ciento de sustancia agregada al medio en cada ensayo, el número de elaboración del agua de levadura (1 = levadura simple, 1.a. = levadura autolizada), y los días que se dejó en incubación (p.e. 60 días).

Como puede verse en el gráfico N° 1 y cuadro N° 3, la fermentación de glucosa y levulosa es enérgica. De ambos azúcares el germen produce ácidos volátiles, pero en mayor proporción a expensas de la levulosa; la acidez volátil producida fué: 1,29 o/oo, de la glucosa y 2,28 o/oo, de la levulosa; de esta producen, además, manita.

El ensayo del cuadro N° 3 se hizo agregando los azúcares al agua

GRÁFICO N.º 1

Bacterium Gayoni. Energía fermentativa de los azúcares atacados



de levadura antes de la esterilización, que se hizo por tindalización (3 días, 1/2 hora por vez a 100°). Los tubos con 50 c.c. de medio se sembraron con 5-6 gotas de un cultivo joven de mosto de cereales, y se incubaron a 30° durante tres semanas.

Los dos casos de fermentación de galactosa estudiados fueron positivos, pero en diferente grado; en agua de levadura (14) fué más intensa, y tan enérgica como con glucosa y levulosa.

La lactosa y la maltosa fueron fermentadas enérgicamente.

CUADRO N° 3

Bacterium Gayoni — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4
Agua lev. (13) sin azúcares, estéril	0,71	0,54	0,27
» » (13) sin azúcares + <i>B. Gayoni</i>	0,88	0,51	0,47
» » (13) + 2 ‰ glucosa + <i>B. Gayoni</i>	5,39	1,80	3,92
» » (13) + 2 ‰ levulosa + <i>B. Gayoni</i>	4,02	2,79	1,74

La sacarosa es fermentada por la cepa de *Bacterium Gayoni* estudiada, pero con menor intensidad que los azúcares anteriores.

En cuanto a la rafinosa los datos obtenidos sólo permiten asignar una débil fermentación.

La fermentación de la sacarosa se hace directamente sin previo desdoblamiento, pues no se constató formación de manita que se habría originado a expensas de la levulosa.

La xilosa fué fermentada enérgicamente produciéndose mucha acidez.

Con arabinosa se hizo un ensayo, conjuntamente con el de xilosa transcrito, con resultado negativo. Lo mismo se obtuvo en dos ensayos más efectuados: uno con lev. aut. (1), con 0,7 ‰ de azúcar y 5 días de incubación; y otro con lev. (14), con 0,6 ‰ dejando 10 días.

La glicerina, manita, amigdalina y dextrina no fueron atacadas en un ensayo con lev. (14), durante 10 días con 1,25 ‰ de substancia (con amigdalina 0,8 ‰).

Por lo que respecta a los ácidos, se hicieron dos ensayos.

El ensayo correspondiente al cuadro N° 4, se efectuó en agua de levadura, elaboración 10. Tratándose de uno de los ensayos previos efectuados, su técnica difiere algo de los otros que se hicieron y que oportunamente se mencionan.

Para evitar una reacción muy ácida del medio, al agregar los ácidos a ensayar, se alcalinizó el agua de levadura con NaOH en forma tal, que al adicionar 2,5 ‰ de ácidos diera un pH aproximado de 5. Se usaron 10 c.c. de solución de NaOH N/1 por litro de medio, que se agregaron a éste, antes de esterilizar. Después de la esterilización, se incorporó el ácido, asépticamente, de una solución al 10 ‰ esterilizada previamente por tindalización.

Para testigo del medio sin ácidos, se separó una fracción del agua

de levadura alcalinizada, y antes de esterilizarla, se llevó a pH aproximado de 5, con HCl al 10 % igualando la dilución como en el caso anterior, con agua destilada.

CUADRO N° 4

Bacterium Gayoni — Fermentación de ácidos (1er ensayo)

	Acidez volátil total ‰ en ácido acético	Acido láctico ‰
Agua lev. (10) sin ácido, estéril	0,54	—
» » (10) + 2,5 ‰ ácido málico, estéril	0,60	—
» » (10) + 2,5 » ácido tartárico, estéril	0,60	—
» » (10) + 2,5 » ácido cítrico, estéril	0,66	0,28
Agua lev. (10) sin ácidos + <i>Bact. Gayoni</i>	1,20	0,53
» » (10) + 2,5 ‰ ácido málico + <i>Bact. Gayoni</i> ..	1,20	0,51
» » (10) + 2,5 » ácido tartárico, + <i>Bact. Gayoni</i> ..	0,96	0,48
» » (10) + 2,5 » ácido cítrico, + <i>Bact. Gayoni</i> ..	1,26	0,75

Sembrado en este medio, el germen desarrolló únicamente en los testigos, pero no en los tubos con ácidos. El pH parece haber sido la causa, pues los testigos tenían pH 5,5-5,6 y los otros pH 4.

Se agregó entonces a cada tubo de ácido (conteniendo 50 c.c. de agua de levadura), 1 c. c. de sol. N de NaOH estéril para llevar a pH 5,8-6 y también 2 % de glucosa a todos los tubos incluso los testigos, para facilitar el desarrollo. Se sembraron y se incubaron a 30° durante un mes.

De los datos analíticos puede deducirse que no hubo fermentación, pues el contenido en ácidos volátiles y de ácido láctico fué igual en los testigos y en los tubos con ácidos. No se incluye el dato de la acidez total y de la acidez fija, debido a la diferente alcalinización que sufrieron los tubos con ácidos, y el testigo.

Los resultados de este ensayo previo, fueron corroborados con el detallado en el cuadro N° 5, en donde la fermentación fué regular.

En el ensayo del cuadro N° 5, se usó agua de levadura, elaboración 15, que se alcalinizó con NaOH hasta llevarla a pH 6,5, esterilizándose entonces por tindalización, una vez repartida en tubos de 50 c.c. cada uno.

Se agregó después a cada uno, asépticamente, un c.c. de una solución al 10 % del ácido a investigar, obteniéndose así una concentración de 1,96 ‰, y un pH aproximado de 4,5; al testigo no se agregó ácido de ninguna especie quedando con el pH original. Se sembró con unas gotas de un cultivo fresco de mosto de cereales, y se incubó a 30° durante 3 semanas.

CUADRO N° 5

Bacterium Gayoni — Fermentación de ácidos (2° ensayo)

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) » + <i>B. Gayoni</i>	0,61	0,42	0,27	—
» » (15) + 1,96 ‰ a. málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. Gayoni</i> ..	2,40	0,45	2,03	—
» » (15) + 1,96 » a. tartárico estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. Gayoni</i> ..	1,96	0,54	1,52	—
» » (15) + 1,96 » a. cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. Gayoni</i> ..	1,96	0,36	1,67	—

Para la interpretación de los datos analíticos de este ensayo (e igualmente de los otros análogos que se mencionan), debe compararse primeramente la acidez producida por el germen desarrollándose en el agua de levadura sin ácidos, con la acidez del medio sin ácidos, estéril.

Luego, por comparación del resultado de la fermentación en el medio con ácidos y el correspondiente testigo con ácido, estéril, y teniendo en cuenta la acidez que produce el germen en el medio, independientemente del agregado de ácidos, se puede conocer si ha habido fermentación o no. En los casos positivos la formación de ácido láctico o de ácidos volátiles sirve de corroboración.

En el cuadro N° 5 se observa que la acidez total en los tubos con ácido málico, tartárico o cítrico, es igual o más elevada que sus correspondientes testigos estériles; como el germen en el medio sin ácidos eleva sólo un poco la acidez, puede deducirse que no hubo ataque de los ácidos.

En caso positivo, al ser atacados los ácidos málico, cítrico o tartárico, se producen ácidos monobásicos como el láctico o acético, y CO_2 , y, por lo tanto, la acidez total es más baja que los testigos de ácidos estériles, como se observará más adelante con otros gérmenes fermentadores de ácidos.

b) *Bacterium intermedium* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER

Cepas estudiadas. Seis:

22 ₂	=	<i>Bacterium intermedium</i> , cepa a
29 ₀	=	» » » b
30 ₁	=	» » » c
1	=	» » » d
3a	=	» » » e
3b	=	» » » f

1. *Morfología*

Forma.—Bastoncitos rectos cuyo diámetro y longitud presentan variaciones en las diversas cepas, como puede verse a continuación:

Cepa	a	0,7-0,9 μ	grueso	por	1-5 μ	largo
»	b	0,7-1 μ	»	»	1-5 μ	»
»	c	0,8-0,9 μ	»	»	1,2-3 μ	»
»	d	0,7-1,2 μ	»	»	1-3 μ	»
»	e	0,8-1 μ	»	»	1-3 μ	»
»	f	0,7-1 μ	»	»	1-1,8 μ	»

En mosto de cereales se presentan aislados o bien agrupados en cadenas cortas; estas son más numerosas en las cepas d, e, f, que toman aspecto de línea punteada con artículos de igual longitud, bastante regularmente. En las cepas a, b, c, las cadenitas son más cortas (6-8 segmentos) y los artículos más alargados.

En agua de levadura también varía la forma en las diversas cepas. Casi todas las cepas forman cadenitas constituídas por segmentos cortos unidos, con borde limitante neto. La cepa c forma cadenitas cortas (8-10 segmentos) de artículos a veces más alargados. Las cepas a y d se presentan en forma sensiblemente igual, pues no forman cadenas; solo excepcionalmente dan algunas.

Movilidad. — Inmóvil.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. *Características de cultivo*

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosada desarrollan abundantemente a los dos días. Las cepas b y f desarrollan con menor intensidad.

Las colonias formadas por las diversas cepas no son iguales. Algunas como c y e forman colonias sensiblemente parecidas a *Bacterium Gayoni*, tanto, que hasta pueden ser confundidas con éstas; se observan, sin embargo, algunas diferencias especialmente en los bordes. La cepa c forma colonias de bordes algo más extendidos y aspecto más bien deshilachado, la cepa e, por el contrario, presenta bordes quebrados y el desarrollo de las colonias no es tan grande como en *Bacterium Gayoni*.

Las cepas a y b forman colonias del mismo tipo, pero algo diferentes: la a forma colonias blanquecino-amarillentas, de forma comple-

tamente irregular, superficie finamente rugosa, sin presentar estrías; son homogéneamente elevadas en el centro, presentando bordes irregulares con algunas salientes que le dan aspecto groseramente dentado. La estructura interna es finamente granulada.

La cepa b forma colonias de tipo intermedio entre a y las primeras descritas. Amarillentas, irregulares, groseramente poligonales, de superficie rugosa, pero sin presentar las estrías pronunciadas de c y e; bastante elevadas, en forma homogénea, en la parte céntrica, siendo achatadas en los bordes; estos son irregulares con pequeñas derivaciones que le dan aspecto lobulado. La estructura interna es bastante granulada.

La cepa d forma colonias completamente diferentes a los tipos descritos. Son amarillentas, redondas, relativamente más pequeñas, bastante elevadas en el centro y chatas en los bordes, superficie finamente rugosa careciendo en absoluto de estrías, pero presentando una especie de anillo marginal cerca del borde, constituido por una zona más clara que el resto de la colonia. Bordes irregularmente dentados, estructura interna finamente rugosa y concéntrica.

La cepa f tiene colonias de aspecto sensiblemente parecido a la anterior, son blanco amarillentas, no presentan el anillo marginal tan pronunciado, y los bordes son menos dentados.

Desarrollo en estria. — En agar de mosto de malta desarrollan abundantemente; las cepas b y f más bien moderado. El desarrollo es difuso, esparcido, de lustre brillante, aspecto húmedo, consistencia mantecosa y más bien acuosa en la cepa b, opalescente, de superficie rugosa, sin olor y sin alteración del color del medio.

Licucción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales desarrollan bien a las 24-48 horas. La cepa a es la más activa, tanto como *Bacterium cocciforme*; las otras también lo son, pero en menor grado. En mosto sin CaCO_3 todas forman gas. Por el desarrollo enturbian fuertemente el medio, que después se aclara; esto ocurre en las cepas b, c y e inmediatamente, mientras que en d y f sólo después de tres o cuatro semanas; y en a después de varias semanas queda aún turbio dada su actividad. Se conservan vivos hasta 11 meses, en este medio. El comportamiento en mosto sin CaCO_3 es análogo.

En *agua de levadura* con o sin azúcares, desarrollan análogamente a otros bacterios maníficos produciendo enturbiamiento amarillento con levulosa, menor con glucosa, y copos algodonosos disgregables. La cepa a es particularmente activa.

En *caldo ácido o alcalino* sin azúcar no desarrolla. En *caldo ácido*

levulosado desarrolla activamente a las 24 horas. Con 1 % de levulosa después de 9 días de incubación la acidez producida fué:

Testigo estéril		0,49 o/oo en H ₂ SO ₄		
Cepa	a	2,35	»	»
»	b	2,35	»	»
»	c	0,93	»	»
»	d	2,25	»	»
»	e	1,47	»	»
»	f	1,47	»	»

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — Desarrolla bien a temperatura ambiente (15°-20° C) y en estufa a 25°, 30° y 37°. No desarrolla a 42° en diez días.

A temperatura ambiente el desarrollo comienza a los 3-4 días siendo escaso en las cepas e y f; a 25° el desarrollo es bueno comenzando a las 24-48 horas; a 30° el desarrollo es muy bueno ya a las 24 horas; a 37° el desarrollo es escaso y comienza a los dos o tres días, salvo en las cepas a y b que empieza a las 24 horas. *Temperatura óptima aproximada:* 30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Positiva. En agar de mosto de malta en tubos, en anaerobiosis, desarrollan a las 24-48 horas, rompiendo el agar con los gases formados.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrollan acidificando lentamente; recién a la semana de incubación a 30° hay algo de acidificación en forma poco intensa; se exceptúa la cepa c que acidificó fuertemente a partir de las 24 horas. No coagula. No reduce el tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — La fermentación en agua de levadura (16), con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°, dió el siguiente resultado:

pH	Acidez producida por cada cepa en H ₂ SO ₄ ‰						Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	a	b	c	d	e	f	
3,5	1,04	1,82	1,82	1,52	1,52	1,58	1,55
4,3	—	1,82	1,82	1,43	1,48	1,48	1,60
5	1,56	1,71	1,59	1,53	1,68	1,41	1,58
5,8	1,65	1,89	1,86	1,47	1,65	1,53	1,67
6,7	1,65	1,92	1,83	1,53	1,59	1,53	1,68
7,6	1,60	1,87	1,94	1,54	1,60	1,54	1,68

Puede observarse que hay gran resistencia a la acidez, con uniformidad en las diferentes cepas. El desarrollo comenzó a las 24 horas en todos los valores pH, excepto en 3,5 y 7,6 que fué a las 48 horas. No se pudo fijar un pH óptimo.

Influencia del alcohol. — Los datos de la fermentación en agua de levadura con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°, son los que siguen:

Alcohol %	Acidez producida por las diferentes cepas en H_2SO_4 ‰						Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	c	d	e	f	
0	1,65	1,89	1,86	1,47	1,67	1,53	1,68
6,33	1,65	1,95	1,77	1,53	1,53	1,53	1,66
8,53	1,77	1,83	1,77	1,53	1,59	1,59	1,68
11,85	1,65	1,77	1,59	1,50	1,41	1,53	1,57

El desarrollo comenzó con 6,33 % a las 24 horas, con 8,53 % a las 48 horas y con 11,85 % a los tres días. Como se ve en el cuadro, la acidez producida no varió con los diversos agregados de alcohol.

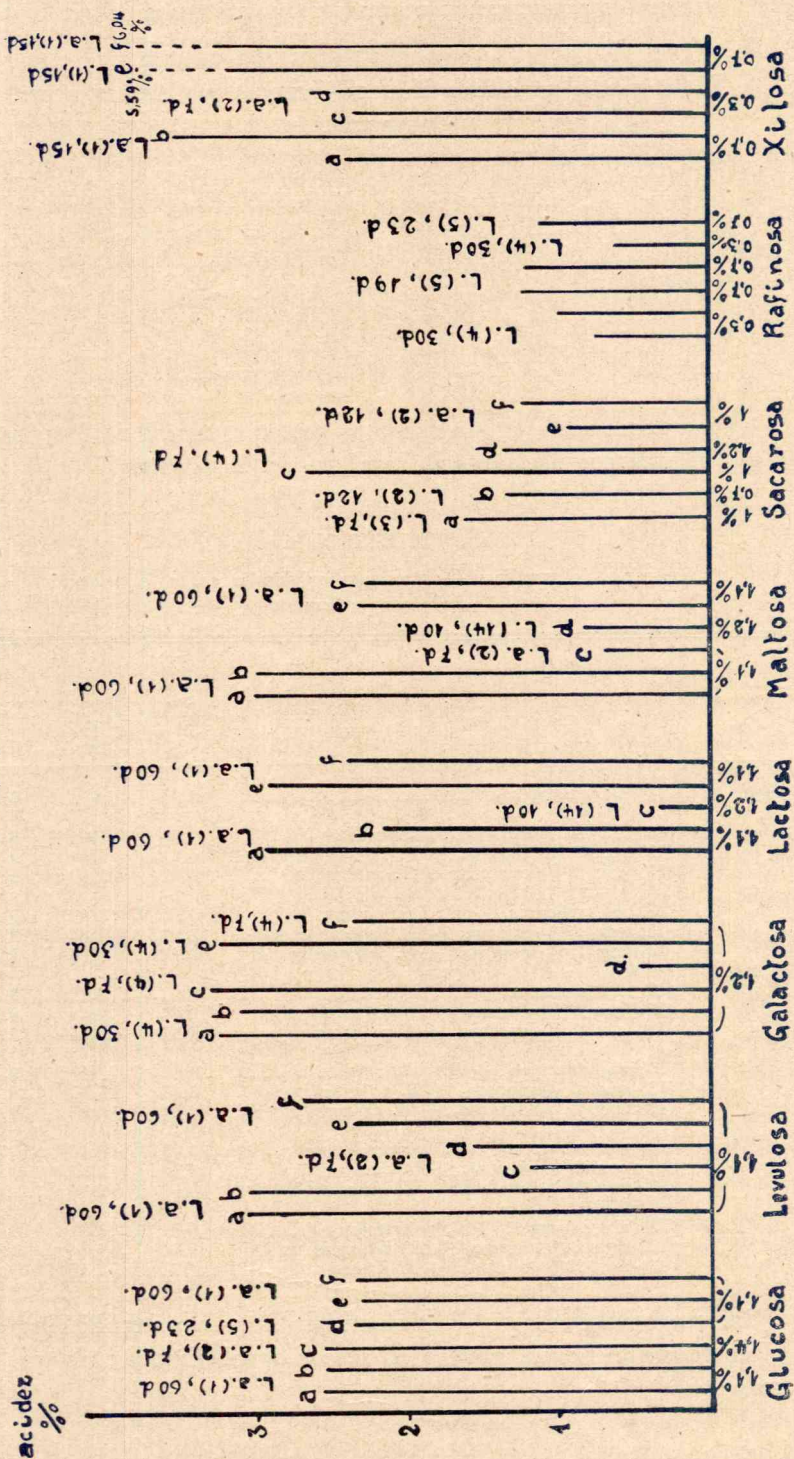
Influencia del SO_2 . — El ensayo de fermentación con H_2O de lev. (22), glucosada al 1 %, después de 12 días de incubación a 30°, dió el siguiente resultado:

SO_2 ‰	Acidez producida por las diferentes cepas en H_2SO_4 ‰						Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	c	d	e	f	
0	3,00	2,81	—	—	3,00	—	2,94
0,098	3,00	3,12	3,18	1,84	2,89	2,75	2,80
0,185	2,69	3,19	3,12	1,56	—	2,75	2,66
0,294	2,39	2,89	3,12	1,47	2,51	2,18	2,43
0,500	1,04	1,84	1,53	1,10	1,04	1,04	1,27

Se observa que si bien resisten bastante al SO_2 , con una fuerte dosis la fermentación es fuertemente inhibida, siendo esto general en las diversas cepas.

Fermentación de hidratos de carbono y otras substancias. — Como en el caso de *Bacterium Gayoni*, se resumen a continuación los resultados obtenidos y en el gráfico N° 2 y cuadros N° 6 y 7 se consigna el detalle de los principales ensayos.

GRÁFICO N.º 2
Bacterium intermedium. Energía fermentativa de los azúcares atacados



Bacterium intermedium MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Fermentación

Glucosa	+	Arabinosa	—
Levulosa	+	Glicerina	—
Galactosa	+	Manita	—
Lactosa	+	(1) Amigdalina	—
Maltosa	+	Dextrina	—
Sacarosa	+	Acido málico	+
Rafinosa	+	Acido tartárico	—
Xilosa	+	Acido cítrico	—

Como puede verse en el gráfico n° 9 y en el cuadro n° 6, todas las cepas fermentan enérgicamente la glucosa y la levulosa.

CUADRO N° 6

Bacterium intermedium — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4	Acidez volátil $\frac{0}{100}$ en ácido acét.	Acidez fija $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4
Agua lev. (13) sin azúcares, estéril	0,71	0,54	0,27
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> a	0,83	0,66	0,29
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> a	6,52	1,56	5,24
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> a	4,21	2,73	1,98
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> b	0,83	0,69	0,27
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> b	5,29	1,68	3,92
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> b	4,41	2,76	2,16
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> c	0,98	0,69	0,42
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> c	5,49	2,04	3,82
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> c	4,31	2,76	2,06
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> d	0,86	0,48	0,47
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> d	5,49	1,53	4,24
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> d	4,21	3,12	1,67
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> e	0,83	0,45	0,47
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> e	5,10	2,34	3,18
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> e	4,02	2,94	1,62
» » (13) sin azúcares, + <i>B. intermedium</i> f	0,83	0,51	0,42
» » (13) con 2 % glucosa, + <i>B. intermedium</i> f	5,24	2,04	3,58
» » (13) con 2 % levulosa, + <i>B. intermedium</i> f	4,31	3,30	1,62

El ensayo del cuadro n° 6 se efectuó en las mismas condiciones que el correspondiente del gráfico n° 2, con igual duración de tres semanas.

(1) Con la cepa d no se consiguió la fermentación de lactosa.

Todas las cepas produjeron abundantemente ácidos volátiles de ambos azúcares, pero en mayor proporción de levulosa que de glucosa, en todos los casos; mientras que con glucosa la acidez volátil producida osciló entre 0,90 y 1,80 o/oo en ácido acético, con levulosa fué de 2,07 a 2,81, es decir, más o menos el doble. De levulosa se produce, además, manita.

La fermentación de galactosa fué positiva y enérgica en todas las cepas. Lo mismo en cuanto a maltosa.

Por lo que respecta a la lactosa, exceptuadas las cepas c, d, todas la fermentaron igualmente con energía. La cepa c en los ensayos efectuados demostró tener poca actividad sobre ese azúcar.

En cuanto a la cepa d, no fermentó lactosa en dos ensayos hechos: uno con levadura autolizada (2), al 1 %, durante 7 días, y otro con levadura (14), al 1,25 %, durante 10 días.

Frente a sacarosa, se mostraron también todas las cepas muy activas, fermentándola enérgicamente. La cepa e en uno de los ensayos efectuados, no fermentó, sin embargo, pero en el otro lo hizo con bastante energía.

La sacarosa es fermentada directamente; no se constató producción de manita que se habría formado a expensas de la levulosa en caso de desdoble previo.

La rafinosa fué también fermentada en todos los ensayos, menos en uno, pero con muy poca energía.

La xilosa se atacó con energía, lo mismo que *Bacterium Gayoni*. La arabinosa, por el contrario, no fué atacada por ninguna cepa, en los diversos ensayos efectuados, sea junto con xilosa o aparte: con levadura autolizada (1), 0,7 %, 5-8 días, con todas las cepas; con lev. (4), 0,33 %, 30 días, en las cepas a, b; con lev. (14), 0,6 %, 10 días en la cepa c; y con lev. (6), 0,7 %, 10 días, en las cepas e, f.

La glicerina tampoco fué atacada. Se ensayó en lev. (4) al 1,25 por ciento dejando 30 días, con las cepas a, b, e, c y 7 días con las c, e, f; con lev. (14), al 1,25 %, dejando 10 días, con la cepa c; y con lev. (5) al 1,4 %, durante 23 días, con la cepa b.

La manita y dextrina tampoco se fermentaron en ensayos efectuados con lev. (14), 1,25 %, 10 días, con todas las cepas.

Del mismo modo, ninguna cepa atacó amigdalina. Se investigó con lev. (4), 0,7 %, 30 días, con las cepas a, b, e, f; con lev. (6), 1 %, 10 días, con las cepas a, c, e, f y con lev. (14), 1,25 %, 10 días con las cepas c y d.

El ensayo de fermentación de ácidos del cuadro No 7 se hizo con agua de levadura (14) en condiciones exactamente iguales al ensayo del cuadro no 5, con duración de 3 semanas.

CUADRO N° 7

Bacterium intermedium — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> a	0,69	0,42	0,34	0,96
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> b	0,73	0,57	0,25	0,49
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> c	0,69	0,36	0,38	0,48
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> d	0,69	0,45	0,32	—
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> e	0,59	0,30	0,34	0,75
» » (15) » » + <i>B. intermedium</i> f	0,64	0,36	0,34	—
Agua lev. (15) + 1,96 ‰ á. málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> a	1,62	0,45	1,25	1,10
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> b	1,76	0,51	1,35	0,87
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> c	1,67	0,39	1,35	0,98
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> d	1,76	0,39	1,45	1,79
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> e	1,76	0,36	1,47	1,45
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> f	1,57	0,54	1,13	1,61
Agua lev. (15) + 1,96 ‰ a. tartárico, estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> a	1,96	0,48	1,58	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> b	1,96	0,66	1,42	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> c	2,03	0,60	1,54	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> d	2,11	0,36	1,81	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> e	2,06	0,42	1,71	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> f	2,06	0,36	1,76	—
» » (15) + 1,96 ‰ á. cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> a	2,14	0,48	1,71	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> b	2,06	0,63	1,54	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> c	2,01	0,48	1,62	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> d	2,11	0,60	1,62	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> e	1,96	0,36	1,67	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. interm.</i> f	1,96	0,48	1,57	—

El ácido málico es atacado en parte por todas las cepas investigadas. Comparando la acidez total producida por el desarrollo del germen en el medio con 1,96 ‰ de ácido málico, y el correspondiente testigo estéril, se observa que en éste la acidez es mayor. Esto indica que el ácido málico ha sido atacado con producción de ácidos monobásicos, pues el desarrollo del germen en el medio sin ácidos produce un ligero aumento de la acidez, como se ve en la primera parte del cuadro.

Por el ataque del ácido málico no se produce aumento de ácidos volátiles, los que están en igual proporción que el testigo, pero en cambio hay sensible aumento del contenido en ácido láctico; el aumento efectivo de éste, varió en las diversas cepas alcanzando en algunas cerca de 1 ‰.

El ácido tartárico y el ácido cítrico, no fueron atacados; la acidez volátil en los tubos sembrados fué mayor que en los estériles, aproximadamente. No se investigó, por lo tanto, el contenido en ácido láctico.

c) *Bacterium cocciforme* (N. SPEC.)

Cepas estudiadas. Una: N° 31.

1. *Morfología*

Forma. — Bastoncitos cortos de $0,7-1\ \mu$ de ancho por $0,9-1,5\ \mu$ de largo, de extremos completamente redondeados, aislados o unidos de a dos, por lo general, semejante a diplococos y fácilmente confundibles con los bacterios acéticos; se unen, además, en pequeñas cadenitas de pocos artículos, cuatro o cinco. En medios líquidos presentan la misma forma, observándose en mosto de cereales excepcionales cadenitas de unos diez segmentos, que parecen entreptococos. En agua de levadura, con o sin azúcares, lo mismo, pero las cadenitas son más largas presentando hasta alrededor de unos 20 artículos, lo que da aspecto de rosario.

La forma ovoide de los segmentos en todos los medios estudiados, presentando a veces aspecto netamente coccoide, es lo que justifica el nombre de esta especie.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. *Características de cultivo*

Colonias. — En agar de agua de levadura levulosada en superficie, desarrolla bien formando colonias amarillentas redondeadas, relativamente pequeñas (en comparación con las de otros gérmenes manífticos), de superficie rugosa finamente granulada, sin estrías, algo elevadas homogéneamente en el centro, pero poco, bordes irregulares, groseramente dentados. La estructura interna es finamente granulada.

Desarrollo de estría. — En agar de mosto de malta desarrolla abundantemente a las 24 horas. Desarrollo difuso, no elevado (esparcido), lustre brillante, aspecto húmedo, consistencia mantecosa, flúida, casi líquida, estría opalescente, superficie algo rugosa más bien lisa, color inalterado, y ausente de olor extraño.

Licuefacción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales en aerobiosis o anaerobiosis, con o sin carbonato de calcio, desarrolla activamente siendo el más enérgico de los gérmenes estudiados, presentando completo desarrollo a las 24 horas; en mosto sin Ca forma gases. El desarrollo se produce con enturbiamiento intenso,

aclarándose sólo después de tres o cuatro semanas; en el mosto sin Ca se observó la clarificación a las 48 horas. Se conserva en el medio, hasta 11 meses.

En *agua de levadura* con o sin azúcares desarrolla muy bien a las 24-48 horas. Con levulosa desarrolla enérgicamente ocasionando un enturbiamiento amarillento; con glucosa ocurre lo mismo, pero con menor intensidad. Después del desarrollo hay deposición de la masa bacteriana en forma análoga a *Bacterium Gayoni*.

En *caldo ácido o alcalinizado*, sin azúcar, desarrolla escasamente; en caldo levulosado hay activo desarrollo a las 24-48 horas. Con 1 por ciento de levulosa a los 9 días de incubación a 30° la acidez producida fué:

Testigo estéril	0.49	‰ en H ₂ SO ₄
Con <i>Bacterium cocciforme</i>	1.37	» » »

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — En agar de mosto de malta en superficie, desarrolla a temperatura ambiente (15-20° C) y en estufa a 25°, 30° y 37°. No desarrolla a 42° en 10 días. A temperatura ambiente hay buen desarrollo, empezando a las 48 horas. A 25° y 30° muy buen desarrollo a las 24 horas. A 37° buen desarrollo a las 24 horas. *Temperatura óptima aproximada:* 25°-30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Positiva. En agar de mosto de malta en tubos, en anaerobiosis, desarrolla a las 24-48 horas, formando gases que rompen el agar, pero con poca intensidad.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla bien, acidificando desde las 24 horas; a la semana la acidificación es enérgica. Después de un mes de desarrollo no hubo coagulación. No reduce el tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — Se obtuvieron los resultados que siguen en la fermentación de agua de levadura (15), con 1 por ciento de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°:

pH	Acidez producida en H ₂ SO ₄ ‰ ₀₀
3,5	0,12
4,3	0,70
5	0,77
5,8	1,10
6,7	1,22
7,6	1,23

Como puede verse, la acidez es un factor muy adverso para la fermentación, en *Bacterium cocciforme*. De los bacterios maníticos estudiados es la única especie que se mostró sensible a la reacción del medio.

El desarrollo comenzó a las 24 horas, menos en pH 3,5 y pH 4,3 que fué a las 48 horas. La acidez producida aumenta sensiblemente con los valores pH permaneciendo estacionaria alrededor del punto neutro. El pH óptimo aproximado es de 6 a 7.

Influencia del alcohol. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, a los 10 días de incubación a 30°, dió los siguientes resultados:

Alcohol %	Acidez producida en H ₂ SO ₄ ‰
0	1,10
6,33	1,16
8,53	0,55
11,85	0,37

Análogamente al comportamiento manifestado en el ensayo anterior, *Bacterium cocciforme* se presenta muy sensible al alcohol, siendo la única especie de bacterio manítico estudiado, que ofrece esta característica.

La acidez producida fué disminuyendo sensiblemente con el aumento del alcohol, siendo muy escasa con 11,85, tal vez próxima al límite de resistencia.

En cuanto al desarrollo, con 6,33 % comenzó a las 48 horas, con 8,53 % a los tres días más o menos, y con 11,85 % aún más tarde.

Influencia del SO₂. — Se obtuvieron los siguientes resultados de fermentación, con agua de levadura (22) glucosada al 1 %, después de 12 días de incubación a 30°:

Sin SO ₂	1,84 ‰ de acidez en H ₂ SO ₄
Con 0,185 ‰ de SO ₂	1,84 » » » » »
» 0,294 » » »	1,89 » » » » »
» 0,500 » » »	1,53 » » » » »

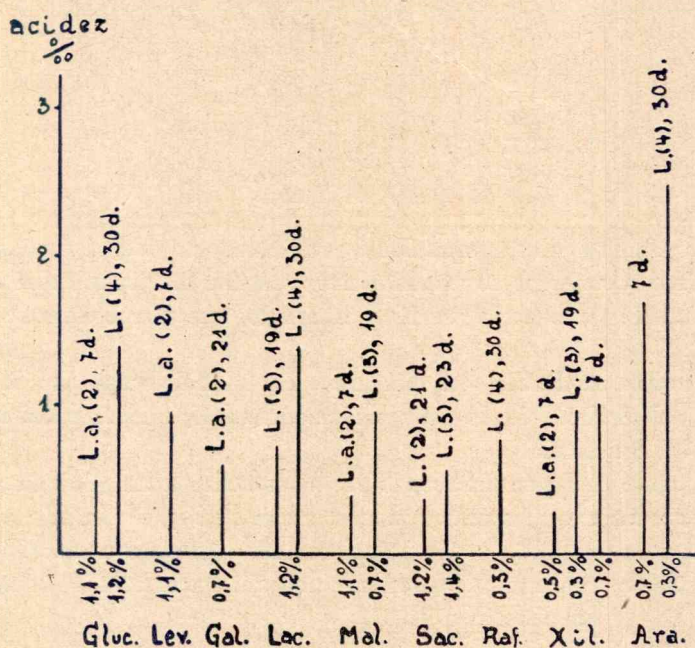
Como puede verse, también con respecto al SO₂ se manifestó esta especie sensible, si bien sólo con dosis elevadas.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — Antes de detallar la fermentación en el gráfico No 3 y cuadros Nos 8 y 9, se resumen, en el cuadro que sigue, los resultados obtenidos:

Bacterium cocciforme (n. spec.). Fermentación

Glucosa	+	Arabinosa	+
Levulosa	+	Glicerina	—
Galactosa	+	Manita	—
Lactosa	+	Amigdalina	—
Maltosa	+	Dextrina	—
Sacarosa	+	Acido málico	+
Rafinosa	+	Acido tartárico	—
Xilosa	+	Acido cítrico	+

GRÁFICO N.º 3

Bacterium cocciforme. Energía fermentativa de los azúcares atacados

La fermentación del cuadro N.º 8 se hizo en las mismas condiciones que la del cuadro N.º 3, con duración de tres semanas. Se observa que la levulosa fué más enérgicamente atacada que la glucosa y que sólo de este azúcar se produjeron ácidos volátiles, (1,68 o/oo en ácido acético). De la glucosa no se formaron, por consiguiente, ácidos volátiles a pesar de fermentarse con bastante energía. De la levulosa, se origina, además, manita.

La galactosa es atacada débilmente. La lactosa y la maltosa en un ensayo fueron fermentadas débilmente, y en otro en forma neta.

La sacarosa fué débilmente atacada y en una de las experiencias la fermentación fué nula; igualmente hubo poco ataque de la rafinosa. Ambos azúcares, sin embargo, deben considerarse como fermentados. La sacarosa debe fermentarse directamente sin previo desdoble, a juzgar por la falta de manita que se hubiera producido a expensas de la levulosa.

CUADRO N° 8

Bacterium cocciforme — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4
Agua lev. (13) sin azúcares, estéril	0,71	0,54	0,27
» » (13) sin azúcares + <i>B. cocciforme</i>	1,10	0,72	0,51
» » (13) con 2 ‰ glucosa, + <i>B. cocciforme</i>	2,74	0,78	2,11
» » (13) con 2 ‰ levulosa, + <i>B. cocciforme</i>	3,67	2,40	1,71

La xilosa y la arabinosa son atacadas energicamente. La arabinosa mucho más que la xilosa.

La glicerina, manita, amigdalina y dextrina, no fueron fermentadas. Con glicerina se ensayó en lev. (4), al 1,2 ‰, 30 días; en lev. (5), 1,4 ‰, 23 días y en lev. (2), 0,5 ‰, 21 días. Con amigdalina en este último medio y además en lev. (4), 0,7 ‰, 30 días y en lev. (6), 1 ‰, 10 días. Con manita y dextrina en lev. (14), 1,25 ‰, 10 días.

CUADRO N° 9

Bacterium cocciforme — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) sin ácidos, + <i>B. cocciforme</i>	1,08	0,72	0,49	0,57
» » (15) con 1,96 ‰ ácido málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) con 1,96 ‰ á. málico, + <i>B. cocciforme</i> ..	1,81	0,75	1,20	1,48
» » (15) con 1,96 ‰ tartárico, estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) con 1,96 ‰ tartárico + <i>B. cocciforme</i> ..	2,16	0,75	1,54	—
» » (15) con 1,96 ‰ ácido cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) con 1,96 ‰ á. cítrico, + <i>B. cocciforme</i> ..	1,67	1,08	0,83	1,08

El ensayo de fermentación de ácidos del cuadro N° 9 se hizo en iguales condiciones a las del cuadro N° 5, durando tres semanas.

Puede observarse que esta especie fermenta con regular energía los ácidos málico y cítrico, mientras que no ataca al tartárico.

La acidez total producida por el germen en presencia de ácido málico, es bastante inferior al correspondiente testigo estéril, prueba de que ha sido atacado, lo que se ratifica por el contenido en ácido láctico, cuya producción efectiva es de 0,91 o/oo.

La acidez del medio con ácido cítrico, es también inferior a su testigo estéril; por el ataque de ese ácido se produce algo de acidez volátil, y ácido láctico, este en menor proporción que a expensas del ácido málico.

En cuanto al ácido tartárico, las cifras de la acidez total evidencian que no ha sido atacado; no se determinó, por consiguiente, el ácido láctico.

d) *Bacterium Müller-Thurgau* (N. SPEC.)

Cepas estudiadas. Una: N° 22₁

1. *Morfología*

Forma — Se presenta en forma de bastoncitos de 0,7-0,9 μ de ancho por 1,2-2,8 μ de largo, aislados o unidos en parejas, excepcionalmente en mayor número; algunos son más bien alargados y otros con extremos ligeramente redondeados.

En mosto de cereales se presenta también en forma de bastoncitos unidos de a dos o en mayor número, e igualmente en filamentos gruesos de artículos desiguales, algunos cortos mientras que otros bastante largos y sin tabiques.

En agua de levadura forma, de igual modo, bastoncitos más bien alargados unidos de a dos o tres; no se observan cadenas.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. *Características de cultivo*

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosada, hay buen desarrollo formando colonias más bien chicas, blanco-amarillentas, de forma circular con mucha regularidad, superficie casi lisa muy finamente y apenas rugosa, con una elevación central y bordes lisos enteros, estructura interna amorfa.

Desarrollo en estría. — En agar de mosto de malta desarrolla abun-

dantemente a las 24 horas, en forma difusa, no elevada, con lustre brillante, aspecto húmedo, consistencia mantecosa, acuosa, opalescente, superficie algo rugosa más bien lisa, sin olor y sin alteración del color del medio.

Licuação gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En *mosto de cereales* en aerobiosis o anaerobiosis, con o sin CaCO_3 , desarrolla activamente a las 24 horas, en forma análoga a *Bacterium cocciforme*. Por el desarrollo el medio se enturbia fuertemente, aclarándose después de tres o cuatro semanas. En ausencia de Ca aclara inmediatamente y forma gases. Viven hasta 11 meses en el medio.

En *agua de levadura* con o sin azúcares desarrolla a las 24-48 horas. Con levulosa desarrolla activamente con enturbiamiento amarillento del líquido; con glucosa ocurre lo mismo, pero el enturbiamiento es menor. La masa bacteriana en todos los casos deposita después del desarrollo, formando en el fondo del tubo copos algodonosos que se disgregan con facilidad, analógicamente a otros bacterios maníticos.

En *caldo ácido o alcalinizado* sin azúcares, desarrolla escasamente a las 24 horas. En caldo levulosado desarrolla activamente; con 1 por ciento de levulosa la acidez producida a los 9 días de incubación a 30° fué:

Testigo estéril	0,49	0/00	en H_2SO_4
Con <i>Bact. Müller-Thurgau</i>	2,49	»	»

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — Sobre agar de mosto de malta desarrolla a temperatura ambiente (15-20° C), y en estufa a 25°, 30°, 37° y 42°. A temperatura ambiente hay buen desarrollo con comienzo a las 48 horas; a 25°, 30°, 37° y 42° muy buen desarrollo con comienzo a las 24 horas. *Temperatura óptima aproximada:* 30°-37° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Positiva. En agar de mosto de malta en tubos, en anaerobiosis, desarrolla a las 24 horas; los gases formados rompen intensamente el agar.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla acidificando lentamente; el tornasol se enrojece a la semana de incubación a 30°, pero con poca intensidad. Después de un mes no hubo coagulación. No reduce el tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días dió el siguiente resultado:

pH	Acidez producida en H_2SO_4 ‰
3,5	1,58
4,3	1,60
5	1,44
5,8	1,59
6,7	1,53
7,6	1,57

Esta especie, como puede verse, se mostró particularmente resistente al pH, presentando a las 24 horas enérgico desarrollo en todos los valores estudiados. No se pudo apreciar en el desarrollo, diferencias sensibles como para establecer un pH óptimo exacto, estando aproximadamente entre 4,3 y 6,7.

Influencia del alcohol. — Se obtuvieron los siguientes datos de la fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación:

Alcohol ‰	Acidez producida en H_2SO_4
0	1,59
6,33	1,89
8,53	1,77
11,85	1,47

También con respecto al alcohol se manifestó *Bacterium Müller-Thurgau* muy resistente. Con 6,33 % el desarrollo comenzó a las 24 horas, con 8,53 % a las 48 horas y con 11,85 %, a los 3 días apenas había empezado el mismo. La acidez producida no varió mayormente en los diversos rangos ensayados.

Influencia del SO_2 . — El ensayo de fermentación con agua de levadura (22) glucosada al 1 %, dió después de 12 días de incubación a 30° el siguiente resultado:

Sin SO_2	2,89 ‰ de acidez en H_2SO_4
Con 0,098 ‰ de SO_2	2,89 » » » » »
» 0,185 » » » »	2,89 » » » » »
» 0,294 » » » »	2,85 » » » » »
» 0,500 » » » »	2,75 » » » » »

Como todos los testigos estériles dieron 0,55 ‰ de acidez en H_2SO_4 puede deducirse que esta especie demuestra también su resistencia al SO_2 en forma análoga al pH y al alcohol.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — En el cuadro que sigue se resumen los resultados, positivos o negativos, de la fermentación de sustancias, siguiendo luego el gráfico N° 4, y los cuadros Nos 10 y 11 que detallan los diversos ensayos de fermentación realizados.

Bacterium Müller-Thurgau (n. spec.) — *Fermentación*

Glucosa	+	Arabinosa	+
Levulosa	+	Glicerina	—
Galactosa	+	Manita	—
Lactosa	—	Amigdalina	—
Maltosa	+	Dextrina	—
Sacarosa	+	Acido málico	+
Rafinosa	+	Acido tartárico	—
Xilosa	+	Acido cítrico	—

Del gráfico N° 4 y cuadro N° 10 se deduce que la glucosa y la levulosa son atacados intensamente por *Bacterium Müller-Thurgau*. En el segundo ensayo con estos azúcares (cuadro 10), efectuado conjuntamente con el del cuadro n° 3, con duración de tres semanas, puede observarse como hay producción enérgica de ácidos volátiles a partir de la levulosa (2,52 o/oo de acidez en ácidos acético), mientras que es casi nula con la glucosa. Este comportamiento es análogo al de *Bacterium cocciforme*. A expensas de la levulosa se origina, además, manita.

La maltosa y la sacarosa han sido atacadas con bastante energía. Esta última, sin embargo, no fué fermentada en uno de los ensayos efectuados.

Como en la fermentación de sacarosa no se constató producción de manita, puede deducirse que es atacada directamente, sin previo desdoblamiento en glucosa y levulosa.

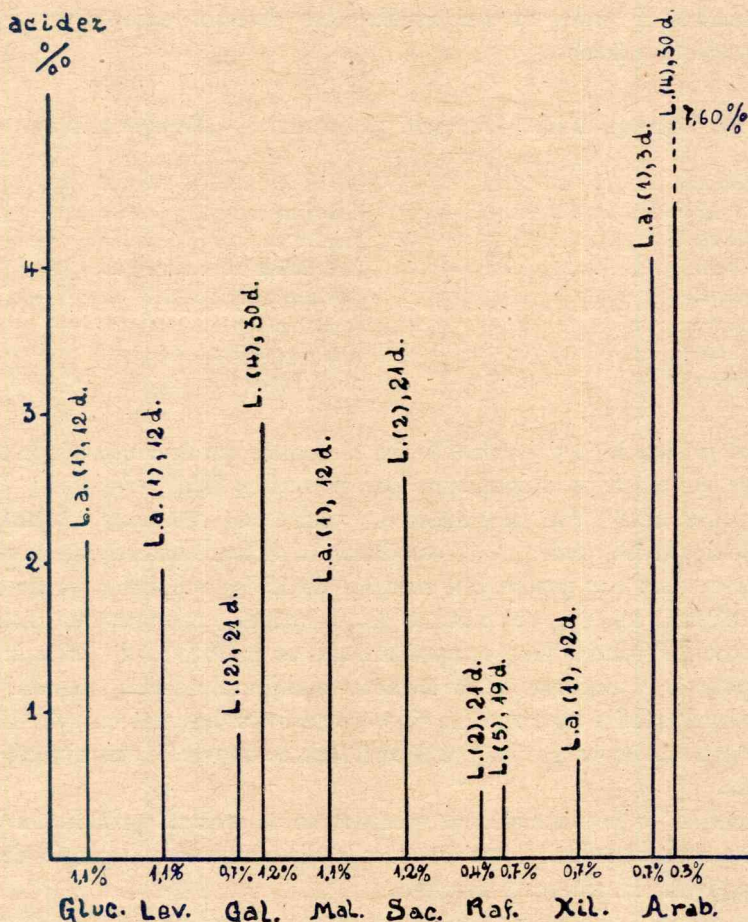
La rafinosa fué atacada débilmente por *Bacterium Müller-Thurgau*, lo mismo que las otras especies de bacterios maníticos.

De la xilosa y la arabinosa, la segunda fué atacada con mucho más energía que la primera.

La lactosa no fué atacada. Se ensayó en lev. autolizada (1), al 1,1 por ciento, 12 días; en lev. (4), al 1,25 %, 30 días y en lev. (5) al 1,4 por ciento, durante 23 días.

Tampoco fueron fermentadas la glicerina, amigdalina, manita y dextrina. Con glicerina se ensayó en lev. (5) al 1,4 %, 23 días, y en lev. (4), 1,25 %, 30 días. La amigdalina se ensayó en este último medio y en lev. (6), al 1 % durante 10 días. La manita y dextrina en lev. (14), 1,25 %, 10 días.

GRÁFICO N.º 4

Bacterium Müller-Thurgau. Energía fermentativa de los azúcares atacados

CUADRO N.º 10

Bacterium Müller-Thurgau — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total $\frac{o}{100}$ en H_2SO_4	Acidez volátil $\frac{o}{100}$ en ácido acét.	Acidez fija $\frac{o}{100}$ en H_2SO_4
Agua lev. (13) sin azúcar, estéril.....	0,71	0,54	0,27
» » (13) sin azúcar, + <i>B. M-Thurgau</i>	0,88	0,51	0,47
» » (13) + 2 $\frac{o}{100}$ glucosa, + <i>B. M-Thurgau</i>	4,31	0,99	3,53
» » (13) + 2 $\frac{o}{100}$ levulosa, + <i>B. M-Thurgau</i>	3,82	3,03	1,35

CUADRO N° 11

Bacterium Müller-Thurgau — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) sin ácidos, + <i>B. M-Thurgau</i>	0,78	0,39	0,47	0,73
» » (15) + 1,96 ‰ á. málico estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » á. málico + <i>B. M-Thurgau</i> ..	1,91	0,72	1,32	1,10
» » (15) + 1,96 » á. tartárico, estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » á. tart. + <i>B. M-Thurgau</i> ..	2,06	0,60	1,57	—
» » (15) + 1,96 » á. cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) + 1,96 » á. cítrico + <i>B. M-Thurgau</i> ..	2,20	0,60	1,71	—

La fermentación de ácidos del cuadro 11 se hizo conjuntamente con las de los cuadros 5, 7, y 9, con una duración idéntica de 3 semanas.

Las cifras de la acidez total de los ácidos tartáricos y cítrico, comparadas con las de los testigos estériles, demuestran que no hubo fermentación. No se investigó, en consecuencia, el contenido de ácido láctico.

La acidez total en el medio con ácido málico, fué bastante inferior a su testigo estéril, lo que indica la fermentación de ese ácido. No hubo producción apreciable de ácidos volátiles, siendo sólo un poco superior al testigo y la producción de ácido láctico fué muy escasa. Se debe asignar, por lo tanto, una débil fermentación del ácido málico.

e) *Bacterium acidovorax* (N. SPEC.)

Cepas estudiadas. Cuatro:

12	=	<i>Bacterium acidovorax</i>	cepa	a
15 ₁	=	»	»	b
34 _e	=	»	»	c
21 _a	=	»	»	d

1. Morfología

Forma. — Las cuatro cepas estudiadas se presentan en forma de bastoncitos que se unen en cadenas filamentosas, características, di-

ferenciables netamente de los otros gémines de los vinos. Las dimensiones de los artículos de estos filamentos son:

Cepa	a	0,4—0,6 μ	de ancho	por	0,8—2,4 μ	de largo	
»	b	0,5—0,7 μ	»	»	1,2—2,5 μ	»	»
»	c	0,4—0,5 μ	»	»	1,2—3,2 μ	»	»
»	d	0,4—0,5 μ	»	»	1,5—4 μ	»	»

Las cepas a y b forman bastoncitos más cortos y gruesos que c y d, y sus cadenitas son más cortas y sinuosas, en cambio c y d forman largas cadenas más bien rectilíneas.

En mosto de cereales a y b forman las mencionadas cadenitas, sinuosas, de 8 a 10 artículos aproximadamente, encontrándose también bastoncitos aislados o unidos de a dos o tres.

Las cepas c y d forman largas cadenas, mucho más alargadas en c que en d, llegando a tener hasta 40 a 60 artículos aproximadamente, constituyendo verdaderos hilos rectilíneos o sinuosos; se encuentran, también, cadenas cortas y aún bastoncitos de a dos o tres.

En d las cadenitas son de menor número de artículos, semejantes a las cepas a y b, pero más finas y menos sinuosas. Se encuentran también cadenas rectilíneas.

En agua de levadura, las características morfológicas son análogas.

Las cepas a y b forman cadenitas cortas de 5-6 artículos muy sinuosas, y bastoncitos aislados o unidos de a 2-3-4 en línea quebrada.

La c forma bastoncitos cortos que se unen en largas cadenas de 50-60 artículos, constituyendo filamentos que al aglutinarse semejan un ovillo.

La d también forma cadenitas filamentosas, pero de menos artículos (20-30) y cadenitas cortas y sinuosas de 6-8 artículos, algunos sensiblemente más gruesos que otros, y aún bastoncitos aislados o unidos de a dos o tres.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. Características de cultivo

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosada desarrolla abundantemente, formando colonias redondeadas de color grisáceo-amarillento, elevadas en el centro homogéneamente, de superficie rugosa finamente reticulada, y bordes irregulares más o menos dentados. Al comienzo del desarrollo las colonias se presentan como manchas gri-

sáceas irregulares, de bordes deshilachados; envejeciendo redondean, y los bordes se tapan haciéndose más lisos.

La estructura interna de la colonia es finamente granulada. Las diversas cepas forman igual tipo de colonia, pero la d demora algo más en desarrollarse.

Desarrollo en estria. — En agar de mosto de malta, el desarrollo es abundante comenzando a las 24 horas, excepto la cepa d que empieza a las 48 horas. Se presenta difuso, con colonias separadas, no elevado, de lustre brillante, superficie más o menos finamente rugosa, opalescente, de consistencia mantecosa en a y b, y mantecosa quebradiza en e y d; aspecto húmedo. El medio carece de olor y su color permanece inalterado.

Licuação gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — Las características del desarrollo en los diversos medios nutritivos varían en las diversas cepas; pero, sin embargo, pueden agruparse la a y la b por una parte y la c y la d por otra. Las primeras se caracterizan por el enturbiamiento persistente del medio, mientras que en las otras dos inmediatamente después del desarrollo depositan, quedando el líquido completamente aclarado. Estas mismas cualidades presentan los cultivos de gelatina, que por haberse efectuado en estufa a 30° permitieron la deposición de los gérmenes. La cepa a es la más activa de todas y la d la menor, siendo muy poco enérgica.

En *mosto de cereales* desarrollan activamente a las 24-48 horas, en aerobiosis o anaerobiosis. En ausencia de CaCO_3 no hay formación de gases. El tiempo de conservación en este medio varía con la cepa; las cepas a, y b, viven de 4 a 8 meses, la c, 3-4 meses y la d, sólo 2-3 meses.

Las cepas a y b enturbian el medio en forma persistente, no aclarándose aún después de varias semanas, poniéndose espeso y viscoso. En la cepa a la viscosidad es tan acentuada que el medio toma consistencia verdaderamente grasosa, formando verdaderas hebras; en la cepa b nunca llega la viscosidad a este extremo.

Las cepas c y d desarrollan bien; siendo la primera mucho más activa. No hay enturbiamiento persistente del medio, sino aglutinación inmediata; sólo se observa enturbiamiento a las pocas horas de desarrollo.

En *agua de levadura* con o sin agregado de sustancias hidrocarbonadas desarrollan activamente con fuerte enturbiamiento. Los bacterios se aglutinan en las paredes del tubo y en el fondo, formando abundantes masas algodonosas, fácilmente disgregables, que ascienden al

agitar el tubo, constituidas por filamentos bacterianos entrecruzados que constituyen masas enmarañadas.

La aglutinación comienza a las 24 horas de desarrollo; depositándose en pocos días toda la masa; en las cepas c y d antes que en las otras (1).

Ni en este medio, ni en caldo, hay producción de substancias viscosas.

En *caldo ácido o alcalinizado* sin azúcares, no hay desarrollo; apenas se notó un ligero enturbiamiento casi imperceptible en la cepa b.

En *caldo ácido levulosado* desarrolla activamente, a las 24 horas. La acidez producida con 1 % de levulosa, a los 9 días fué la siguiente:

Testigo estéril	0.49 ‰ en H ₂ SO ₄
Cepa a	2.06 » » »
» b	2.06 » » »
» c	2.25 » » »
» d	2.06 » » »

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — Desarrolla a temperatura ambiente (15-20° C) y en estufa a 25°, 30°, 37° y 42° C. A temperatura ambiente el desarrollo comienza a los tres o cuatro días, siendo escaso en la cepa d. En los demás casos hay desarrollo a las 24-48 horas. La cepa d también en estos casos demora un poco más el desarrollo.

El óptimo aproximado es para a y b 37° para c y d 30°; generalizando puede considerarse la *temperatura óptima* comprendida entre 30° y 37° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Negativa. En agar de mosto de malta en anaerobiosis en tubos desarrolla bien a las 24 horas (cepa d a las 48 horas), pero no se rompe el agar, lo que indica ausencia de gases.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla bien acidificando a las 24 horas; la cepa d a las 48 horas. Reducen el tornasol enérgicamente, desde las 48 horas. Después de un mes de incubación a 30° no hubo coagulación, persistiendo en cambio la reducción del tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — Se obtuvieron los datos que

(1) La levulosa parece favorecer el desarrollo, más que la glucosa, pues el enturbiamiento que ocasiona es más espeso y más amarillento.

siguen, en la fermentación de agua de levadura con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°:

pH	Acidez producida por las diversas cepas en H_2SO_4 ‰				Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	c	d	
3,5	4,41	4,32	3,98	2,33	3,76
4,3	4,28	4,16	4,28	3,06	4,19
5	4,17	4,44	4,41	3,78	4,20
5,8	4,23	—	4,29	3,99	4,17
6,7	4,35	4,32	4,17	4,29	4,28
7,6	4,12	4,24	4,24	3,93	4,13

El desarrollo comenzó a las 24 horas en casi todas las cepas (la d a las 48 horas) y en casi todos los valores pH; en el extremo ácido (3,5) comenzó a las 48 horas. En el extremo alcalino (7,6) de la cepa d pareció dificultarse algo el desarrollo, pues ocurrió a los 3 días. El óptimo aproximado en el desarrollo pareció ser 5-6 excepto la cepa d que más bien era 6-6,7.

Del análisis de la acidez producida puede verse que en la a y la b no varía mayormente en los diversos valores pH, no así en c y d que sufren por una acidez excesiva, disminuyendo la fermentación.

Influencia del alcohol. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, al cabo de 10 días de incubación, dió los siguientes resultados:

Alcohol %	Acidez producida por las diversas cepas en H_2SO_4 ‰				Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	c	d	
0	4,23	4,23	4,29	3,99	4,18
6,33	4,17	4,35	3,51	2,33	3,59
8,53	1,87	3,31	1,23	1,77	2,05
11,85	2,82	1,59	0,98	sin desarrollo	1,79

El desarrollo comenzó a las 24 horas en 6,33 %, a las 48 horas, en 8,53 %, y a los 3-4 días en 11,85 %. La cepa d se mostró más sensible que las otras, pues no desarrolló con 11,85 % de alcohol.

De la acidez producida se deduce que resiste bastante bien 6,33 % de alcohol, sufriendo algo con 8,53 % y mucho con 11,85 % no llegando a desarrollar una cepa, la d. Estos datos son correlativos con la aparición del desarrollo. Probablemente el límite de resistencia al alcohol se encuentra alrededor de 12 %.

Influencia del SO_2 . — Los datos de la fermentación de agua de

levadura (22), con 1 % de glucosa, después de 8 días de incubación, son los que siguen:

SO ₂ ‰	Acidez producida por las diversas cepas en H ₂ SO ₄ ‰				Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	a	b	c	d	
0	3,86	3,49	4,16	—	3,84
0,098	3,37	2,75	2,81	—	2,98
0,185	3,55	2,89	2,89	—	3,11
0,294	2,69	1,47	2,51	—	2,23
0,500	1,22	1,35	1,53	—	1,37

Salta a la vista, que elevadas proporciones de SO₂, a partir de dosis aproximadas de 0,20 ‰ molestan seriamente la fermentación que se atenúa sensiblemente con elevadas cantidades.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — Se estudió la fermentación en medio líquido y en medio sólido, al mismo tiempo, con excepción de los ácidos que necesariamente tuvo que hacerse en medio líquido.

En el cuadro que sigue se resumen los resultados obtenidos, detallándose en el gráfico No 5 y cuadros No 12 al 18, inclusive, las principales fermentaciones.

Bacterium acidovorax (n. spec.). *Fermentación*

	Medio líquido (Titulación)	Medio sólido (Variación pH)
Glucosa	+	+
Levulosa	+	+
Galactosa	+	+
Lactosa	—	—
Maltosa	+	+
Sacarosa	+	+
Rafinosa	(+)	+
Xilosa	— (3)	— (1)
Arabinosa	—	—
Glicerina	(+)	— (2)
Manita	+	+
Amigdalina	+	+
Dextrina	—	—
Acido málico	+	
Acido tartárico	+	
Acido cítrico	+	

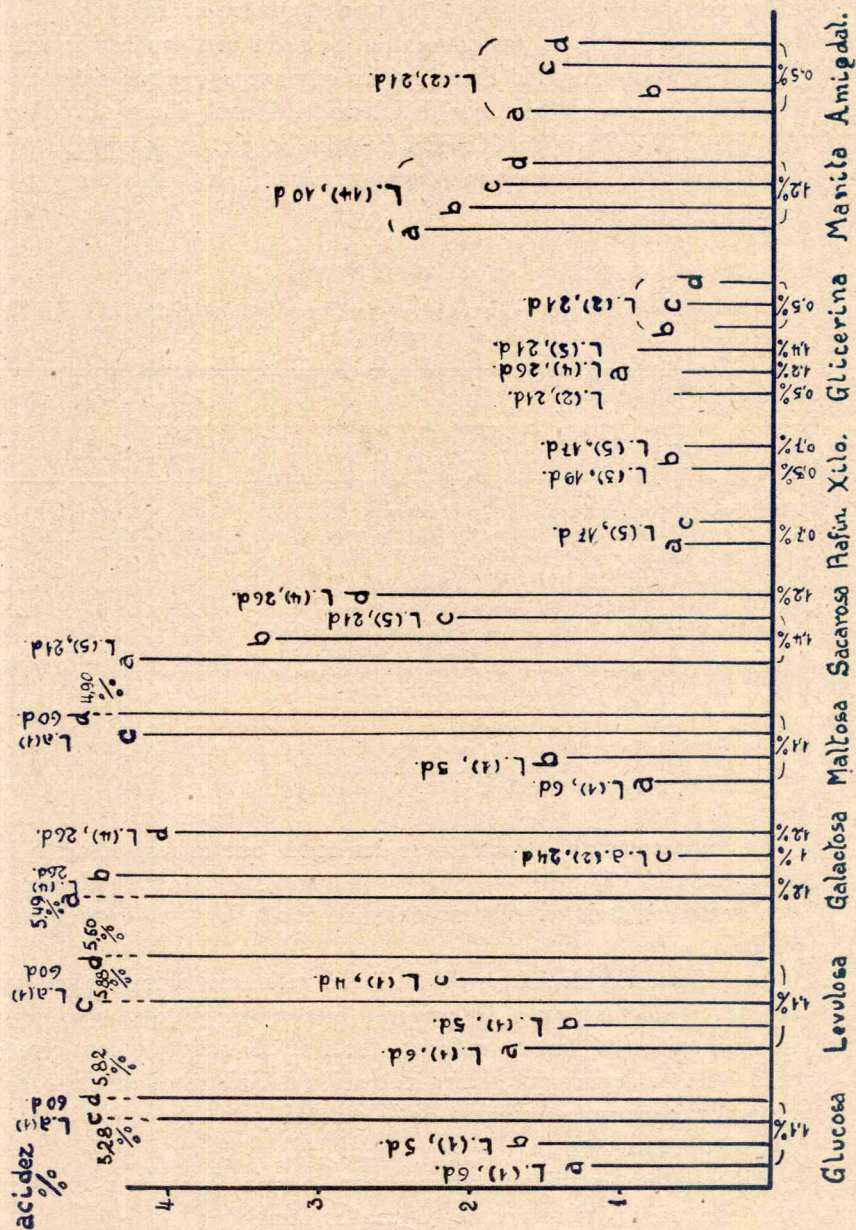
(1) La cepa b positiva.

(2) » » a positiva.

(3) » » b algo (+).

GRÁFICO N.º 5

Bacterium acidovorax. Energía fermentativa de algunas substancias atacadas.



La glucosa y la levulosa fueron fermentadas con mucha energía, como puede verse en el gráfico n° 5 y en el cuadro n° 12.

En el cuadro n° 12 los ensayos se hicieron con agua de levadura (11) de pH aproximado de 6; los azúcares se agregaron antes de la esterilización, que se hizo por tindalización a 100° durante 1/2 hora, tres días; al medio repartido en tubos con 50 c.c. se agregó 7-10 gotas de un cultivo joven de mosto de cereales, incubándose durante un mes a 30°.

CUADRO N° 12

Bacterium acidovorax — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4	Acidez volátil $\frac{0}{100}$ en ácido acét.	Acidez fija $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4
Agua lev. (11) sin azúcar, + <i>B. acidovorax</i> a	1,52	0,58	1,05
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ glucosa, + <i>B. acidovorax</i> a	9,41	0,90	8,67
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ levulosa, + <i>B. acidovorax</i> a	10,39	1,23	9,38
» » (11) sin azúcar, + <i>B. acidovorax</i> b	1,47	0,63	0,96
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ glucosa, + <i>B. acidovorax</i> b	10,14	0,96	9,36
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ levulosa, + <i>B. acidovorax</i> b	10,24	0,96	9,46
» » (11) sin azúcar, + <i>B. acidovorax</i> c	1,59	0,75	0,98
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ glucosa, + <i>B. acidovorax</i> c	8,53	0,96	7,74
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ levulosa, + <i>B. acidovorax</i> c	9,46	0,96	8,67
» » (11) sin azúcar, + <i>B. acidovorax</i> d	1,62	0,78	0,98
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ glucosa, + <i>B. acidovorax</i> d	9,11	0,93	8,35
» » (11) con 2 $\frac{0}{100}$ levulosa, + <i>B. acidovorax</i> d	10,39	0,96	9,60

De los resultados del análisis se desprende que la fermentación fué muy enérgica en todas las cepas, alcanzando la acidez total hasta 1 por ciento, es decir, el máximo obtenido con todos los bacterios ensayados.

La producción de ácidos volátiles fué casi igual a los testigos sin azúcares y sólo la cepa a dió origen a una mayor cantidad con levulosa, fué 0,65 $\frac{0}{100}$ (en a. acético), superior al testigo, y con glucosa 0,33 $\frac{0}{100}$. Se deduce que si hay formación de ácidos volátiles por *Bacterium acidovorax* a expensas de la glucosa y la levulosa, es sólo en débiles proporciones.

La galactosa también es atacada con energía. La cepa c, en el ensayo efectuado, fué menos activa que las otras.

La maltosa asimismo fué atacada con energía, más en las cepas c, y d, que en las a, y, b.

La sacarosa también fué fermentada activamente. En varios ensayos efectuados, no se obtuvo, sin embargo, fermentación, como los he-

chos con lev. aut. (2), al 1 % 24 días, con las cepas a, b, c, d, y con lev. (4), al 1,25 % 26 días, con las cepas a, b, c.

La lactosa no fué fermentada. Se hicieron ensayos con lev. (1), al 1 % 6 días, con las cepas a, b, c; con lev. (3), 1,25 % 19 días, con las cepas a, b, d; con lev. (4), al 1,25 % 26 días, cepa d; con lev. (5), 1,4 % 21 días, cepa b y con lev. aut. (1), 1 % durante 15 y 60 días, cepa c.

La rafinosa sólo fué atacada por las cepas a₂ y c. Ensayos negativos resultaron los efectuados con lev. aut. (2), al 0,6 % durante 24 días con las cepas a, b, y d; con lev. (4), 0,3 % 26 días, cepas a, b, c, d y con levadura (5), 0,7 % 17 días, cepas b, y, d. Debe asignarse, por lo tanto, sólo débil fermentación de rafinosa por *Bacterium acidovorax*, cuando se produce.

La xilosa no fué atacada por la mayoría de las cepas experimentadas. Solo la cepa b fermentó débilmente este azúcar; en las demás, en ningún ensayo se produjo fermentación.

Se investigó con lev. (1) al 0,7 % durante 6 días con las cepas a, c; con lev. (3), 0,33 % 19 días, con la cepa a; con lev. (5) 0,7 por ciento, 17 días, con las cepas a, c; y con lev. aut. (1), 0,7 % 7 días, con la cepa d.

Comportamiento análogo al medio líquido, manifestó la cepa b, pues fué la única capaz de atacar xilosa.

CUADRO N° 13

Bacterium acidovorax — Productos originados en la fermentación de glicerina

	Acidez total $\frac{\text{g}}{100}$ en H_2SO_4	Acidez volátil $\frac{\text{g}}{100}$ en ácido acét.	Acidez fija $\frac{\text{g}}{100}$ en H_2SO_4
Agua lev. (11) sin glicerina, + <i>B. acidovorax</i> a	1,52	0,58	1,05
» » (11) + 2 % glicerina, + <i>B. acidovorax</i> a	1,69	0,75	1,08
» » (18) sin glicerina, estéril	0,69	0,30	0,44
» » (18) sin glicerina, + <i>B. acidovorax</i> a	1,37	0,45	1,00
» » (18) + 1 % glicerina, + <i>B. acidovorax</i> a	1,57	0,78	0,93
» » (18) sin glicerina, + <i>B. acidovorax</i> b	1,32	0,42	0,98
» » (18) + 2 % glicerina, + <i>B. acidovorax</i> b	1,52	0,66	0,98
» » (19) sin glicerina, estéril	0,69	0,36	0,39
» » (19) sin glicerina + <i>B. acidovorax</i> b	1,22	0,42	0,88
» » (19) + 1 % glicerina + <i>B. acidovorax</i> b	1,47	0,72	0,88
» » (18) sin glicerina + <i>B. acidovorax</i> c	1,27	0,39	0,96
» » (18) + 2 % glicerina, + <i>B. acidovorax</i> c	1,47	0,66	0,93
» » (18) sin glicerina, + <i>B. acidovorax</i> d	1,32	0,48	0,93
» » (18) + 2 % glicerina, + <i>B. acidovorax</i> d	1,57	0,78	0,93

La glicerina es fermentada por todas las cepas, en mayor proporción por unas que por otras; en muchos de los ensayos hechos no hubo ataque por algunas cepas. Como consecuencia, debe considerarse que *Bacterium acidovorax* ataca débilmente la glicerina.

Los ensayos negativos se hicieron con lev. (4), 1,25 %, 26 días, con las cepas b, c, d, y con lev. (5), 1,4 %, 21 días, con las cepas b, c, d.

Los ensayos de fermentación de glicerina del cuadro N° 13 se hicieron agregando la glicerina al medio antes de la esterilización. El correspondiente al agua de levadura (11), que se hizo adicionando la glicerina y esterilizando por tindalización (tres días 1/2 hora por vez a 100°); tuvo una duración de un mes. El ensayo con agua de levadura (18) duró 24 días, y la esterilización se efectuó a 115° 1/2 hora. En cuanto al de agua de levadura (19) duró 16 días y se esterilizó a 115° durante 1/2 hora.

Como se deduce de los resultados del análisis, en todos los casos hubo débil fermentación y la producción de ácidos volátiles que es apenas algo superior al testigo, no permiten asegurar que proceda de la destrucción de la glicerina.

La manita fué atacada por todas las cepas de *Bacterium acidovorax*.

CUADRO N° 14

Bacterium acidovorax — Productos originados en la fermentación de manita

	Acidez total $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4	Acidez volátil $\frac{0}{100}$ en ácido acét.	Acidez fija $\frac{0}{100}$ en H_2SO_4
Agua lev. (21) + 1 % manita, estéril	0,88	0,24	0,69
» » (21) sin manita, + <i>B. acidovorax</i> a	1,47	0,40	1,20
» » (21) + 1 % manita, + <i>B. acidovorax</i> a	2,84	0,30	2,60
» » (21) sin manita, + <i>B. acidovorax</i> b	1,47	0,40	1,20
» » (21) + 1 % manita, + <i>B. acidovorax</i> , b	3,04	0,30	2,79
» » (21) sin manita, + <i>B. acidovorax</i> c	1,47	0,40	1,20
» » (21) + 1 % manita, + <i>B. acidovorax</i> c	2,60	0,30	2,45
» » (21) sin manita, + <i>B. acidovorax</i> d	1,47	0,45	1,16
» » (21) + 1 % manita, + <i>B. acidovorax</i> d	2,84	0,30	2,60

En el cuadro n° 14 se encuentran los productos originados en la fermentación, investigados para considerar si la presencia de esta especie bacteriana en los mostos o vinos, contribuye a aumentar los ácidos volátiles, por destrucción de la manita que otros gérmenes, como los fermentos maníticos, producen.

El ensayo se hizo con agua de levadura (21) agregando la manita

antes de la esterilización, que se efectuó a 115° durante 1/2 hora, y tuvo una duración de 17 días.

Ninguna cepa atacó la dextrina, en los ensayos efectuados correlativamente con los de manita consignados en el gráfico N° 5. Por el contrario, la amigdalina fué fermentada activamente.

CUADRO N° 15

Bacterium acidovorax — Fermentación de ácido málico

	Acidez total ‰ en H ₂ SO ₄	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H ₂ SO ₄	Acido láctico ‰
Agua lev. (7) sin ácido málico, estéril.....	1,08	0,48	0,69	—
» » (7) » » » + <i>B. acidovorax</i> , a	2,01	0,78	1,37	0,28
» » (7) » » » + <i>B. acidovorax</i> b	2,01	0,90	1,27	0,55
» » (7) » » » + <i>B. acidovorax</i> c	2,06	0,84	1,37	0,95
» » (7) » » » + <i>B. acidovorax</i> d	1,91	1,02	1,08	0,34
» » (7) + 3 ‰ ácido málico, estéril	2,89	0,66	2,35	—
» » (7) + 3 » » » + <i>B. acidovorax</i> a	2,45	1,14	1,52	1,43
» » (7) + 3 » » » + <i>B. acidovorax</i> b	2,40	1,56	1,13	1,61
» » (7) + 3 » » » + <i>B. acidovorax</i> c	2,55	1,62	1,23	1,99
» » (7) + 3 » » » + <i>B. acidovorax</i> d	2,45	1,38	1,32	0,72
» » (7) sin malato de potasio, estéril	—	0,42	—	—
» » (7) » » » + <i>B. acidovorax</i> a	—	0,75	—	—
» » (7) + 2,72 ‰, » » » + <i>B. acidovorax</i> a	—	1,26	—	—

La fermentación de ácido málico del cuadro N° 15 se hizo en la siguiente forma: El agua de levadura (7) utilizada, de pH natural 6,3-6,4 se llevó a pH 7,3 con 0,2 ‰ de NaOH (4,76 c.c. de solución normal por litro), y se dividió en dos partes.

Una de las partes se usó para la fermentación, esterilizándose, agregando luego asépticamente ácido málico, de una solución concentrada esterilizada aparte por tindalización. Se obtuvo así un pH 4,4 y una concentración de ácido de 3 ‰. La otra parte del medio alcalinizado se utilizó como testigo y se llevó a pH 4,4 con HCl al 7-8 % (12 c.c. en un litro); antes de esterilizar se tuvo la precaución de igualar la dilución del medio con la otra fracción.

La fermentación se efectuó en Erlenmeyers de 200 c.c. de capacidad, con un contenido de 130 c.c. de medio, sembrando con unas gotas de un cultivo fresco de mosto de cereales e incubando durante 43 días a 30°.

De las cifras de la acidez total se deduce que todas las cepas disminuyeron la acidez comparativamente con el medio con ácido málico es-

téril, lo que indica ataque de este ácido. La fermentación ha sido bastante intensa, pues los gérmenes desarrollándose en el medio sin ácidos duplican la acidez total con respecto al testigo estéril, como se observa en la primera parte del cuadro.

Como productos originados por el ataque del ácido málico, se constató la producción de ácidos volátiles en proporciones pequeñas, variables en las diversas cepas, que en ningún caso llegó a uno por mil. También se verificó la producción de ácido láctico en todas las cepas y en cantidades que oscilaron alrededor de uno por mil.

Para la fermentación de sales del ácido málico se utilizó una solución de ácido málico al 10 % que fué neutralizada con hidrato de potasio.

El ensayo se hizo con agua de levadura (17) repartida en tubos con 55 c.c. de líquido, agregándose el malato asépticamente después de la esterilización; los tubos contenían aproximadamente 2,72 ‰ de ácido málico neutralizado; se incubaron dos semanas.

Como determinación analítica sólo se hizo la de la acidez volátil, comprobándose que hubo ataque del ácido málico con producción de algo de acidez volátil.

CUADRO N° 16

Bacterium acidovorax — Fermentación de ácido tartárico

	Acidez total ‰ en H ₂ SO ₄	Acidez volátil ‰ en ácido acét.
Agua lev. (8) sin ácido tartárico, estéril	0,93	0,60
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> a	1,67	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> b	1,71	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> c	1,71	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> d	1,91	1,14
» » (8) con 2,5 ‰ de á. tartárico estéril	2,01	0,72
» » (8) » 2,5 » » » + <i>B. acidovorax</i> a	2,11	2,84
» » (8) » 2,5 » » » + <i>B. acidovorax</i> b	1,96	2,40
» » (8) » 2,5 » » » + <i>B. acidovorax</i> c	2,20	2,94
» » (8) » 2,5 » » » + <i>B. acidovorax</i> d	2,36	1,56

El estudio de la fermentación del ácido tartárico (cuadro 16) por *Bacterium acidovorax* se hizo en forma análoga a la fermentación de ácido málico.

Se usó agua de levadura (8) de pH 6 que se llevó a pH mayor que 7 con NaOH N/1. Una parte se usó para la fermentación, y se esterilizó en tubos con 50 c.c. de líquido; después de la misma se agregó el ácido, asépticamente, de una solución concentrada esterilizada aparte

por tindalización. Se obtuvo así un pH 5 y una concentración de ácidos de 2,5 ‰.

La otra parte se usó para testigo, llevándose a pH 5,3 con HCl al 7-8 ‰, igualándose la dilución al medio con ácidos. Después de 23 días de incubación a 30° se efectuó el análisis.

Puede verse que la acidez total después del desarrollo, fué igual o menor que el testigo. La fermentación ha sido evidente e intensa por cuanto todas las cepas desarrollándose en el agua de levadura sin ácidos, duplican aproximadamente la acidez.

Como productos de fermentación se investigaron los ácidos volátiles comprobándose su enérgica producción, que osciló entre las diversas cepas entre 0,42 y 1,74 ‰ en ácido acético.

CUADRO N° 17

Bacterium acidovorax — Fermentación de sales tartáricas

	Acidez total ‰ en H ₂ SO ₄	Acidez volátil ‰ en ácido acét.	Acidez fija ‰ en H ₂ SO ₄
Agua lev. (20) sin crémor tártaro, estéril	0,83	0,24	0,54
» » (20) » » » + <i>B. acidovorax</i> a ..	1,47	0,36	1,18
» » (20) » » » + <i>B. acidovorax</i> b ..	1,62	0,42	1,27
» » (20) » » » + <i>B. acidovorax</i> c ..	1,47	0,36	1,18
» » (20) » » » + <i>B. acidovorax</i> d ..	1,86	0,42	1,52
» » (20) + 5 ‰ crémor tártaro esteril	2,11	0,36	1,81
» » (20) + 5 » » tárt. + <i>B. acidovorax</i> a ..	2,16	0,60	1,67
» » (20) + 5 » » » + <i>B. acidovorax</i> b ..	2,52	0,72	1,98
» » (20) + 5 » » » + <i>B. acidovorax</i> c ..	2,35	0,60	1,86
» » (20) + 5 » » » + <i>B. acidovorax</i> d ..	2,60	0,66	2,06
» » (17) sin tártr. neut. potas., estéril	0,88	0,42	—
» » (17) » » » + <i>B. acidovorax</i> c ..	1,13	0,66	—
» » (17) + 1 ‰ » » » + <i>B. acidovorax</i> c ..	0,73	0,99	—

Se hicieron dos ensayos de fermentación de sales del ácido tartárico, uno con bitartrato de potasio y otro con tartrato neutro de la misma base (cuadro N° 17).

El primero se hizo con agua de levadura (20), adicionada de 5 ‰ de bitartrato de potasio antes de la esterilización que se hizo por tindalización (3 días a 100°, 1/2 hora por vez). Después de efectuada ésta, se determinó el pH, siendo igual a 4,5. El medio sin agregado de sales tenía un pH 5,9.

Se incubó a 30° durante tres semanas.

De los datos analíticos se deduce que todas las cepas aumentan la acidez al desarrollarse en agua de levadura sin bitartrato de potasio. En el medio con esta sal la acidez total es igual o algo mayor que la co-

respondiente al testigo estéril, pero nunca hay el aumento de acidez del primer caso, que a veces es más del doble. Esto indica que hubo ataque de la sal y que al destruirse el grupo ácido de la misma quedó en libertad la base que neutralizó la acidez del medio.

La determinación de la acidez volátil demuestra que si hay producción a expensas del bitartrato de k, sólo se efectúa en débiles proporciones.

La fermentación del tartrato neutro se hizo en agua de levadura (17) en igual forma que en el ensayo del malato de potasio. Se usó una concentración de sal de cerca de uno por ciento, incubándose durante dos semanas.

Como se observó en el cuadro, hubo enérgico ataque de la sal, quedando en libertad la base que hizo disminuir la acidez total del medio. De la fermentación del tártaro neutro de potasio, se produjo algo de acidez volátil.

CUADRO N° 18

Bacterium acidovorax — Fermentación de ácido cítrico

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acét.
Agua lev. (8) sin ácido cítrico, estéril	0,93	0,60
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> a	1,67	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> b	1,71	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> c	1,71	1,20
» » (8) » » » + <i>B. acidovorax</i> d	1,91	1,14
» » (8) con 2,5 ‰ á. cítrico, estéril	1,76	0,60
» » (8) » 2,5 » » + <i>B. acidovorax</i> a	2,06	2,28
» » (8) » 2,5 » » + <i>B. acidovorax</i> b	1,96	2,16
» » (8) » 2,5 » » + <i>B. acidovorax</i> c	2,11	2,46
» » (8) » 2,5 » » + <i>B. acidovorax</i> d	2,11	2,22
» » (17) sin citrato de Na, estéril	0,88	0,42
» » (17) » » » + <i>B. acidovorax</i> c	1,13	0,66
» » (17) 3,63 ‰ citrato de Na. + <i>B. acidovorax</i> c	—	2,25

El estudio de la fermentación del ácido cítrico (cuadro N° 18) se hizo simultáneamente y en las mismas condiciones que el de ácido tartárico, del cuadro N° 16, con igual duración de 23 días.

Se observa que hay enérgica producción de acidez por todas las cepas al desarrollarse en ausencia de ácido cítrico. En presencia de este ácido la acidez total producida es sólo un poco superior al testigo estéril, lo que demuestra que hubo ataque del ácido en todos los casos.

Se constató enérgica producción de ácidos volátiles por todas las cepas, análogamente a la fermentación del ácido tartárico. Las cantidades producidas oscilaron entre 0,96 y 1,26 ‰ en ácido acético.

El ensayo de fermentación del citrato de sodio se hizo conjuntamente con el de tartrato neutro de potasio, incubándose durante 2 semanas; como el citrato de sodio es una sal alcalina, no se pueden comparar los datos de la acidez total producida; pero la determinación de la acidez volátil total permitió comprobar que el citrato de sodio es destruido con producción enérgica de ácidos volátiles, que alcanzaron la proporción de 1,59 o/oo en ácido acético.

f) *Micrococcus variococcus* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER

Cepas estudiadas. Cinco:

15 ₂	=	<i>Micrococcus variococcus</i>	cepa	a
21 ₃	=	»	»	b
22 ₃	=	»	»	c
3 _z	=	»	»	d
34 _r	=	»	»	e

1. Morfología

Forma. — Se presenta como elementos esféricos desiguales de 0,8 a 1,3 μ diámetro, variando éste con las diversas cepas. Son ligeramente achatados en uno de sus diámetros, encontrándose por lo general aislados, o más bien unidos en diplococos siendo casi siempre uno de ellos más grande; se presentan así mismo en triadas o tetradas o bien en cadenitas cortas de elementos achatados, o masas irregulares constituidas por la agrupación de numerosos cocos sin orden determinado.

En los diversos medios nutritivos estudiados, presentan el mismo aspecto. En agua de levadura se pudo observar la presencia en mayor cantidad de elementos sueltos (cocos-diplococos), que en el mosto de cereales.

En general la forma diplococo es la más corriente en los diferentes medios.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. Características de cultivo

Colonias. — En agua de levadura levulosada desarrollan bien, pero más lentamente que los otros gérmenes estudiados; las colonias tardan un día más en aparecer.

Las colonias son pequeñas regularmente circulares o bien redondo-ovaladas, blanquecinas, muy elevadas en el centro y achatadas en los bordes, tomando aspecto de casquete. Superficie lisa; observadas con gran aumento, algunas presentan alrededor de la parte central, una o varias depresiones en forma de hoyo. Los bordes son lisos y la estructura interna amorfa.

Desarrollo en estria. — En agar de mosto de malta desarrolla bien a los tres días. El desarrollo, que comienza a las 48 horas, es difuso, no elevado, más o menos brillante, de superficie lisa opalescente-traslúcida, aspecto poco húmedo más bien seco, consistencia mantecosa, el medio carece de olor y su color permanece inalterado.

Licuefacción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en los diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales con carbonato de calcio o sin él, desarrollan bien, a las 48-72 horas. Se produce un enturbiamiento persistente del medio que no se aclara sino después de tres o cuatro semanas y aún más, en algunas cepas como en la a. La cepa e vuelve algo viscoso el líquido. En mosto sin CaCO_3 ninguna cepa formó gases. Se conservan vivos de 3 a 5 meses, en el medio.

En *agua de levadura* con o sin azúcares desarrolla muy bien a los dos o tres días, pero menos energicamente que los bastoncitos estudiados. Se produce enturbiamiento persistente del medio, que se aclara a medida que se depositan los gérmenes, en forma progresiva, hasta quedar completamente límpido, quedando en el fondo del tubo la masa bacteriana aglutinada. No desarrolla en caldo ácido o alcalino sin azúcares, pero si en caldo ácido levulosado a los 3-4 días; con 1 % de levulosa la acidez producida a los 9 días fué la siguiente:

Testigo estéril	...	...	...	...	0,49	0/00	en H_2SO_4
<i>Microc. multivorax</i>	a	...	...	...	0,78	»	»
»	b	...	...	...	0,98	»	»
»	c	...	...	...	0,69	»	»
»	d	...	...	...	0,78	»	»
»	e	...	...	...	0,88	»	»

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — En agar de mosto de malta en superficie, desarrollan bien a temperatura ambiente (15-20° C.) y en estufa a 25°, 30° y 37°; no desarrollan a 42° en diez días. A temperatura ambiente el desarrollo es escaso a regular, comenzando a los 2-3

días y aún a los 4 días (cepa e). A 25° y a 37° el desarrollo es regular a bueno efectuándose a las 24 horas. A 30° hay muy buen desarrollo a las 24 horas, excepto en la cepa e que, como en todos los casos, demora algo más en desarrollarse. *Temperatura óptima aproximada:* 30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Negativa. No rompen el agar de mosto de malta en tubos sembrados en anaerobiosis, pero desarrollan bien en él a los dos o tres días.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla a las 24-48 horas, acidificando lentamente; algunas cepas como la b y la e tardan 15 días en comenzar la acidificación. En general lo hacen con poca intensidad. No coagula aún después de un mes de desarrollo. No reduce el tornasol.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — Se obtuvieron los resultados que siguen, en la fermentación de agua de levadura (16) levulosa al 1 %, a los 10 días de incubación:

pH	Acidez producida por las diversas cepas en H ₂ SO ₄ ‰					Acidez promedio en H ₂ SO ₄
	a	b	c	d	e	
3,5	1,01	0,98	1,04	1,14	0,67	0,93
4,3	1,18	1,13	1,28	1,22	0,91	1,14
5	1,47	1,23	1,10	1,20	0,86	1,17
5,8	1,47	—	1,35	1,47	0,89	1,30
6,7	1,59	1,40	1,40	1,59	0,98	1,39
7,6	1,17	1,05	1,11	1,62	—	1,23

El desarrollo comenzó a los dos días, observándose que era más enérgico a pH 6. En el valor más ácido (3,5) y en el más alcalino (7,6) demoró 3-4 días en aparecer. En ciertas cepas (b y c) también en 6,7 el desarrollo apareció a los 3-4 días. La cepa e se mostró particularmente sensible, pues a las 48 horas solamente en pH 6 el desarrollo era neto.

Puede deducirse de los resultados de la fermentación y de las observaciones del desarrollo, que un pH muy bajo o muy elevado le es desfavorable. Se puede asignar, por lo tanto, un pH óptimo aproximado de 6 a 7.

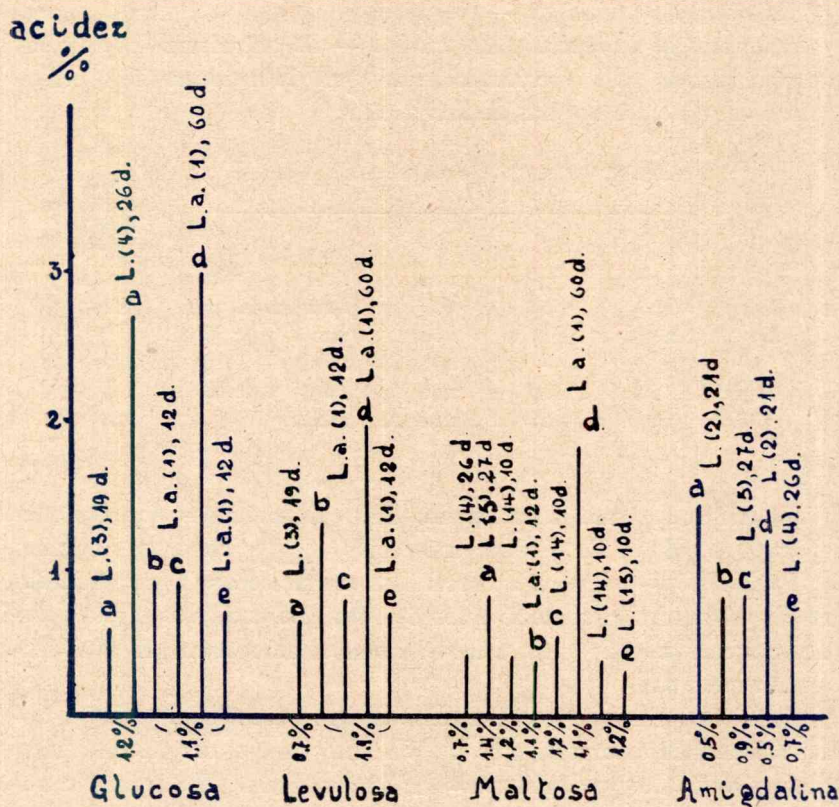
Influencia del alcohol. — La fermentación en agua de levadura (16) levulosa al 1 %, dió después de 10 días los resultados que siguen:

Alcohol ‰	Acidez producida en H_2SO_4 ‰			Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	c	d	
0	1,47	1,10	1,47	1,35
6,33	1,23	1,31	1,35	1,30
8,53	1,16	1,53	0,71	1,13
11,85	sin desarrollo	sin desarrollo	sin desarrollo	—

El desarrollo comenzó a los dos días en 6,33‰ y a los 3-4 días en 8,53 ‰. No hubo desarrollo en 11,85 ‰. Como puede verse en las cifras de la fermentación, el alcohol es perjudicial, y a grandes dosis inhibe el desarrollo.

GRÁFICO N.º 6

Micrococcus variococcus. Energía fermentativa de algunas sustancias atacadas



Influencia del SO_2 . — La fermentación en agua de levadura (22) con 1 ‰ de glucosa después de 12 días de incubación a 30° dió los siguientes resultados:

SO ₂ ‰	Acidez producida por las diversas cepas en H ₂ SO ₄ ‰					Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	a	b	c	d	e	
0	1,13	1,22	1,53	1,10	1,10	1,22
0,098	—	1,16	1,16	1,16	1,04	1,13
0,185	—	1,35	1,10	1,16	1,10	1,18
0,294	—	1,16	—	—	1,16	1,16
0,500	0,92	1,10	1,16	—	1,04	1,03

Como se ve, la fermentación en general se atenuó con elevadas cantidades de SO₂.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — En el cuadro que sigue se resumen los resultados obtenidos en la fermentación de las diversas sustancias en medio líquido, y de algunas en medio sólido y en el gráfico N° 6 y cuadros 19, 20 y 21, que continúan, se encuentra el detalle de la fermentación de sustancias en medio líquido:

Micrococcus variococcus MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Fermentación

	Medio líquido (Titulación)	Medio sólido (Variación pH)
Glucosa	+	+
Levulosa	+	+
Galactosa	—	—
Lactosa	—	—
Maltosa	(+)	(+)
Sacarosa	—	+
Rafinosa	—	
Xilosa	—	
Arabinosa	—	
Glicerina	—	
Manita	—	
Amigdalina	+	—
Dextrina	—	
Acido málico	+	
Acido tartárico	—	
Acido cítrico	—	

La glucosa y la levulosa fueron atacadas enérgicamente, como puede verse en el gráfico N° 6 y cuadro N° 19. El ensayo del cuadro número 19 se hizo con agua de levadura (12) de pH 6 adicionado de los

azúcares y esterilizados juntos por tindalización (3 días, 1/2 hora por vez a 100°); se incubó durante cuatro semanas.

Se observa que la fermentación fué enérgica por todas las cepas, siendo un poco menos intensa la c y e. La acidez volátil producida es igual a los testigos, lo que indica que no producen ácidos volátiles a expensas de esos azúcares. Se comportan, en consecuencia, diferente de los bacterios maníticos y en forma parecida a *Bacterium acidovorax*.

CUADRO N° 19

Micrococcus variococcus — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total ‰ en H ₂ SO ₄	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H ₂ SO ₄
Agua lev. (12) sin azúcares, estéril	0,66	0,48	0,27
» » (12) sin azúcares, + <i>M. variococcus</i> a	1,62	0,75	1,00
» » (12) con glucosa, + <i>M. variococcus</i> a	3,53	0,87	2,32
» » (12) con levulosa + <i>M. variococcus</i> a	3,58	0,72	2,99
» » (12) sin azúcares, + <i>M. variococcus</i> b	1,64	0,66	1,10
» » (12) con glucosa, + <i>M. variococcus</i> b	3,53	0,63	3,01
» » (12) con levulosa + <i>M. variococcus</i> b	3,77	0,75	3,16
» » (12) sin azúcares + <i>M. variococcus</i> c	1,86	0,60	1,37
» » (12) con glucosa + <i>M. variococcus</i> c	2,74	0,78	2,11
» » (12) con levulosa + <i>M. variococcus</i> c	2,94	0,66	2,40
» » (12) sin azúcares + <i>M. variococcus</i> d	2,16	0,66	1,62
» » (12) con glucosa + <i>M. variococcus</i> d	3,58	0,66	3,04
» » (12) con levulosa + <i>M. variococcus</i> d	3,72	0,66	3,18
» » (12) sin azúcares + <i>M. variococcus</i> e	1,91	0,81	1,25
» » (12) con glucosa + <i>M. variococcus</i> e	2,25	0,75	1,64
» » (12) con levulosa + <i>M. variococcus</i> e	2,65	0,78	2,01

La galactosa no fué atacada. Se hicieron ensayos con todas las cepas en lev. (2), 0,7 %, 21 días y en lev. (4), 1,25 %, 26 días; además la cepa e en lev. (5), 1,4 %, 27 días.

La lactosa tampoco fué atacada. Se ensayó en lev. (3), 1,25 %, 19 días, con las cepas a, b, c; en lev. (4), 1,25 %, 26 días con las cepas a, e y en lev. aut. (1), 1,1 %, 12 días con las cepas b, c, d, e.

La maltosa ha sido poco fermentada, como puede verse en el gráfico N° 6. Sólo la cepa d la atacó con energía; además, en numerosos ensayos permaneció inatacada. Por esto debe deducirse que cuando hay fermentación, sólo se produce con poca intensidad.

La sacarosa no fué atacada. Se investigó en lev. (2), 1,25 %, 21 días con la cepa, a, b, c; en lev. (4), 1,25 %, 26 días con todas las cepas, y en lev. (5), 1,4 %, 27 días con las cepas a, b, d, e.

También fueron negativos los ensayos hechos con rafinosa, que fueron: lev. (2), 0,4 ‰, 21 días, cepas a, b, c, d; lev. (4), 0,3 ‰, 26 días, todas las cepas; lev. (14), 0,6 ‰, 10 días, cepas a, c, d; y en lev. (15), 0,6 ‰, 10 días, cepa e.

La xilosa y la arabinosa no se atacaron. Se hicieron ensayos con lev. (2), 0,3 ‰, 21 días con todas las cepas y en lev. (4), 0,3 ‰, 26 días con las cepas a, c, d.

Tampoco la glicerina se atacó, en ensayos hechos con lev. (12), 0,5 por ciento, 21 días y con lev. (4), 1,25 ‰, 26 días. Lo mismo en cuanto a manita y dextrina ensayadas en lev. (14), 1,25 ‰, 10 días con las cepas a, b, c, d; y con lev. (15), 1,25 ‰, 10 días con la cepa e.

La amigdalina fué atacada con energía, como puede verse en el gráfico número 6.

CUADRO N° 20

Micrococcus variococcus — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (10) sin ácidos, estéril	0,83	0,54	0,39	—
» » (10) + 2,5 ‰ ácido málico, estéril	0,83	0,60	0,34	—
» » (10) + 2,5 » a. tartárico, estéril	1,08	0,60	0,58	—
» » (10) + 2,5 » á. cítrico, estéril	0,83	0,66	0,29	0,28
» » (10) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> a	2,65	0,87	1,94	3,57
» » (10) + 2,5 ‰ á. málico + <i>M. variococcus</i> a	1,76	0,87	1,05	5,28
» » (10) + 2,5 » á. tartár. + <i>M. variococcus</i> a	2,74	0,84	2,06	3,59
» » (10) + 2,5 » á. cítrico + <i>M. variococcus</i> a	2,45	0,84	1,76	2,64
» » (10) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> b	2,25	0,87	1,53	2,49
» » (10) + 2,5 ‰ á. málico + <i>M. variococcus</i> b	1,96	0,90	1,23	3,94
» » (10) + 2,5 » a. tartárico + <i>M. variococcus</i> b	2,45	0,78	1,81	—
» » (10) + 2,5 » a. cítrico + <i>M. variococcus</i> b	2,45	0,90	1,72	—
» » (10) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> d	—	0,84	—	2,74
» » (10) + 2,5 ‰ á. málico + <i>M. variococcus</i> d	—	1,02	—	3,97
» » (10) + 2,5 » a. tartárico + <i>M. variococcus</i> d	—	0,84	—	2,61
» » (10) + 2,5 » a. cítrico + <i>M. variococcus</i> d	—	0,84	—	3,05

La fermentación de ácidos del cuadro N° 20 se hizo en las mismas condiciones de la correspondiente al cuadro N° 4, es decir, con agua de levadura (10) alcalinizada y con agregado de 2,5 ‰ de ácidos y de 2 ‰ de glucosa al final de la fermentación, que duró un mes.

Para la interpretación de los resultados, analizando las cifras de la acidez total, se observa que sólo con ácido málico, en las tres cepas investigadas, la acidez fué menor que el testigo sin ácidos sembrado.

Con ácido tartárico o cítrico la acidez total fué, por el contrario, más elevada.

Como todos los testigos estériles tienen aproximadamente la misma acidez, se deduce que únicamente el ácido málico fué atacado.

Analizando los datos de la acidez volátil se observa que ninguna de las cepas originó ácidos volátiles, del ataque del ácido málico. Por el contrario, estudiando el ácido láctico formado resalta con evidencia, su elevado porcentaje; bastante superior al testigo y al correspondiente al medio con ácido tartárico o cítrico.

En estos últimos su alto contenido se debe a la fermentación de la glucosa, que, según las investigaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER se produce originando grandes cantidades de ácido láctico.

Todas las cifras de ácido láctico del cuadro N° 20 son probablemente superiores a las reales, que pueden deducirse del conocimiento de los porcentajes de diferentes productos originados en la fermentación láctica de la glucosa y del ácido málico; debe atribuirse ésto, a la concentración del medio que se produce en la fermentación en tubos abiertos, después de un mes de incubación a 30°.

La elevada cantidad de ácido láctico producido, alrededor de 1,5 por mil, indica que *Micrococcus variococcus* fermenta enérgicamente el ácido málico.

CUADRO N° 21
Micrococcus variococcus — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) + 1,96 ‰ ácido málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » á. tartárico, estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » á. cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> b	1,47	0,36	1,18	0,99
» » (15) + 1,96 ‰ á. málico + <i>M. variococ.</i> b ..	2,21	0,30	1,96	2,26
» » (15) + 1,96 » á. tartárico + <i>M. variococ.</i> b	2,65	0,42	2,30	—
» » (15) + 1,96 » á. cítrico + <i>M. variococ.</i> b.	2,65	0,36	2,35	—
» » (15) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> c	1,47	0,30	1,22	—
» » (15) + 1,96 ‰ á. málico + <i>M. variococ.</i> c ..	2,25	0,48	1,82	2,51
» » (15) + 1,96 » á. tartárico + <i>M. variococ.</i> c	2,65	0,39	2,33	—
» » (15) + 1,96 » a. cítrico + <i>M. variococ.</i> c.	2,74	0,36	2,45	—
» » (15) sin ácidos + <i>M. variococcus</i> e	0,73 ⁽¹⁾	0,33	0,47	—
» » (15) + 1,96 ‰ á. málico + <i>M. variococ.</i> e ..	2,21	0,39	1,89	—
» » (15) + 1,96 » a. tartárico + <i>M. variococ.</i> e	2,55	0,30	2,30	2,52
» » (15) + 1,96 » a. cítrico + <i>M. variococ.</i> e.	2,84	0,26	2,55	—

(1) En este cultivo había escaso desarrollo.

Los ácidos cítrico y tartárico no son, por lo tanto, atacados.

En el cuadro N° 21 se detalla la fermentación de ácidos por la cepa b, que se repitió, y los ensayos con las cepas c y e.

Estos experimentos se hicieron en igual forma y simultáneamente con los correspondientes a los cuadros N° 5, N° 7, N° 9 y N° 11, con duración de 3 semanas; se omiten, por lo tanto, los detalles.

Comparando la acidez total producida por las tres cepas en presencia de ácido málico, cítrico y tartárico, con los testigos de ácidos estériles, se observa que, mientras con el primero de esos ácidos no hubo aumento de acidez, con los otros dos fué muy enérgica. La conclusión es que sólo el ácido málico fué atacado, mientras que los otros dos permanecieron inalterados.

Como en los ensayos anteriores, no hubo formación de ácidos volátiles a expensas del ácido málico atacado, pero sí, gran producción de ácido láctico.

La conclusión general de los ensayos de fermentación de ácidos por *Micrococcus variococcus*, es que todas las cepas estudiadas fermentan enérgicamente el ácido málico con producción de elevadas cantidades de ácido láctico, sin originar acidez volátil, y que no atacan los ácidos tartárico o cítrico.

g) *Micrococcus multivorax* (N. SPEC.)

Cepas estudiadas. Dos:

30₆ = *Micrococcus multivorax* cepa a
297 = » » » b

1. Morfología

Forma. — Se presenta en forma de cocos desiguales, que tienen un diámetro que varía de 0,8 a 1,2 μ en la cepa a y de 1 a 1,5 μ en la cepa b, que se encuentran sólo o unidos de a dos o tres y aún tetradas; además, forman pequeñas cadenitas y aún agrupaciones irregulares, constituidas por numerosos elementos apretados. Los diplococos que son los más numerosos, se presentan generalmente algo achatados, siendo casi siempre uno de ellos de mayor diámetro; igualmente en las cadenitas y en las tetradas, las formas son achatadas.

En mosto de cereales se presentan en la forma descripta y lo mismo en agua de levadura. En ésta sin embargo son más corrientes las formas diplococos o bien cocos aislados, siendo más raras las cadenitas o tetradas, observándose así mismo pocas masas agrupadas.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. Características de cultivo

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosada desarrollan en forma análoga a *Micrococcus variococcus*, tardando más que los bastoncitos estudiados en alcanzar completo desarrollo.

Las colonias son pequeñas de forma redonda o redondo-ovalada bastante regular, color blanquecino, muy elevadas en el centro y achatadas en los bordes, presentando aspecto de casquete. La superficie es lisa y tiene como la otra especie de coco estudiada, algunas depresiones centrales. Los bordes son lisos y la estructura interna amorfa.

Desarrollo en estria. — En agar de mosto de malta desarrolla bien a los tres días, comenzando a las 48 horas. El desarrollo es moderado, difuso, esparcido, más o menos brillante, de superficie lisa, opalescente, aspecto poco húmedo, más bien seco, consistencia mantecosa. El medio carece de olor y su color permanece inalterado.

Licueación gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales con o sin carbonato de calcio, desarrollan bien a los dos o tres días. Por el desarrollo se produce un fuerte enturbiamiento del medio, que no se aclara sino después de tres o cuatro semanas. En mosto sin Ca no forman gases. Viven de 3 a 5 meses, en el medio.

En agua de levadura con o sin azúcares desarrollan a los dos o tres días, pero con menos energía que los bastoncitos. El aspecto del medio se presenta en forma igual a *Micrococcus variococcus*: enturbiamiento más intenso cuando hay azúcares, más con levulosa que con glucosa, y deposición de los gérmenes después de la fermentación con aclaramiento del líquido.

En caldo sin azúcar sea ácido o alcalinizado, no desarrolla. En caldo ácido con 1 % de levulosa desarrolla a los 3-4 días. La acidez producida a los 9 días de desarrollo fué la siguiente:

Testigo estéril	...	...	...	...	0,49	o/100	en	H ₂ SO ₄
<i>Microc. multivorax</i>	a	...	...	...	0,69	»	»	»
»	»	b	...	...	0,88	»	»	»

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — Sobre agar de mosto de malta en superficie, desarrollan bien a temperatura ambiente (15-20° C) y en estufa a 25°, 30° y 37°. No desarrollan a 42° en 10 días. A temperatura ambiente el desarrollo es escaso, comenzando a los 3 o 4 días; a

25° y 37° es bueno empezando a las 48 horas; a 30° es muy bueno a las 48 horas, con comienzo a las 24 horas. *Temperatura óptima aproximada*: 30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Negativa. No rompen el agar de mosto de malta sembrado en anaerobiosis, a pesar de desarrollar bien a las 24-48 horas.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrollan acidificando lentamente y con poca energía, comenzando a las 24-48 horas. No reducen el tornasol. No coagula después de un mes de desarrollo.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — Se obtuvieron los siguientes resultados en la fermentación de agua de levadura (16) levulosada al 1 %, después de 10 días de incubación a 30°.

pH	Acidez producida en H ₂ SO ₄ ‰		Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	Cepa a	Cepa b	
3,5	1,04	0,98	1,01
4,3	1,40	1,05	1,22
5	1,29	1,10	1,20
5,8	1,29	1,29	1,29
6,7	1,31	1,47	1,39
7,6	1,35	1,11	1,23

El desarrollo empezó a los dos días excepto el valor pH más ácido que en la cepa a fué a los tres días y en el más alcalino que fué a los cuatro.

Durante el mismo la energía fermentativa pareció mayor en pH 5 a 6. Los resultados de la fermentación indican una pequeña sensibilidad a la acidez.

Influencia del alcohol. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa a los 10 días de fermentación dió el siguiente resultado:

Alcohol ‰	Acidez producida en H ₂ SO ₄ ‰		Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	Cepa a	Cepa b	
0	1,29	1,29	1,29
6,33	1,23	0,92	1,07
8,53	0,43	0,58	0,50
11,85	sin desarrollo	sin desarrollo	—

El desarrollo empezó a los dos días en 6,33 ‰, y a los tres días

en 8,53; no se efectuó con 11,85. El alcohol molesta sensiblemente la fermentación; como puede verse, mientras en 6,33 % la acidez es vecina del testigo, en 8,53 se aleja bastante y en 11,85 es nula.

La sensibilidad al alcohol parece ser mayor que en *Micrococcus multivorax*.

Influencia del SO₂. — Se obtuvieron los siguientes resultados en la fermentación con agua de levadura (22) glucosada al 1 % después de 12 días de incubación:

SO ₂ ‰	Acidez producida por las dos cepas en H ₂ SO ₄ ‰		Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	a	b	
0	1,84	1,40	1,62
0,098	1,65	1,40	1,53
0,185	1,78	—	1,78
0,294	1,40	1,35	1,38
0,500	1,16	1,04	1,10

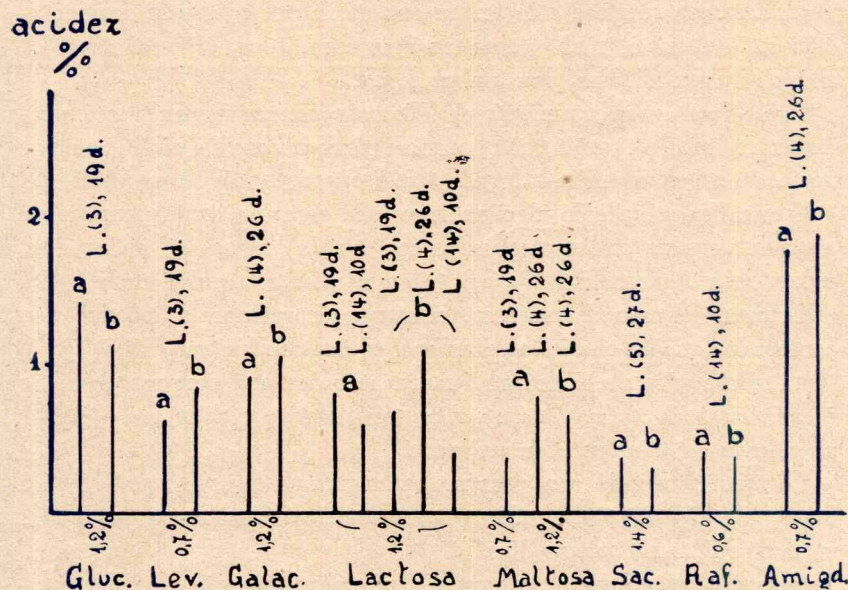
Puede observarse como con grandes cantidades de SO₂ hay bastante disminución de la fermentación.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — En el cuadro que sigue se encuentran resumidos los resultados de la fermentación en medio sólido y en medio líquido, y en el gráfico N^o 7 y cuadros N^{os} 22, 23 y 24, el detalle de la fermentación de las diversas sustancias en medio líquido.

Micrococcus multivorax (n. spec.). *Fermentación*

	Medio líquido (titulación)	Medio sólido (variación pH)
Glucosa	+	+
Levulosa	+	+
Galactosa	+	+
Lactosa	+	+
Maltosa	+	+
Sacarosa	(+)	+
Rafinosa	(+)	—
Xilosa	—	—
Arafinosa	—	—
Glicerina	—	—
Manita	—	—
Amigdalina	+	+
Dextrina	—	—
Acido málico	+	—
Acido tartárico	—	—
Acido cítrico	—	—

GRÁFICO N.º 7

Micrococcus multivorax. Energía fermentativa de algunas sustancias atacadas

Del gráfico n.º 7 y del cuadro n.º 22, se deduce que las dos cepas de *Micrococcus multivorax* investigadas fermentan enérgicamente la glucosa y la levulosa. Los ensayos del cuadro n.º 22, efectuados en igual forma y simultáneamente con los del cuadro 19, permiten observar que la fermentación de estos azúcares se efectúa sin originar ácidos volátiles, análogamente a *Micrococcus variococcus*.

CUADRO N.º 22

Micrococcus multivorax — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4
Agua lev. (12) sin azúcar, estéril	0,66	0,48	0,27
» » (12) sin azúcar + <i>M. multivorax</i> a	1,58	0,51	1,15
» » (12) con glucosa + <i>M. multivorax</i> a	3,92	0,60	3,43
» » (12) con levulosa + <i>M. multivorax</i> a	3,82	0,63	3,31
» » (12) sin azúcar + <i>M. multivorax</i> b	1,54	0,66	1,00
» » (12) con glucosa + <i>M. multivorax</i> b	3,63	0,72	3,04
» » (12) con levulosa + <i>M. multivorax</i> b	3,43	0,78	2,79

La galactosa también fué atacada por las dos cepas con regular energía; lo mismo en cuanto a lactosa. Con menor intensidad fué atacada la maltosa.

La sacarosa se atacó sólo en un ensayo. No se consiguió fermentación en lev. (2) al 1,25 %, en 21 días con la cepa a; y en lev. (4), al 1,25 % en 26 días, con ambas cepas.

Coincide el comportamiento de *Micrococcus multivorax* frente a sacarosa en medio líquido, con lo que ocurre en medio sólido, en que tampoco la fermentación es segura, pues unas veces se produce y otras no.

Con rafinosa sucedió algo análogo a la sacarosa, en un ensayo fué atacada, pero no en los efectuados con lev. (2), al 0,4 % en 21 días, con la cepa a y con lev. (4), 0,3 % en 26 días con ambas cepas.

Como en el caso de sacarosa, el ataque de rafinosa se produce, en consecuencia, sólo en ciertas ocasiones y con débil intensidad.

La xilosa y la arabinosa no fueron atacadas por ninguna cepa. Se ensayó en lev. (2), 0,3 %, 21 días, con la cepa a y en lev. (4), 0,3 por ciento, 26 días con ambas cepas.

Lo mismo ocurrió con glicerina, ensayada en lev. (4), 1,25 %, 26 días y lev. (5), 1,4 %, 27 días; y con manita y dextrina, investigadas en lev. (14), 1,25 %, 10 días.

La amigdalina, por el contrario, fué enérgicamente atacada, comportándose esta especie como *Micrococcus variococcus*.

CUADRO N° 23

Micrococcus multivorax — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (10) sin ácidos, estéril	0,83	0,54	0,39	—
» » (10) + 2,5 ‰ ácido málico, estéril	0,83	0,60	0,34	—
» » (10) + 2,5 » ácido tartárico, estéril	1,08	0,60	0,58	—
» » (10) + 2,5 » ácido cítrico estéril	0,83	0,60	0,29	0,28
» » (10) sin ácidos + <i>M. multivorax</i> a	2,16	0,90	1,42	1,46
» » (10) + 2,5 ‰ á. málico + <i>M. multivorax</i> a	1,76	0,84	1,08	4,01
» » (10) + 2,5 » á. tartárico + <i>M. multivor.</i> a	2,50	0,84	1,81	2,57
» » (10) + 2,5 » á. cítrico + <i>M. multivorax</i> a	2,30	0,78	1,67	2,57
» » (10) sin ácidos + <i>M. multivorax</i> b	2,45	0,84	1,76	0,94
» » (10) + 2,5 ‰ á. málico + <i>M. multivorax</i> b	1,57	0,84	0,88	2,78
» » (10) + 2,5 » á. tartárico + <i>M. multivorax</i> b	2,16	0,96	1,37	2,10
» » (10) + 2,5 » á. cítrico + <i>M. multivorax</i> b	2,35	0,84	1,67	2,22

La fermentación de ácidos del cuadro 23 se hizo en las mismas condiciones que el cuadro n° 20, con igual agregado de 2 % de glucosa al final del ensayo y con duración de un mes.

La acidez total producida por las dos cepas, en presencia de ácido málico, fué mucho menor que el correspondiente testigo estéril; lo contrario ocurrió en presencia de ácido cítrico y tartárico en que la acidez fué mayor o igual al testigo. Se deduce que sólo en el primer caso hubo ataque del ácido, permaneciendo el cítrico y el tartárico inalterados.

Analizando las cifras de ácidos volátiles, se ve que estos no se originan a expensas del ácido málico destruido. En cambio es evidente la producción de ácido láctico en abundantes cantidades.

Las cifras de ácido láctico de los ensayos de los otros ácidos, comparadas con las de los testigos sin ácidos, parecerían indicar la existencia de fermentación; puede atribuirse sin embargo el bajo porcentaje de los testigos a falta de ataque de la glucosa presente, a expensas de la cual se produce.

En el cuadro n° 24 se encuentran los resultados del ensayo, que se repitió.

CUADRO N° 24

Micrococcus multivorax — Fermentación de ácidos

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) » » + <i>M. multivorax</i> b	1,47	0,36	1,18	1,35
» » (15) + 1,96 ‰ ácido málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » á. málico + <i>M. multivorax</i> b	2,25	0,39	1,90	2,40
» » (15) + 1,96 ‰ ácido tartárico, estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » á. tartárico + <i>M. multivor.</i> b	2,60	0,30	2,35	—
» » (15) + 1,96 ‰ ácido cítrico, estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) + 1,96 » á. cítrico + <i>M. multivorax</i> b	2,84	0,48	2,45	—

La fermentación del cuadro n° 24 se hizo simultáneamente con la del cuadro n° 21 y en las mismas condiciones, con una duración de tres semanas.

Se observa que sólo en el caso de ácido málico la acidez total producida por el desarrollo del germen, fué igual al testigo; en presencia de ácido tartárico o cítrico fué muy superior. Esto demuestra que el ácido málico es atacado mientras que el tartárico y el cítrico permanecen inalterados.

La fermentación del ácido málico, es enérgica, y se produce dando lugar a la formación de regular cantidad de ácido láctico (aproximadamente 1 0/00), sin originarse ácidos volátiles.

h) *Bacterium rectiforme* (N. SPEC.)

Cepas estudiadas. Dos:

30₃ = *Bacterium rectiforme* cepa a

20₉ = " " " b

1. *Morfología*

Forma. — Se presenta en forma de bastoncitos finos, alargados, de 0,4-0,6 μ de ancho por 2 a 7 μ de largo, aislados o unidos de a dos o tres, de bordes rectos y extremidades apenas redondeadas. Por su forma, característica entre los bacterios de los vinos, se lo designó *Bacterium rectiforme*.

En mosto de cereales con o sin CaCO_3 se presenta igualmente en forma de bastoncitos rectos sin agruparse en cadenas. En agua de levaduras con o sin azúcares también se observan bastoncitos rectilíneos que se agrupan de a tres o cuatro, pero sin formar cadenas; excepcionalmente se presentan bastoncitos muy alargados sin tabiques, pero que no constituyen verdaderos filamentos.

Las dos cepas (a, b) estudiadas en esta especie presentan caracteres morfológicos exactamente iguales.

Movilidad. — Inmóvil.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. *Características de cultivo*

Colonias. — En superficie de agar de agua de levadura levulosada al 1 % desarrolla abundantemente en dos días. Forma colonias grandes, las más grandes de los gémenes estudiados, de color amarillento; forma redondeada, bien regulares, superficie lisa o casi lisa y homogéneamente elevadas en toda la extensión, bordes lisos, estructura interna amorfa o muy finamente granulosa.

Desarrollo en estría. — En agar de mosto de malta desarrollan activamente, comenzando a las 24 horas. El desarrollo es difuso, con colonias separadas, no elevado, de lustre brillante, superficie lisa, opalescente, de consistencia mantecosa-acuosa, aspecto húmedo. El medio carece de olor extraño y su color permanece inalterado.

Licueción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales

con o sin CaCO_3 en aerobiosis o anaerobiosis, desarrolla abundantemente a las 24-48 horas, con enturbiamiento persistente del medio; sólo después de cuatro o cinco semanas se aclara. La cepa a vive de 4 a 8 meses en el medio y la b, alrededor de 3 meses.

En ausencia de CaCO_3 no se observa formación de gases, no levantándose el tapón de vaselina-parafina.

En *agua de levadura* con o sin agregado de hidratos de carbono, desarrolla bien, produciendo un enturbiamiento espeso e inmediatamente se aglutinan por las paredes o en el fondo del tubo, fenómeno que se observa ya a las 24 horas.

Después de varios días la masa bacteriana deposita totalmente y el medio se aclara, quedando en el fondo los copos algodonosos, análogos a *Bacterium acidovorax*, pero menos abundantes. Por agitación o rotación del tubo suben en el líquido nubes espesas constituidas por bacterios aglutinados.

La levulosa parece favorecer más el desarrollo, análogamente a lo que ocurre en los otros gérmenes, pues el enturbiamiento es más enérgico, de color más amarillento y más espeso que con glucosa u otros azúcares.

En *caldo ácido o alcalino* sin azúcares desarrollan escasamente a las 24 horas. En caldo ácido levulosado desarrollan perfectamente a las 24 horas; con 1 % de levulosa, la acidez total del medio después de 9 días de incubación fué:

Testigo estéril.....	0,49	‰	en H_2SO_4
<i>Bact. rectiforme</i> a.....	1,47	»	»
» » b.....	1,18	»	»

De las dos cepas estudiadas, la a se mostró más enérgica en los diversos medios ensayados.

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — Sobre agar de mosto de malta desarrolla a temperatura ambiente (15° - 20° C.) y en estufa a 25° , 30° , 37° y 42° . A temperatura ambiente desarrolla a los 2-3 días, en los demás casos a las 24 horas. El desarrollo a 42° es regular. *Temperatura óptima aproximada:* 30° - 37° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Negativa.

En agar de mosto de malta en tubos, en anaerobiosis, desarrolla activamente a las 24 horas sin romper el agar, por cuanto no forman gases.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla bien acidificando a las 24 horas de la siembra, con aumento progresivo. Después de una semana reduce el tornasol; al cabo de un mes la reducción del tornasol es muy intensa.

Coagula a los 15 días de desarrollo, formando un coágulo de regular consistencia, que no se redisuelve después de un mes.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — La fermentación en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°, dió el siguiente resultado:

pH	Acidez producida por cada cepa en H_2SO_4 ‰		Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	
3,5	2,21	2,15	2,18
4,3	2,82	2,76	2,79
5	—	—	—
5,8	3,88	3,13	3,50
6,7	3,67	3,86	3,76
7,6	3,99	3,68	3,83

El desarrollo comenzó a las 24 horas excepto en 3,5 que fué a las 48 horas. El pH. óptimo durante el desarrollo pareció oscilar entre 4,5 y 6,5.

Analizando las cifras de la acidez, se observa que esta aumenta con el pH. hasta aproximadamente el punto neutro, en que se estabiliza, habiendo bastante correlación. Hay más sensibilidad a la acidez que en *Bacterium acidovorax*. El pH. óptimo, difícil de precisar, se encuentra entre 4,5 y 6,5, aproximadamente.

Influencia del alcohol. — Se obtuvieron los siguientes resultados en la fermentación de agua de levadura (16), con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30°:

Alcohol ‰	Acidez producida por cada cepa en H_2SO_4 ‰		Acidez promedio en H_2SO_4 ‰
	a	b	
0	2,88	3,13	3
6,33	2,64	2,70	2,67
8,53	1,95	1,83	1,89
11,85	0,74	1,80	1,27

El desarrollo comenzó a las 24-48 horas con 6,33 % de alcohol, a las 48 horas con 8,53 % y a los 4 días con 11,85 %.

Como puede verse en el cuadro, la acidez producida disminuye sen-

siblemente con la alcoholización, siendo en 6,33 ‰, bastante vecina del testigo, lo que indican que resisten bastante bien ese porcentaje de alcohol, corroborado con la anterior observación de su primer comienzo de desarrollo: aumentando el alcohol demora la aparición del desarrollo.

Influencia del SO₂. — La fermentación en agua de levadura (22), con 1 ‰ de glucosa, después de 8 días de incubación, dió los siguientes resultados:

SO ₂ ‰	Acidez producida por cada cepa en H ₂ SO ₄ ‰		Acidez promedio en H ₂ SO ₄ ‰
	a	b	
0	3,61	3,55	3,58
0,098	3,25	3,12	3,19
0,185	3,25	3,12	3,19
0,294	2,89	3	2,95
0,500	1,59	1,40	1,50

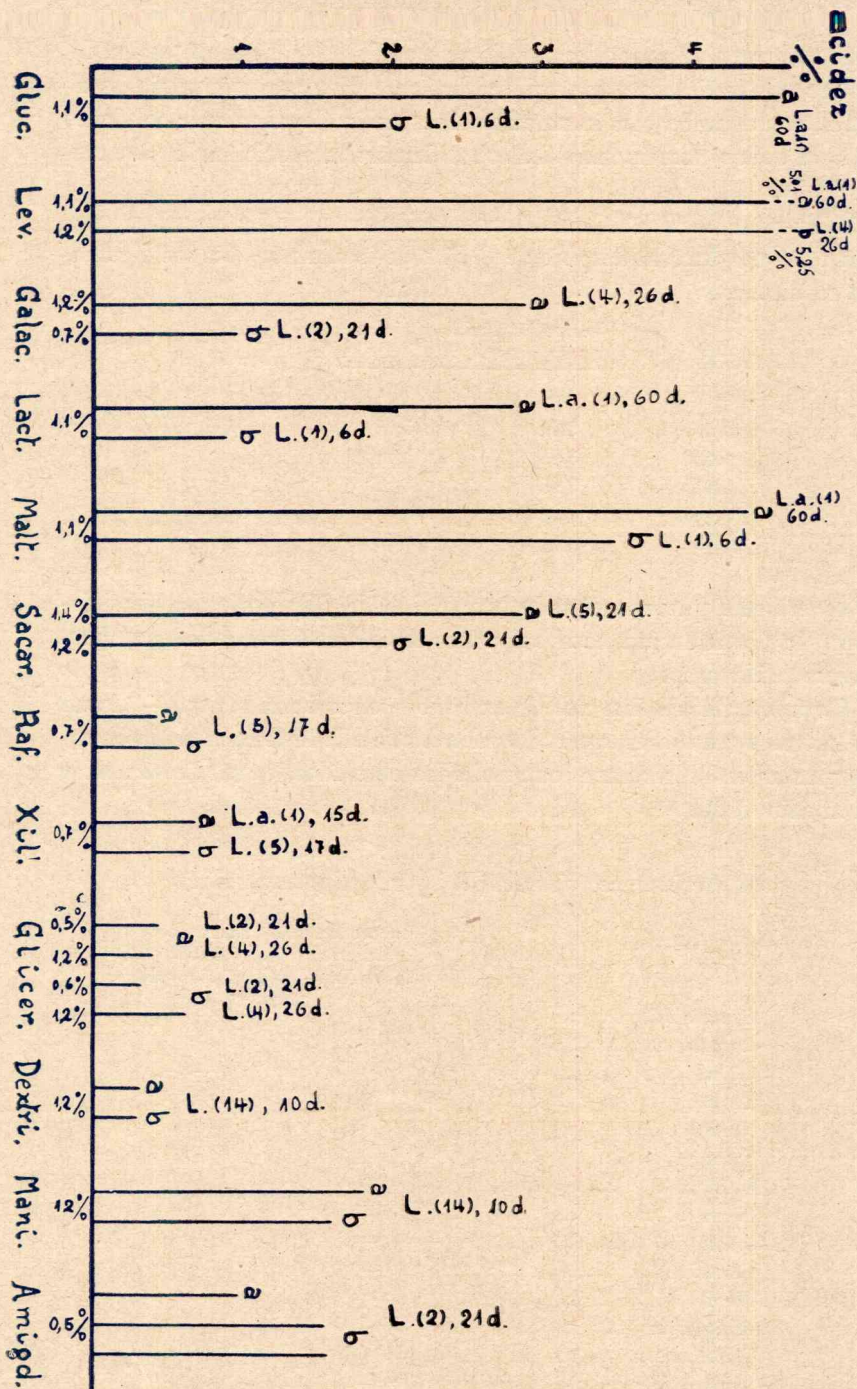
Es evidente que una elevada proporción de SO₂ perjudica sensiblemente la fermentación, comportándose en esto en forma análoga a *Bacterium acidovorax*.

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — Como en los casos anteriores, antes de tratar en detalle la fermentación de cada sustancia, se resumen los resultados obtenidos, en medio líquido y en medio sólido.

Bacterium rectiforme (n. spec.). *Fermentación.*

	En medio líquido (Titulación)	En medio sólido (Variación pH)
Glucosa	+	+
Levulosa	+	+
Galactosa	+	+
Lactosa	+	+
Maltosa	+	+
Sacarosa	+	+
Rafinosa	(+)	+
Xilosa	(+)	(+)
Arabinosa	—	—
Glicerina	(+)	+
Manita	+	+
Amigdalina	+	+
Dextrina	(+)	+
Acido málico	+	
Acido tartárico	—	
Acido cítrico	—	

Bacterium rectiforme. Energía fermentativa de algunas sustancias atacadas



Como se deduce del gráfico N° 8 y del cuadro N° 25, *Bacterium rectiforme* fermenta energicamente la glucosa y la levulosa.

El ensayo del cuadro N° 25 se efectuó conjuntamente con el del cuadro N° 12 y en las mismas condiciones, durando un mes. Como se observa, el ataque fué muy intenso, pero no se produce acidez volátil en cantidad muy elevada con respecto al testigo.

CUADRO N° 25

Bacterium rectiforme — Productos originados en la fermentación de glucosa y levulosa

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4
Agua lev. (11) sin azúcar + <i>B. rectiforme</i> a	1,40	0,66	0,86
» » (11) + 2 % glucosa + <i>B. rectiforme</i> a	6,57	0,78	5,93
» » (11) + 2 % levulosa + <i>B. rectiforme</i> a	6,86	0,75	6,25
» » (11) sin azúcar + <i>B. rectiforme</i> b	1,47	0,50	1,06
» » (11) + 2 % glucosa + <i>B. rectiforme</i> b	6,37	0,84	5,68
» » (11) + 2 % levulosa + <i>B. rectiforme</i> b	6,27	0,78	5,63

También en la galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa son fermentadas con energía.

La rafinosa sólo fué fermentada en un caso y en forma débil; no debe, por lo tanto, darse seguridad de su ataque por *Bacterium rectiforme*. Resultados negativos se obtuvieron con lev. (4), 0,3 %, 26 días con ambas cepas y con lev. (2), 0,4 %, 21 días con la cepa b.

Con xilosa se obtuvieron resultados análogos; sólo en un caso hubo fermentación en medio líquido, habiendo sido negativos los ensayos hechos en lev. (3), 0,3 %, 19 días, con ambas cepas; en lev. (5) 0,7 %, 17 días, cepa a y lev. (1), 0,7 %, 6 días cepa b.

La arabinosa no fué atacada por ninguna cepa. Se ensayó en lev. aut. (1), 0,75 %, 5 días, con la cepa a; lev. (3), 0,33 %, 19 días con ambas cepas; lev. (4), 0,3 %, 26 días, cepa a y lev. (1), 0,7 %, 6 días, con la cepa b.

La glicerina fué atacada a veces en medio líquido, pero con débil intensidad, como puede verse en el gráfico n° 8. Probablemente el ataque de esta substancia en medio líquido es difícil; en medio sólido, en todos los casos estudiados hubo fermentación.

En el cuadro n° 26 se encuentran los resultados de dos ensayos, efectuados para investigar si había producción de ácidos volátiles a expensas de la glicerina.

CUADRO N° 26

Bacterium rectiforme — Productos originados en la fermentación de glicerina

	Acidez total o/100 en H ₂ SO ₄	Acidez volátil o/100 en ácido acético	Acidez fija o/100 en H ₂ SO ₄
Agua lev. (11) sin glicerina + <i>B. rectiforme</i> a	1,40	0,66	0,86
» » (11) + 2 % glicerina + <i>B. rectiforme</i> a	1,86	0,90	1,13
» » (11) sin glicerina + <i>B. rectiforme</i> b	1,47	0,50	1,06
» » (11) + 2 % glicerina + <i>B. rectiforme</i> b	1,89	0,81	1,22
» » (19) sin glicerina, estéril	0,69	0,36	0,39
» » (19) sin glicerina + <i>B. rectiforme</i> a	1,32	0,42	0,98
» » (19) + 1 % glicerina + <i>B. rectiforme</i> b	1,47	0,54	1,03
» » (19) sin glicerina + <i>B. rectiforme</i> b	1,27	0,48	0,88
» » (19) + 1 % glicerina + <i>B. rectiforme</i> b	1,47	0,66	0,93

El ensayo con agua de levadura (11) se hizo conjuntamente con el mencionado en el cuadro n° 13, con duración de un mes. Se observa que la fermentación fué poco enérgica, produciéndose algo de acidez volátil, pero en muy débil proporción.

El ensayo con agua de levadura (19) se hizo también simultáneamente con el del cuadro n° 13, incubándose 16 días. También en este caso la fermentación fué muy débil, más que en el ensayo anterior siendo la acidez volátil casi igual al testigo.

Únicamente con un poco de reserva, puede decirse que *Bacterium rectiforme* produce algo de acidez volátil a espensas de la glicerina.

La manita es fermentada por ambas cepas con producción regular de acidez, lo mismo que la amigdalina.

CUADRO N° 27

Bacterium rectiforme — Productos originados en la fermentación de manita

	Acidez total o/100 en H ₂ SO ₄	Acidez volátil o/100 en ácido acético	Acidez fija o/100 en H ₂ SO ₄
Agua lev. (21) + 1 % manita, estéril	0,88	0,24	0,69
» » (21) sin manita + <i>B. rectiforme</i> a	1,47	0,48	1,08
» » (21) + 1 % manita + <i>B. rectiforme</i> a	2,74	0,30	2,50
» » (21) sin manita + <i>B. rectiforme</i> b	1,23	0,40	0,91
» » (21) + 1 % manita + <i>B. rectiforme</i> b	2,60	0,30	2,45

En el cuadro n° 27 se exponen los resultados de la fermentación de manita, efectuada simultáneamente con la del cuadro n° 14 y con los

mismos propósitos. La duración fué de 17 días. Como se observa, la manita fué atacada con bastante intensidad, pero no se originaron ácidos volátiles.

En cuanto a la dextrina, la acidez producida no autoriza a decir que hubo fermentación; sin embargo, la fermentación en medio sólido fué neta. Se trata, probablemente, de un caso análogo al de la glicerina.

CUADRO N° 28

Bacterium rectiforme — Fermentación de ácido málico

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (7) sin a. málico, estéril	1,08	0,48	0,69	—
» » (7) » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,01	0,78	1,37	0,50
» » (7) » » + <i>B. rectiforme</i> b	2,01	0,84	1,32	0,50
» » (7) + 3 ‰ á. málico, estéril	2,89	0,66	2,35	—
» » (7) + 3 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,50	1,80	1,03	0,77
» » (7) + 3 » » + <i>B. rectiforme</i> b	2,50	0,84	1,81	1,70

La fermentación de ácido málico del cuadro n° 28 se hizo simultáneamente con la del cuadro n° 15, en las mismas condiciones, con una incubación de 43 días.

Por el desarrollo de ambas cepas en presencia de ácido málico, la acidez total disminuyó con respecto al testigo, lo que indica que hubo fermentación.

El ataque del ácido málico se produjo originando acidez volátil elevada y poco ácido láctico en la cepa a, y por el contrario sólo elevada cantidad de ácido láctico en la cepa b.

CUADRO N° 29

Bacterium rectiforme — Fermentación de ácido tartárico y ácido cítrico

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil total ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4
Agua lev. (8) sin ácidos, estéril	0,93	0,60	0,44
» » (8) » » + <i>B. rectiforme</i> a	1,76	1,08	0,88
» » (8) » » + <i>B. rectiforme</i> b	1,71	0,72	1,13
» » (8) + 2,05 ‰ á. tartárico, estéril	2,01	0,72	1,42
» » (8) + 2,5 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,60	0,99	1,79
» » (8) + 2,5 » » + <i>B. rectiforme</i> b	2,16	0,72	1,58
» » (8) + 2,5 ‰ a. cítrico, estéril	1,76	0,60	1,27
» » (8) + 2,5 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,60	0,84	1,91
» » (8) + 2,5 » » + <i>B. rectiforme</i> b	2,65	0,78	2,01

Los ensayos del cuadro n° 29 se hicieron en idénticas condiciones a los del cuadro n° 16 y n° 18, con duración de 23 días.

La acidez total producida por el desarrollo de las dos cepas en presencia de ácido tartárico o cítrico, fué superior a los respectivos testigos estériles, y en proporción aproximada al aumento de acidez que causan desarrollándose en el medio sin ácidos (ver primera parte del cuadro).

En ningún caso hubo fermentación de los ácidos.

CUADRO N° 30

Bacterium rectiforme — Fermentación de ácido málico, tartárico y cítrico

	Acidez total ‰ en H_2SO_4	Acidez volátil ‰ en ácido acético	Acidez fija ‰ en H_2SO_4	Acido láctico ‰
Agua lev. (15) sin ácidos, estéril	0,59	0,45	0,22	0,14
» » (15) » » + <i>B. rectiforme</i> a	1,57	0,93	0,81	0,61
» » (15) + 1,96 ‰ á. málico, estéril	2,25	0,39	1,94	0,26
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,20	1,17	1,25	0,94
» » (15) + 1,96 + ‰ á. tartárico estéril	1,96	0,60	1,47	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,69	0,93	1,89	—
» » (15) + 1,96 ‰ á. cítrico estéril	1,91	0,66	1,37	—
» » (15) + 1,96 » » + <i>B. rectiforme</i> a	2,79	0,99	1,98	—

Las experiencias del cuadro n° 30 son confirmatorias de los ensayos de fermentación de ácidos, anteriores. Se hicieron en igual forma y condiciones que las correspondientes al cuadro n° 5, incubándose durante 3 semanas.

De las cifras de acidez total se deduce que el germen atacó el ácido málico, pero no obró sobre los ácidos tartárico y cítrico. De la fermentación del ácido málico se produjo muy poca acidez volátil y poco ácido láctico.

i) *Bacterium spec.* OTRA FORMA ENCONTRADA EN LOS VINOS ARGENTINOS

Además de los bastoncitos o cocos estudiados, he aislado de un vino criollo sanjuanino alterado, por cultivo previo de enriquecimiento, un bastoncito, que estudiado en cultivo puro, resultó tener algunas características semejantes a los gérmenes de las alteraciones, pero por otra parte, presenta ciertas propiedades, como la de no resistir concentraciones de iones H mucho menores a las corrientes en mostos o vinos,

que lo alejan de esos tipos de microorganismos. Probablemente se trata de un microbio accidental que tiene su «habitat» en un medio que entra en contacto con el mosto o el vino durante su manejo, o que tal vez se desarrolla en éstos, merced a alguna simbiosis o condiciones que crean otros gérmenes.

Como en un vino de Jujuy, encontré un bacterio parecido a éste, creo conveniente resumir las principales características que he estudiado, sin identificarlo dándole nombre.

1. Morfología

Forma. — Se presenta en bastoncitos gruesos, alargados, de 0,8 a 1 μ de ancho por 1,5-4 μ de largo, aislados o unidos de a dos o tres en línea recta, con separación neta y espaciada y extremos ligeramente redondeados.

En otros medios nutritivos tiene igual aspecto. En agua de levadura presenta, además de los bastoncitos gruesos unidos de a dos o tres, otros alargados, semejantes a gruesos filamentos no tabicados.

Movilidad. — Negativa.

Esporulación. — Negativa.

Coloración de Gram. — Gram positivo.

2. Características de cultivo

Colonias. — Sobre agar de agua de levadura levulosa desarrolla bien a los 2 días, si se ha efectuado la siembra con un cultivo joven de mosto de cereales, en caso contrario desarrolla poco. Las colonias formadas son de tipo análogo a *Bacterium rectiforme*, pero algo más pequeñas y de color menos amarillento.

Desarrollo en estría. — Desarrolla abundantemente en dos días. El desarrollo es difuso, con colonias separadas, esparcido, de lustre brillante, superficie lisa, opalescente, de consistencia mantecosa-acuosa, aspecto húmedo, el medio carece de olor y el color permanece inalterado.

Licuefacción gelatina. — Negativa.

Desarrollo en diversos medios nutritivos. — En mosto de cereales desarrolla bien a las 24-48 horas, enturbando el medio, que se aclara después de dos o tres semanas. En mosto sin CaCO_3 no forma gases. Se conserva vivo, en el medio, de 4 a 6 meses.

En agua de levadura con o sin hidratos de carbonos desarrolla, pero con poca energía. A veces, aún en presencia de azúcares no desa-

rolla. En caso positivo comienza el desarrollo a las 24-48 horas, más intensamente con levulosa que con glucosa. Después del desarrollo los gérmenes se aglutinan depositándose con formación pequeñas masas floculosas, que nunca tienen el volumen de las otras especies estudiadas.

En *caldo* alcalinizado sin azúcar no desarrolla. En *caldo* ácido con azúcar desarrolla apenas un poco. En *caldo* ácido levulosado desarrolla bien a las 24 horas; con 1 % de levulosa produjo a los 9 días la siguiente acidez:

Testigo estéril	0,49 ‰ en H ₂ SO ₄
Con el bacterio	0,69 » » »

3. Fisiología

Relaciones de temperatura. — En agar de mosto de malta en superficie desarrolla a 25°, 30° y 37°; no desarrolla a temperatura ambiente (15°-20° C.) ni en estufa a 42°, en una semana. A 25° y 37° el desarrollo es escaso produciéndose a los tres días. A 30° desarrolla bien, comenzando a las 48 horas. *Temperatura óptima aproximada:* 30° C.

Relación con el oxígeno. — Anaerobio facultativo.

Formación de gases. — Negativa.

Prueba de la catalasa. — Negativa.

Cultivo en leche. — Desarrolla a las 48 horas acidificando. Reduce el tornasol progresivamente, a los 10 días la reducción es enérgica. No coagula después de un mes, pero persiste la reducción.

Hidrólisis del almidón. — Negativa.

Influencia de la reacción del medio. — En agua de levadura (16) con 1 % de levulosa, después de 10 días de incubación a 30° se obtuvieron los siguientes resultados de fermentación:

pH.....	3,5	4,3	5	5,8	6,7	7,6
Acidez producida en H ₂ SO ₄ ‰	0	0	0,86	1,35	1,59	1,60

Como se ve, es muy sensible a la acidez, no desarrollando a pH 3,5 y 4,3; en los demás valores estudiados el desarrollo comenzó a las 48 horas, excepto en pH 5 que fué a los tres días. El óptimo puede considerarse aproximadamente alrededor del punto neutro.

Influencia del alcohol. — Análogamente al pH se mostró muy sensible al alcohol; en agua de levadura (16) con 1 % de levulosa no desarrolló con 8,53 y 11,85 % de alcohol agregado. Con 6,33 %

desarrolló a las 48 horas, siendo la acidez producida bastante inferior al testigo (0,87 y 1,35 o/oo en H_2SO_4 , respectivamente).

Fermentación de hidratos de carbono y otras sustancias. — Como en medio líquido el desarrollo era poco intenso y a veces no se producía, se estudió la fermentación casi exclusivamente en medio sólido, exceptuada la de ácidos que se hizo necesariamente en medio líquido, agregándose en forma de sales, pues la acidez elevada impedía el desarrollo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Bacterium spec. Fermentación

Glucosa	+	Arabinosa	—
Levulosa	+	Glicerina	+
Galactosa	+	Manita	+
Lactosa	—	Amigdalina	—
Maltosa	+	Dextrina	+
Sacarosa	+	Acido málico	—
Rafinosa	+	Acido tartárico	—
Xilosa	+	Acido cítrico	—

En el cuadro nº 31 se consignan los productos originados en la fermentación de glucosa, levulosa, manita y sales de los ácidos málico, tartárico y cítrico.

CUADRO Nº 31

	Acidez total o/oo en H_2SO_4	Acidez volátil o/oo en ácido acético	Acidez fija o/oo en H_2SO_4
Agua lev. (11) sin azúcar a 30 días de la siembra	1,45	0,60	0,96
» » (11) con 2 % glucosa, a 30 días de la siembra	2,94	0,66	2,40
» » (11) con 2 % levulosa, a 30 días de la siembra	2,16	0,48	1,76
» » (11) con 2 % glicerina, a 30 días de la siembra	1,52	0,78	0,88
» » (18) sin glicerina, estéril	0,69	0,30	0,44
» » (18) sin glicerina, a 24 días de la siembra	1,47	0,45	1,10
» » (18) con 1 % glicerina, a 24 días de la siembra	2,84	0,96	2,06
» » (21) con 1 % manita, estéril	0,88	0,24	0,69
» » (21) sin manita, a 17 días de la siembra	1,34	0,48	0,98
» » (21) con 1 % manita, a 17 días de la siembra	1,72	0,60	1,23
» » (24) sin agregado, estéril	0,83	—	—
» » (24) con 1,36 o/oo malato K, estéril	0,25	—	—
» » (24) con 1 % tartrato K, estéril	0,69	—	—
» » (24) con 3,46 o/oo citrato Na, estéril	0,74	—	—
» » (24) sin agregado, a 12 días de la siembra	1,47	—	—
» » (24) con 1,36 o/oo malato K, a 12 días de la siembra	0,88	—	—
» » (24) con 1 % tartrato K, a 12 días de la siembra	1,23	—	—
» » (24) con 1 o/oo citrato Na, a 12 días de la siembra	1,23	—	—

Como puede verse, *Bacterium spec.* fermenta la glucosa y la levulosa sin formar ácidos volátiles.

De la glicerina produce algo de ácidos volátiles.

La fermentación de las sales de ácido tartárico, cítrico y málico puede considerarse negativa, pues hubo aumento de acidez; si la fermentación hubiera sido positiva quedaría en libertad la base del ácido que alcalinizaría el medio.

La poca resistencia a la acidez elevada, que se corrobora con la no fermentación de ácidos, indica que este bacterio no pertenece al grupo de los causantes de alteraciones o fermentaciones favorables, como son los estudiados anteriormente.

VII. COMENTARIOS SOBRE LOS BACTERIOS AISLADOS

Las características generales de los bacterios estudiados, son concordantes con los investigados por otros autores que se ocuparon detenidamente del asunto, y que permitieron conocer el verdadero proceso de la actividad bacteriana de los vinos, entre los que se encuentran en primer término, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Los gérmenes causantes de las alteraciones bacterianas de nuestros vinos, presentan un conjunto de características semejantes como ya se mencionó anteriormente.

Son anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles, no licuantes de la gelatina, Gram positivos, no segregan catalasa, no hidrolizan el almidón, desarrollan escasamente en leche y en medios nutritivos sin alimentos hidrocarbonados. Son activos fermentadores de azúcares y otras sustancias ternarias.

La fermentación de las diversas sustancias que pueden encontrarse en los mostos o vinos, y que, por consecuencia, producen las enfermedades, varía en los diversos gérmenes estudiados.

Todos son activos fermentadores de azúcares, pero *Bacterium acidovorax* y los bacterios maníticos son los más enérgicos, especialmente el primero. *Bacterium rectiforme* y los microcococos, destruyen los azúcares con menor intensidad.

Por la fermentación de levulosa todos los bacterios maníticos producen mucha acidez volátil y manita. De glucosa, igualmente, la mayoría producen ácidos volátiles.

Todas las demás especies estudiadas no producen ácidos volátiles a expensas de esos dos azúcares, o bien originan trazas no atribuibles con seguridad a fermentación.

Ni los microcococos ni *Bacterium acidovorax* o *Bacterium rectiforme*,

producen manita a expensas de levulosa. Sin embargo, como estas dos últimas especies son capaces de fermentar la manita, es posible que si la producen, sea atacada a medida que se origina. Con todo no se caracterizó la manita en los líquidos de fermentación, aún haciendo pruebas a las pocas horas del desarrollo. La fermentación del ácido tartárico o sus sales sólo es producida por *Bacterium acidovorax*, germen por esto se diferencia netamente de los otros grupos estudiados. A expensas del ácido tartárico hay enérgica producción de ácidos volátiles.

El ácido málico es fermentado por casi todas las especies investigadas; únicamente *Bacterium Gayoni* no lo ataca. Los demás gérmenes lo hacen con intensidad variable, produciendo ácido láctico. Los micrococos son los más activos fermentadores de ácido málico.

Además de ácido láctico, *Bacterium acidovorax* produce bastante acidez volátil. En consecuencia, exceptuada esta especie, las demás desintegran el ácido málico produciendo fermentación láctica pura.

El ácido cítrico sólo es fermentado por un bacterio manítico, el *Bacterium cocciforme*, y además, por *Bacterium acidovorax*. En ambos casos se forman ácido láctico y ácidos volátiles.

La fermentación de polialcoholes, como glicerina y manita, sólo se produjo con *Bacterium acidovorax* y *Bacterium rectiforme*, especie que en esto son afines. De glicerina se forman trazas de ácidos volátiles, de manita no.

a) LOS BACTERIOS MANITICOS

De las especies de bacterios maníticos aislados de vinos argentinos:

Bacterium Gayoni MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER;

Bacterium intermedium MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER;

Bacterium cocciforme (n. spec.);

Bacterium Müller-Thurgau (n. spec.);

las dos últimas, presentan características morfológicas y fisiológicas, completamente diferentes de las otras especies de bacterios maníticos conocidos, lo que autoriza a considerarlas especies nuevas.

La otra especie de bacterio manítico típico que se encuentra descrita, además de las citadas, es *Bacterium mannitolpoeum* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, uno de los más activos que se conocen y que estos autores estudiaron con toda amplitud, como anteriormente se vió.

Entre los bacterios que intervienen en la destrucción de ácidos el *Bacterium gracile* MÜLLER-THURGAU, en presencia de levulosa tam-

bién da manita. Sin embargo, no se incluye entre los típicos microbios de las fermentaciones lactomániticas de los mostos y vinos, dado que si bien es capaz de producirla, su principal actividad es, en cambio, la destrucción enérgica del ácido málico, con producción de ácido láctico.

La misma consideración debe hacerse con otros bacterios causantes de enfermedades de los vinos, que son capaces de dar manita a expensas de levulosa, como por ejemplo los fermentos de la grasa estudiados por KAYSER y MANCEAU, los fermentos filiformes aislados por LABORDE de vinos torcidos, los microbios análogos estudiados por MAZE y PACOTTET, el *Bacterium tartarophthorum* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, etc.

Las diversas especies de bacterios maníticos de los vinos presentan características semejantes.

Morfológicamente considerados, están constituidos todos por bastoncitos gruesos de tamaño variable, pero que oscila entre 0,7 y 1,5 μ ; algunas especies son más gruesas que otras.

Bacterium mannitopoeum posee un grosor de 0,7-1,3 μ , *Bacterium Gayoni* 1-1,3 μ ; en la cepa argentina el grosor fué de 0,8-0,9. *B. intermedium* 1,2-1,5 μ en las cepas estudiadas por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER; las halladas en el país oscilan entre 0,7-1,2 μ . Finalmente *Bacterium cocciforme* 0,7-1 μ y *B. Müller-Thurgau* 0,7-0,9 μ .

Todas las especies se unen, a veces, en cadenitas de largo variable en algunos medios nutritivos y aglutinarse en masas coposas con variada intensidad.

Todos estos bastoncitos son formadores de gases. Su temperatura óptima oscila alrededor de los 30° C. (*Bact. cocciforme* menor y *Bact. Müller-Thurgau* algo mayor).

Son enérgicos fermentadores de azúcares, de los cuales producen mucha acidez; la mayoría atacan ácido málico y algunas ácido cítrico.

Los diversos azúcares se atacan con bastante intensidad, dando como productos de fermentación: ácido láctico, ácido acético, CO₂, algo de glicerina y ácido succínico, en proporciones variables según la especie y el azúcar. De levulosa se forma manita y de los otros azúcares alcohol etílico.

La energía con que los azúcares son atacados varía según las especies, pero en general la levulosa es el más intensamente fermentado; son activamente atacadas, también: glucosa, xilosa, galactosa, sacarosa y maltosa. La rafinosa lo es en menor intensidad. La lactosa no es atacada por *Bacterium mannitopoeum* y *Bacterium Müller-Thurgau*; la arabinosa no es atacada por *Bacterium Gayoni* y *Bacterium intermedium*, las otras especies lo hacen con mucha intensidad.

La única especie que desdobra la sacarosa es *Bact. mannitopoeum*.

De las otras sustancias, la glicerina y la manita no es atacada por ninguna especie, y la amigdalina sólo por *Bact. mannitopoeum*, con formación de acidez volátil, ácido láctico y aldehído benzoica.

De los ácidos, el ácido tartárico no es fermentado por ninguna especie. El ácido cítrico es algo fermentado por *Bacterium mannitopoeum* y bastante por *Bacterium cocciforme*, con formación de ácido acético y láctico. En cuanto al ácido málico, salvo *Bacterium Gayoni* que no lo ataca, las otras especies lo fermentan dando ácido láctico, pero no ácidos volátiles.

La diferenciación de las diversas especies de bacterios maníticos típicos, es posible por la fermentación de las diversas sustancias; morfológicamente sería difícil hacerlo porque todas son análogas: bastoncitos gruesos de diámetro más o menos igual.

Excluyendo las sustancias que todas las especies fermentan la primera separación puede hacerse por la fermentación de arabinosa; *Bacterium Gayoni* y *Bacterium intermedium* son las únicas especies que no la atacan. Estos dos bacterios se diferencian a su vez, entre sí, porque mientras el primero no ataca el ácido málico, el segundo lo hace intensamente.

De las especies restantes, *Bact. mannitopoeum* fermenta amigdalina mientras que *Bact. cocciforme* y *Bact. Müller-Thurgau* no. Estas dos especies a su vez se distinguen porque la primera ataca lactosa y ácido cítrico, y la segunda no.

Bact. cocciforme y *Bact. Müller-Thurgau* presentan aún otras características de fermentación que los diferencia de las demás especies de bacterios maníticos.

Bacterium cocciforme se diferencia de *Bact. Gayoni*, porque además de fermentar arabinosa, fermenta el ácido málico y el cítrico, mientras que ésta no. Se diferencia también de *Bact. mannitopoeum* porque fermenta amigdalina, pero no lactosa, mientras que con *Bact. mannitopoeum* ocurre lo inverso; con esta especie se asemeja por la ferse distingue de *Bact. intermedium* por fermentar arabinosa y ácido cítrico.

Bact. Müller-Thurgau se distingue de *Bact. Gayoni* porque porque fermenta el ácido málico, pero no la lactosa, mientras que en la segunda especie ocurre lo inverso. De *Bact. mannitopoeum* se diferencia por no fermentar ácido cítrico o amigdalina, que son atacadas por ésta; se asemeja porque ninguna de las especies ataca lactosa, pero fermentan arabinosa. La diferencia entre *Bact. Müller-Thurgau* y *Bact. intermedium* consiste en que la primera especie ataca arabinosa, pero no lactosa, mientras que en la segunda pasa lo inverso.

En lo que respecta a la diferenciación entre *Bact. cocciforme* y *Bact. Müller-Thurgau*, se efectúa por la fermentación de lactosa y ácido cítrico, positiva en la primera especie y negativa en la segunda. Ambas especies se parecen por fermentar arabinosa, pero no amigdalina.

Bact. gracile Müller-Thurgau que también puede dar, en determinadas condiciones fermentación lactománitica, se distingue netamente de las especies consideradas, por el diámetro de sus bastoncitos que varía de 0,4 a 0,6 μ , mientras que los típicos bacterios maníticos son siempre bastoncitos gruesos (más o menos de 1 μ diámetro). *Bacterium gracile* se distingue, además, porque no ataca xilosa.

Considerando las diversas cepas de *Bact. intermedium* o *Bact. Gayoni* encontrados en vinos argentinos, con las cepas estudiadas en la descripción de esas especies, se observa completa concordancia, si bien no se estudió la fermentación de todas las sustancias en las cepas argentinas, como tampoco los productos originados en la fermentación de los diversos azúcares.

Los ensayos de fermentación de levulosa con las cepas argentinas de ambas especies, demostraron abundante producción, de ácidos volátiles, como igualmente la comprobaron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER. Lo mismo ocurrió con *Bact. Gayoni* en la fermentación de glucosa.

En cambio, se observó comportamiento diferente de las cepas argentinas de *Bact. intermedium* frente a glucosa, con respecto a las observaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

Estos autores observaron que *Bact. intermedium* no produce ácidos volátiles a expensas de ese azúcar, mientras que las cepas argentinas originaron regulares cantidades. Además, observaron que en general esa especie produce poca acidez volátil en la fermentación de azúcares.

La resistencia a los principales antisépticos que actúan en el vino, como la acidez, alcohol y SO_2 , permite establecer algunas diferencias entre los bacterios maníticos.

La influencia de la acidez en la actividad fermentativa de los bacterios maníticos es un hecho conocido, habiendo sido señalada por GAYON y DUBOURG para *Bacterium Gayoni* y por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER para esa especie, y para *Bacterium mannitopoeum* y *Bacterium intermedium*. Pero las investigaciones de esos autores, fueron hechas sobre la base de la acidez de titulación de los medios de cultivos.

En las especies argentinas estudiadas en su actividad fermentativa relacionada al pH del medio nutritivo, pudo observarse que única-

	<i>Bacterium Gayoni</i>	<i>Bacterium intermedium</i>
<i>Morfología</i>		
Tamaño de los elementos (ensayos de mosto de malta en superficie)	0,8 — 0,9 × 1 — 1,4 μ	0,7 — 1,2 × 1-5 μ
Movilidad	negativa	negativa
Esporulación	negativa	negativa
Coloración de Gram	positiva	positiva
<i>Características de Cultivo</i>		
Colonias sobre agar de agua de levadura levulosa	irregulares — rugosas — blanco — amarillentas	irregulares rugosas y a veces lisas — blanco amarillentas
Desarrollo en estría de agar de mosto de malta...	difuso-rugoso	esparcido-rugoso
Licuaación gelatina	negativa	negativa
Desarrollo en mosto de cereales	enérgico	enérgico
Desarrollo en agua de levadura	enérgico	enérgico
Desarrollo en caldo azucarado	enérgico	enérgico
Desarrollo en caldo sin azúcar	negativo	negativo
<i>Fisiología</i>		
Relación con el oxígeno	anaerobio facultativo	anaerobio facultativo
Temperatura óptima	± 30° C.	± 30° C.
Formación de gases	positiva	positiva
Prueba de la catalasa	negativa	negativa
Cultivo en leche	acidifica lentamente no coagula — no reduce tornasol	acidifica lentamente no coagula — no reduce tornasol
Hidrólisis del almidón	negativa	negativa
Influencia del pH	poco sensible a 3,5	poco sensible a 3,5
Influencia del alcohol (% en vol.)	poco sensible a 11,85 %	poco sensible a 11,85 %
Influencia del SO ²	sensible a 0,5 ‰	sensible a 0,5 ‰

CUADRO N° 32

CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO Y FISIOLOGÍA DE LOS BACTERIOS ESTUDIADOS

<i>Bacterium cocciforme</i>	<i>Bacterium Müller-Thurgau</i>	<i>Bacterium acidovorax</i>	<i>Micro</i>
0,7-1 × 0,9-1,5 μ negativa negativa positiva	0,7-0,9 × 1,2-2,8 μ negativa negativa positiva	0,4-0,7 × 0,8-4 μ negativa negativa positiva	0
pequeñas — redondeadas rugosas — amarillentas esparcido-rugoso-liso negativa enérgico enérgico con regular energía poco	pequeñas — circulares rugosas — blanco-amarillentas difuso-rugoso-liso negativa enérgico enérgico enérgico escaso	redondeadas — grisáceas rugosas rugoso - colonias separadas negativa enérgico enérgico enérgico negativo	muy pequeñas lisas
anaerobio facultativo 25°-30° C. positiva negativa acidifica regularmente no coagula — no reduce tornasol negativa muy sensible a 3,5 muy sensible a 11,85 % poco sensible a 0,5 ‰	anaerobio facultativo 30°-37° positiva negativa acidifica lentamente no coagula — no reduce tornasol negativa poco sensible a 3,5 poco sensible a 11,85 % poco sensible a 0,5 ‰	anaerobio facultativo 30°-37° C. negativa negativa acidifica bien — no coagula — reduce bien tornasol negativa sensible a 3,5 muy sensible a 11,85 % sensible a 0,5 ‰	anaerobio acidificante no coagula ser no 11,85% algo sensible

<i>Micrococcus variococcus</i>	<i>Micrococcus multivorax</i>	<i>Bacterium rectiforme</i>
0,8-1,3 μ D negativa negativa positiva	0,8-1,5 μ D negativa negativa positiva	0,4-0,6 $\times$ 2-7 μ negativa negativa positiva
pequeñas — circulares — blanquecinas	muy pequeñas — circulares lisas — blanquecinas	muy grandes — redondeadas lisas — amarillentas
difuso-liso	difuso-liso	liso-difuso
negativa enérgico enérgico escaso negativo	negativa enérgico enérgico escaso negativo	negativa enérgico enérgico poco enérgico escaso
aerobio facultativo $\pm 30^{\circ}$ C. negativa negativa acidifica lentamente coagula — no reduce tornasol negativa insoluble a 3,5 desarrolla con — sensible a 8,53% insoluble a 0,5 ‰	anaerobio facultativo $\pm 30^{\circ}$ C. negativa negativa acidifica lentamente no coagula — no reduce tornasol negativa algo sensible a 3,5 no desarrolla con 11,85 % sensible a 8,53 % sensible a 0,5 ‰	anaerobio facultativo 30°—37° C. negativa negativa acidifica intensamente y coagula — reduce intensamente tornasol negativa sensible a 3,5 muy sensible a 11,85 % muy sensible a 0,5 ‰

mente *Bacterium cocciforme* es muy sensible a acidez elevada (pH 3,5); las otras especies demostraron algo de sensibilidad, pero menos intensamente.

Con respecto al alcohol, las especies argentinas se comportaron en forma análoga siendo *Bacterium cocciforme* la única especie muy sensible a una alcoholización inicial de 11,85 % en volumen; las otras fueron algo sensibles.

GAYON y DUBOURG, comprobaron que *Bact. Gayoni* es sensible al alcohol, desarrollando con 12,1 % en volumen, pero no con 14,5 % de alcoholización inicial y MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER encontraron que *Bact. mannitopoeum* producía aún bastante fermentación con 9,66 % de alcohol inicial en volumen, no desarrollando con 14,6 %, encontrándose el límite en 12 %. Con *Bact. gracile* el límite es más bajo, 9,66 % en volumen.

En términos generales, puede decirse que los típicos bacterios maníticos resisten como máximo una alcoholización inicial de 12 a 14 por ciento en volumen.

Finalmente, el SO₂, cuyo efecto atenuante sobre la actividad fermentativa de los bacterios maníticos, y de los microbios del vino en general, es conocida, también actúa sobre las diversas especies argentinas. Mientras *Bacterium cocciforme* y *Bacterium Müller-Thurgau* se mostraron muy resistentes, *Bacterium Gayoni* y *Bacterium intermedium*, son algo sensibles, a las dosis investigadas.

b) LOS BACTERIOS DEL TORCIDO

Hemos visto anteriormente que de los vinos argentinos, típicamente torcidos, se aisló siempre un bacterio filiforme, designado por *Bacterium acidovorax* debido a su actividad fermentativa sobre los ácidos del vino.

Morfológicamente considerado, este germen es análogo a los que se describen en los vinos torcidos; son bastoncitos finos que forman largos filamentos. Su temperatura óptima es elevada: 30°-37° C.

Su actividad fermentativa es enérgica; descompone activamente la mayoría de los azúcares; de glucosa y levulosa forman pequeñísimas cantidades de ácidos volátiles. Fermentan polialcoholes como glicerina y manita, formando del primero acidez volátil, y ataca amigdalina.

Descompone intensamente los ácidos málico, cítrico y tartárico, formando grandes cantidades de ácidos volátiles; del primero forma, además, ácido láctico.

El ataque activo del ácido tartárico, con producción de acidez vo-

látil, y la parcial destrucción de la glicerina, con formación análoga de algo de ácidos volátiles, autorizan a considerar este germen como el típico agente del torcido de nuestros vinos.

Hemos visto que MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER aislaron de los vinos suizos torcidos, dos gérmenes: el *Bacterium tartarophthorum* capaz de atacar intensamente ácido tartárico y glicerina, y el *Bacterium tartarophthorum* α, que atacó también ácido tartárico, pero débilmente la glicerina.

Análogamente, con *Bacterium acidovorax* se comprobó siempre activa destrucción del ácido tartárico, mientras que el ataque de la glicerina fué más lento y a veces no se produjo. Esto indica que existe bastante analogía entre ambos tipos de gérmenes.

Existen, sin embargo, diferencias fundamentales que permiten considerarlos como especies distintas. Una de ellas es el grosor; mientras el germen de vinos argentinos es un bastoncito fino (0,4-0,7 μ) los de vinos suizos son bastoncitos gruesos (0,8-1 μ). Además, estos últimos son fermentos maníticos, pues atacan la levulosa dando este tipo de fermentación.

El *Bacterium acidovorax*, en cambio, es capaz de atacar la manita; no puede decirse que no sea capaz de formarla, pues es posible que la destruya a medida que la origina, si ello ocurre. La característica de atacar la manita autoriza a considerar diferente metabolismo para el bacterio de nuestros vinos.

Debe hacerse notar que es esta la primera vez que se demuestra con evidencia, la existencia de bacterios de vinos capaces de atacar manita. LABORDE (1904) habría conseguido hacer atacar manita a *Bacterium Gayoni*; sin embargo, posteriormente (1912), DUBOURG, demostró el error de ese autor.

Otra diferencia que se encuentra entre *Bacterium tartarophthorum* y *Bacterium acidovorax*, es el ataque del ácido cítrico. Si bien los autores suizos no lo mencionan en sus estudios, es de suponer que hayan estudiado el ataque del ácido cítrico, como hicieron con los gérmenes de otras alteraciones que investigaron anteriormente, considerando además que es importante su conocimiento en el caso de vinos torcidos, especialmente en los vinos suizos.

Bacterium acidovorax ataca activamente el ácido cítrico, con tanta energía como ataca el tartárico, produciendo mucha acidez volátil. En el caso de vinos argentinos, el torcido podría ser ocasionado no sólo por la destrucción del ácido tartárico o de la glicerina, sino también de ese ácido, pues se emplea a veces como correctivo de la acidez.

En los vinos torcidos descriptos por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, el ataque de la glicerina fué comprobado en todos los casos,

mientras que el ácido tartárico a veces estaba intacto, lo que indica que la glicerina es el producto más generalmente atacado.

En los vinos argentinos no se dosó la glicerina, pero todos los vinos torcidos analizados tenían destruido el ácido tartárico; esto induce a suponer que el ataque de este ácido sea el hecho más saliente en nuestros casos de vinos torcidos.

Una observación interesante que debe hacerse con respecto a esta alteración en nuestros vinos, es la referente al período de su formación en que son atacados. Todos los casos de torcido estudiados se trataban de vinos hechos, no presentándose en mostos en fermentación. Esta es por otra parte, una observación efectuada en otras comarcas vinícolas, siendo la enfermedad, de lenta evolución.

Además, los vinos estudiados carecían de azúcar, lo que indica mayor adaptación de los bacterios del torcido, a medios nutritivos que presentan como única materia ternaria fermentescible, ácidos orgánicos y tal vez alguna otra substancia no azucarada del extracto. Los fermentos maníticos, por el contrario, no dan fermentación en ausencia de azúcares, salvo en el caso de ataque del ácido málico.

No puede excluirse, sin embargo, el desarrollo de los bacterios del torcido en mostos en fermentación, sobre todo considerando que son activos fermentadores de azúcares, los más enérgicos de todos los microbios estudiados.

Sin embargo, parece que la forma normal de ataque del vino por estos bacterios, sería al final de la fermentación principal, especialmente cuando ésta ha sido mal conducida o el mosto provenía de materia prima deficiente por la higiene o años de cosecha anormal (¿mucho nitrógeno?), o tal vez por demorar el descube o los trasiegos. En estas condiciones el germen atacaría lentamente el ácido tartárico o la glicerina o quizás otras substancias del extracto, no azucaradas, como el ácido láctico, según suponen MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER e igualmente LABORDE (1917), y el vino, que en bodega tiene, recién elaborado, acidez volátil poco superior a la normal, al llegar a los centros de consumo se acetifica fácilmente, sobre todo si está expuesto a temperaturas elevadas.

Además del *Bacterium acidovorax*, debo mencionar como participante en el torcido a *Bacterium rectiforme*.

Esta especie, que se aisló de vinos maníticos, posee como aquella, la característica de fermentar la glicerina, y de atacar el ácido málico dando a veces acidez volátil. Es capaz igualmente de descomponer la manita. Su actividad fermentativa de los azúcares es análoga a *Bacterium acidovorax*, pero menos enérgica.

Evidentemente, *Bacterium rectiforme* es un germen muy vecino al del torcido y debe tener participación en esta enfermedad.

Si bien fué aislado de vinos maníticos, se comprobó posteriormente que la manita había desaparecido, lo que indica que el vino fué encontrado tal vez al comienzo de la alteración, o que *Bacterium rectiforme* se desarrolla con posterioridad a los fermentos maníticos, destruyendo la manita que estos forman.

La propiedad de fermentar la glicerina y de formar acidez volátil a expensas del ácido málico, hacen que deba considerarse a *Bacterium rectiforme* como una especie complementaria de la descomposición que causa *Bacterium acidovorax* en los vinos. Igualmente, por dar a veces fermentación láctica pura del ácido málico, puede coadyuvar a la desintegración de la acidez que causan los micrococos malolácticos.

La influencia de una elevada alcoholización inicial, es manifiesta sobre la actividad fermentativa de *Bacterium acidovorax* y *Bacterium rectiforme*, pero toleran grandes cantidades. Con 11,85 % de alcohol inicial la fermentación se atenúa, pero no se suspende. MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER también comprobaron la resistencia al alcohol de los gérmenes del torcido que estudiaron. Con respecto al SO₂, *Bacterium rectiforme* se mostró mucho más sensible que *Bacterium acidovorax*, el que también sufre algo por su influencia.

En cuanto a la acidez, expresada por la concentración de iones H, *Bacterium rectiforme* fué más sensible que *Bacterium acidovorax*, al máximo ensayado (pH 3,5).

Muchos autores que investigaron las causas del torcido (GLENARD, GAYON, MAZE y PACOTTET, LABORDE, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER) señalaron el efecto de la acidez, pero sin referirse a su expresión actual: el pH. VENTRE (1925-1931) que estudió el asunto con este último criterio, comprobó que un pH 3,4 es óptimo para el desarrollo del torcido en vinos de Montpellier, mientras que los vinos normales tienen valores pH alrededor de 3.

c) LOS MICROCOCOS MALOLACTICOS

De las dos especies de micrococos aislados, *Micrococcus multivorax*, que se consideró especie nueva tiene características que son análogas a los otros gérmenes de este grupo, conocidos, ya mencionados anteriormente.

Los micrococos malolácticos se caracterizan, como su nombre lo indica, por la enérgica fermentación del ácido málico, con formación de ácido láctico y carbónico, pero sin formar ácidos volátiles, es decir,

dan fermentación láctica pura. Además son capaces de fermentar diversos azúcares, variable según la especie, formando ácido láctico en abundancia, por el cual se deben considerar en el grupo de los típicos microbios lácticos.

Micrococcus malolacticus SEIFERT, hace excepción, sin embargo, pues no es capaz de dar ácido láctico a expensas de la glucosa. Da, en cambio, ácidos volátiles, lo que no ocurre con los otros gémenes del grupo.

Los otros ácidos orgánicos de los vinos, como el tartárico, cítrico, succínico, no son atacados por los micrococos, pero son capaces de atacar algunos glucósidos, como la amigdalina o alfametilglucósido. No atacan glicerina o manita.

Las características morfológicas y fisiológicas son análogas en los micrococos malolácticos.

Forman cocos desiguales de tamaño variable con la especie, que se unen de a dos generalmente, y luego en tríadas o tetradas y aún en cadenitas cortas siendo capaces de aglutinarse. Tienen temperatura óptima variable entre 25° y 30° C. Sobre agar dan colonias pequeñas redondeadas y lisas.

De las especies aisladas en vinos argentinos, *Micrococcus variococcus* tiene características iguales a la especie descrita por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER. La única diferencia consiste en que las cepas argentinas no fermentan galactosa, mientras que las otras sí.

En cuanto a las cepas de *Micrococcus multivorax*, la fermentación de la mayoría de los azúcares, autoriza a considerarla especie nueva.

Como en el caso de los bacterios maníticos, no es posible diferenciar las diversas especies de micrococos por el diámetro de los elementos, porque es muy semejante, oscilando en la mayoría de ellos alrededor de un micrón. *Micrococcus acidovorax* es la especie que forma cocos más pequeños (0,5-0,7 μ), pero *Micrococcus variococcus* y *Micrococcus acidovorax* forman al lado de los cocos de gran diámetro (1,5 μ), también cocos chicos de 0,7 μ .

La fermentación de azúcares permite la separación de las diversas especies. Todas fermentan glucosa y la mayoría levulosa; sólo *Micrococcus malolacticus* no ataca este último azúcar.

De las especies restantes, *Micrococcus variococcus* no fermenta lactosa, en cambio la atacan *Micrococcus acidovorax* y *Micrococcus multivorax* especies que a su vez se distinguen porque la primera fermenta amigdalina, que no es descompuesta por la segunda.

Los antisépticos como el alcohol, acidez y SO₂, actúan con intensidad sobre la actividad fermentativa de los micrococos malolácticos.

MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER encontraron como valor límite

para el desarrollo de *Micrococcus acidovorax* 11-12 % de alcohol inicial en volumen y 10-11 % para *Micrococcus variococcus*. Las cepas argentinas de esta última especie no desarrollaron con 11,85 % de alcohol inicial, siendo sensibles a 8,53 %. Análogo comportamiento se observó con *Micrococcus multivorax*.

La acidez elevada también molesta el desarrollo de los micrococos, como lo demostraron aquellos autores con las especies que estudiaron, y SEIFERT con *Micrococcus malolacticus*; en ambos casos, la acidez se refiere a la titulación. Las cepas argentinas investigadas en su comportamiento con respecto al pH del medio, demostraron ser sensibles a un pH 3,5.

En lo que respecta al SO₂, las dos especies de micrococos encontradas en nuestros vinos, resistieron bien las dosis máximas ensayadas, demostrando ser poco sensibles.

VIII. RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS BACTERIOS AISLADOS

Y

CLAVE PARA DETERMINAR LOS BACTERIOS DE LOS VINOS

En el cuadro n° 32 se han resumido las características morfológicas y de cultivo, y los resultados del estudio de la fisiología, de las diversas especies de bacterios aislados en los vinos argentinos.

En el cuadro n° 33 puede observarse la energía fermentativa comparada, de las diversas especies, con respecto a las variadas sustancias investigadas, y en el cuadro n° 34, la diversa intensidad con que se originan los productos de fermentación.

En los gráficos números 9, 10 y 11, pueden compararse las diversas especies, en su comportamiento en presencia de diversa acidez (pH), alcohol y SO₂, respectivamente.

Finalmente, se ha confeccionado una clave para la clasificación de los bacterios de los mostos o vinos, habiéndose utilizado, para ello, los caracteres morfológicos y de fermentación. En lo posible, se ha adaptado la clave de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER (1917), ampliándola en forma de incluir las especies argentinas.

Energía fermentativa aproximada de los bacterios estudiados ()

Substancia atacada	<i>Bacterium</i> <i>Gayoni</i>	<i>Bacterium</i> <i>intermedium</i>	<i>Bacterium</i> <i>cocciforme</i>	<i>Bacterium</i> Müller- Thurgau	<i>Bacterium</i> <i>acidonora</i>	<i>Micrococcus</i> <i>variooccus</i>	<i>Micrococcus</i> <i>multivorax</i>	<i>Bacterium</i> <i>rectiforme</i>
Glucosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Levulosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Galactosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Lactosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Maltosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Sacarosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Rafinosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Xilosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Arabinosa	++	++	++	++	++	++	++	++
Glicerina	++	++	++	++	++	++	++	++
Manita	++	++	++	++	++	++	++	++
Amigdalina	++	++	++	++	++	++	++	++
Dextrina	++	++	++	++	++	++	++	++
Acido málico	++	++	++	++	++	++	++	++
Acido tartárico	++	++	++	++	++	++	++	++
Acido cítrico	++	++	++	++	++	++	++	++

(1) Los valores de esta planilla son aproximados. Los paréntesis indican que el dato incluido se refiere al caso en que haya habido fermentación.

Cuadro n° 34

Producción comparativa de acidez volátil, ácido láctico y manita por los bacterias estudiados

Germen	Producción de manita a expensas de levulosa	Acidez volátil producida en la fermentación de:						Acido láctico producido del ácido málico fermentado
		Glucosa	Levulosa	Acido málico	Acido cítrico	Acido tartárico	Glicerina	Manita
<i>Bacterium Gayoni</i>	positiva	+++	+++++	—			—	—
<i>Bacterium intermedium</i>	positiva	+++	+++++	—			+	+++
<i>Bacterium cocciforme</i>	positiva	—	+++++	—	+		—	+++
<i>Bacterium Miller-Thurgau</i>	positiva	+	+++++	—			—	+++
<i>Micrococcus variococcus</i>	negativa	—	—	—			—	+++
<i>Micrococcus multivorax</i>	negativa	—	—	—			—	+++
<i>Bacterium acidovorax</i>	(1)	—	—	+	+++	+++	—	—
<i>Bacterium rectiforme</i>	(1)	+	—	+++	+++	+++	+	+

(1) Fermentan manita.

GRÁFICO N.º 9

Influencia del pH sobre la actividad fermentativa de los bacterios estudiados

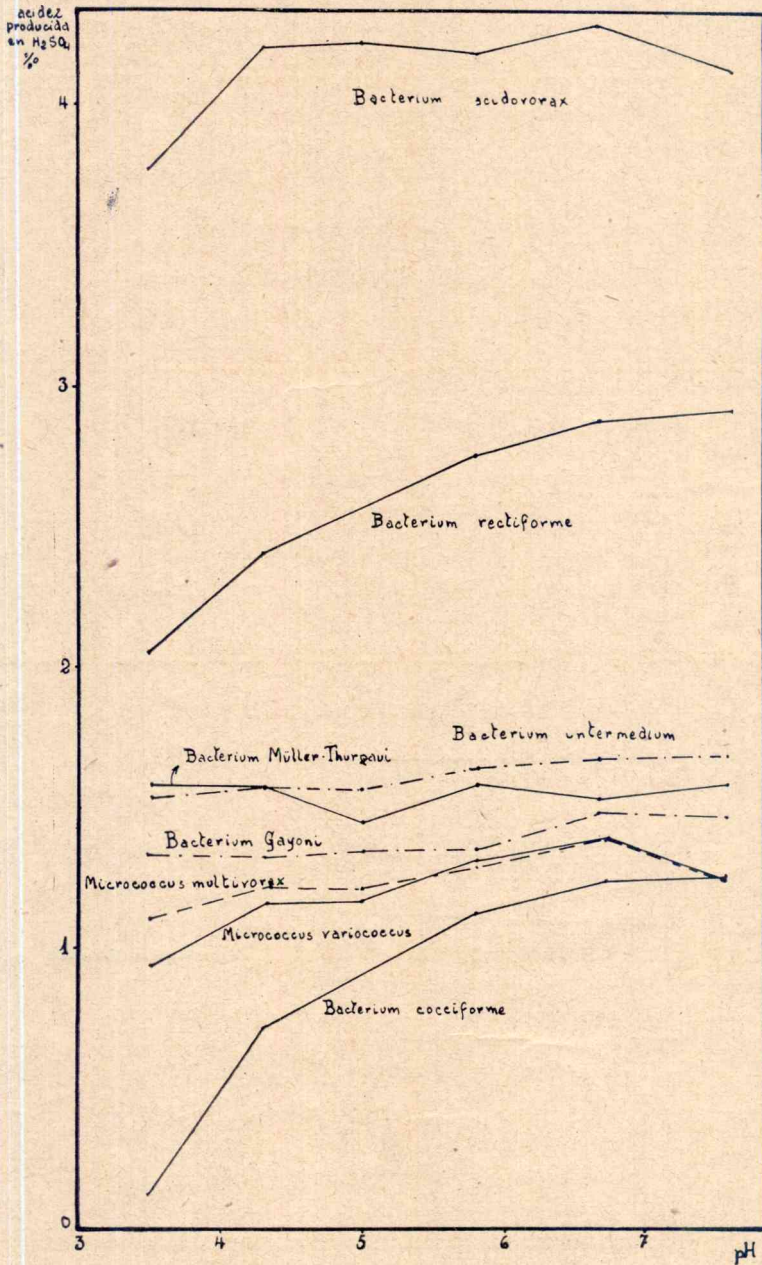


GRÁFICO N.º 10

Influencia del alcohol sobre la actividad fermentativa de los bacterios estudiados

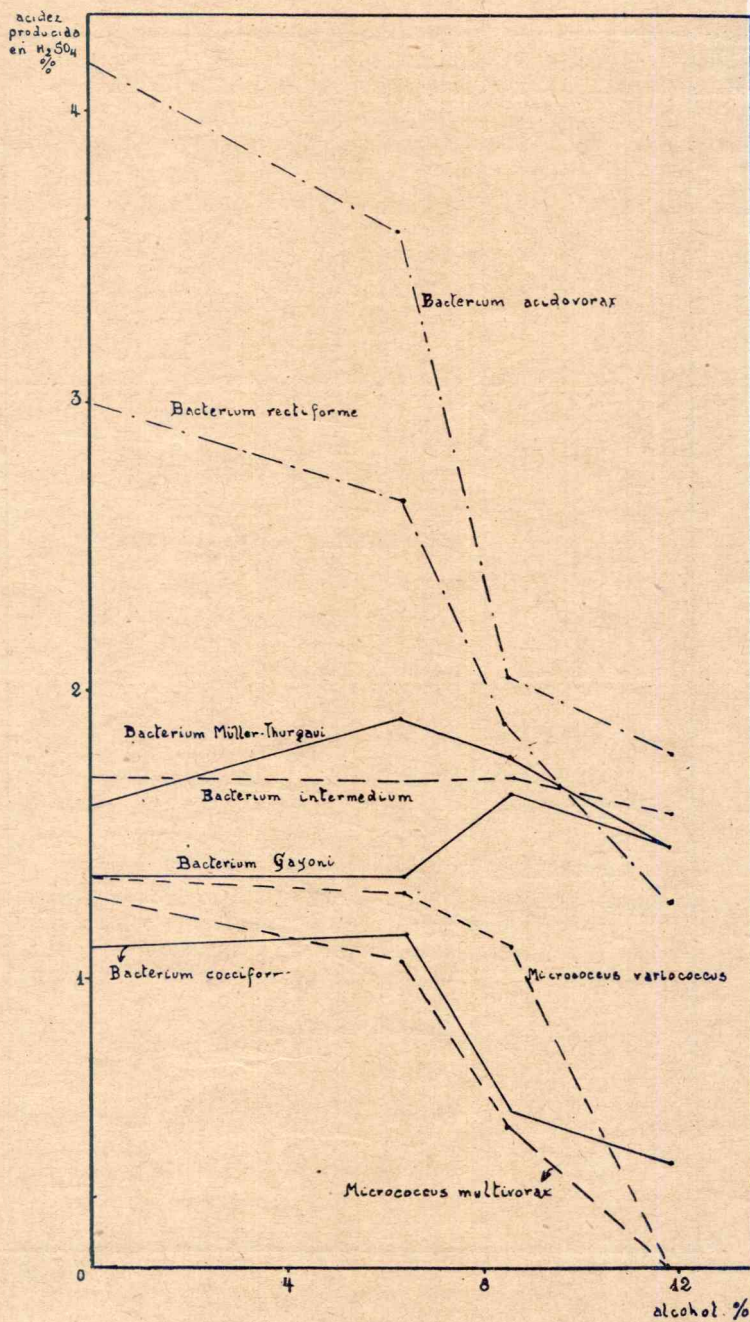
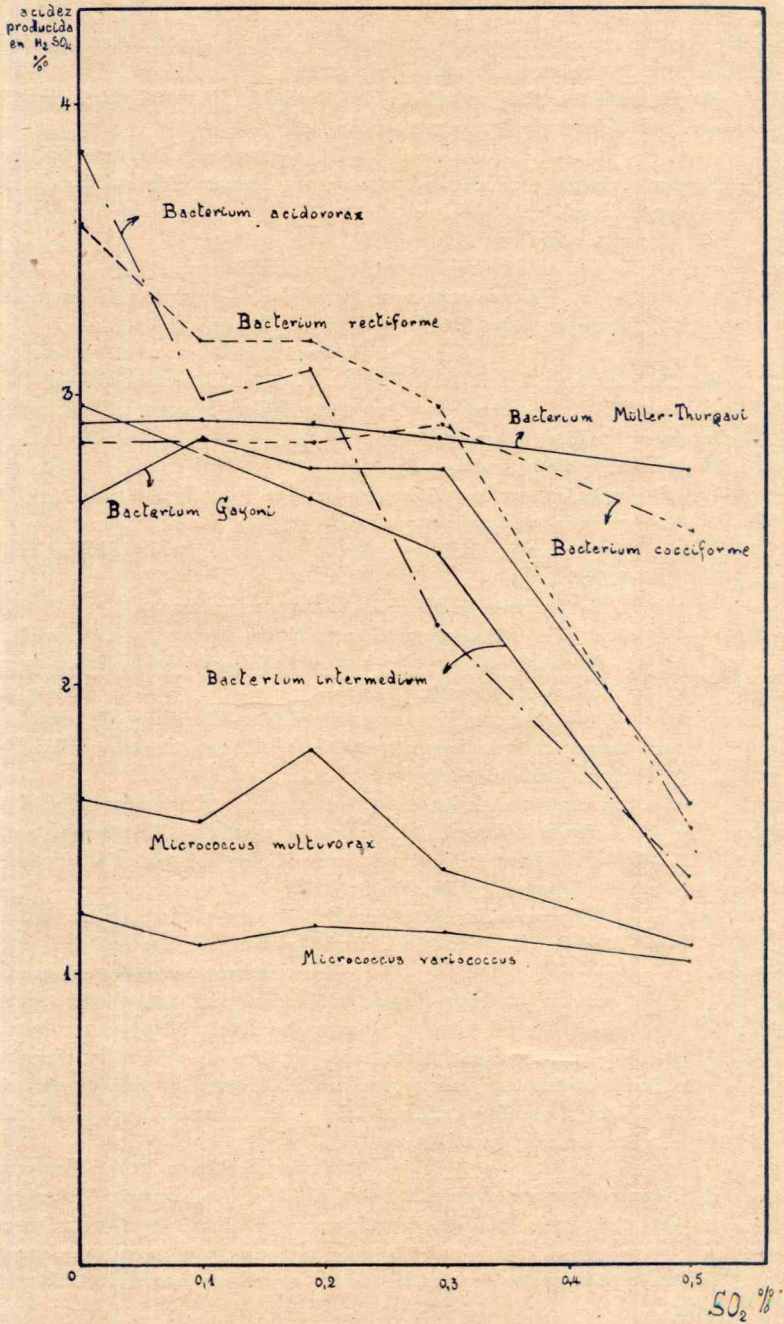


GRÁFICO N.º II

Influencia del SO_2 sobre la actividad fermentativa de los bacterios estudiados



CLAVE PARA DETERMINAR LOS BACTERIOS DEL VINO

I. COCOS, DIPLOCOCOS O TETRADAS. (Fermentan el ácido málico, con producción de ácido láctico. No atacan ácido cítrico ni tartárico).

1. *No fermentan levulosa*. 1 micrón de diámetro; fermenta glucosa con formación de ácidos volátiles, pero no ácido láctico.

MICROCOCCUS MALOLACTICUS Seifert

2. *Fermentan levulosa*. (Fermentan glucosa sin formar ácidos volátiles, lo mismo que la levulosa).

- a. *Fermentan lactosa*.

- b. *No fermenta amigdalina*. 0,5-0,7 micr. diámetro.

MICROCOCCUS ACIDOVORAX Müller-Thurgau y Osterwalder

- bb. *Fermenta amigdalina*. 0,8-1,5 micr. diámetro.

MICROCOCCUS MULTIVORAX n. spec.

- aa. *No fermentan lactosa*. 0,7-1,5 micr. diámetro. Ataca amigdalina.

MICROCOCCUS VARIOCOCCUS Müller-Thurgau y Osterwalder

II. BASTONCITOS Y FORMAS FILAMENTOSAS.

1. *No fermentan ácido tartárico*.

- a. *No fermentan manita*. (Atacan levulosa dando manita).

- b. *Fermentan energicamente xilosa*.

- c. *No fermentan arabinosa*. (Atacan lactosa, pero no amigdalina o ácido cítrico).

- d. *No fermenta ácido málico*. 0,8-0,9 micr. grueso.

BACTERIUM GAYONI Müller-Thurgau y Osterwalder

- dd. *Fermenta ácido málico* con producción de ácido láctico y carbónico. 0,7-1,2 micr. grueso.

BACTERIUM INTERMEDIUM Müller-Thurgau y Osterwalder

- cc. *Fermentan energicamente arabinosa*. (Atacan el ácido málico, formando ácido láctico).

- e. *Fermenta amigdalina*. 0,7-1,3 micr. grueso. Descompone algo el ácido cítrico, formando ácido acético y carbónico. No ataca lactosa.

BACTERIUM MANNITOPOEUM Müller-Thurgau y Osterwalder

- oo. *No fermentan amigdalina*.

- x. *Fermenta lactosa y ácido cítrico*. 0,7-1 micr. grueso; del ácido cítrico forma ácido láctico y algo de acidez volátil.

BACTERIUM COCCIFORME n. spec.

- xx. *No fermenta lactosa ni ácido cítrico*. 0,7-0,9 micr. grueso.

BACTERIUM MÜLLER-THURGAUI n. spec.

- bb. *No fermenta xilosa*. Ataca energicamente el ácido málico formando ácidos láctico, carbónico y poco acético. Fermenta energicamente ácido cítrico con formación de ácido acético, carbónico y poco láctico. 0,4-0,6 micr. grueso.

BACTERIUM GRACILE Müller-Thurgau

- aa. *Fermenta manita*. Fermenta ácido málico con producción de ácido láctico y tal vez a. volátiles. Ataca, a veces, glicerina. 0,4-0,6 micr. grueso.

BACTERIUM RECTIFORME n. spec.

2. *Fermentan energicamente el ácido tartárico*, con producción de ácidos volátiles.

- a. 0,8-1 micr. grueso. No ataca manita. Fermenta energicamente el ácido málico; transforma más o menos facilmente la glicerina en ácido acético, propiónico y láctico. Fermenta levulosa dando manita.

BACTERIUM TARTAROPHTHORUM Müller-Thurgau y Osterwalder

- aa. 0-4-0,7 micr. grueso. Ataca manita. Fermenta energicamente el ácido cítrico produciendo ácidos volátiles; descompone ácido málico con formación de ácido láctico y ácidos volátiles. Ataca débilmente la glicerina originando vestigios de acidez volátil.

BACTERIUM ACIDOVORAX n. spec.

Obs. PAVARI estudió un bastoncito muy vecino al *Bacterium tartarophthorum*, si no es la misma especie, al que De' Rossi llamó *Bacterium Pavarii*. Es de 1 micrón grueso, ataca intensamente crémor tártaro; fermenta energicamente la glucosa con formación de ácido láctico, pero no gases. Temperatura óptima: 18°-25° C.

IX. JUICIO DE VINOS CON ALTERACIONES BACTERIANAS

a) LA CATACION

Uno de los principales problemas que se presenta al analista, en presencia de un vino enfermo, es el referente al tipo de enfermedad.

En los tratados clásicos se mencionan procedimientos de diagnóstico basados en la observación de los caracteres organolépticos, pues era opinión generalizada que éstos eran suficientes. Se escribe como consecuencia, que los vinos torcidos se reconocen facilmente, porque con la agitación se forman ondas por levantarse en el líquido los sedimentos depositados durante el reposo. Como anteriormente hemos visto, no es posible caracterizar una alteración por ese detalle; en la fermentación manítica igualmente se origina un depósito que al agitarlo forma nubes u ondas, siendo esa una característica casi general del desarrollo bacteriano, pues una vez agotadas las sustancias fermentescibles la masa bacteriana deposita quedando el líquido aclarado.

Análoga consideración cabe para el desarrollo de CO₂, que se cita como característico de la faz del torcido llamada «pousse», siendo que en casi todas las alteraciones se produce y en algunas como en la fermentación manítica con mucha intensidad.

También se cita como característica perceptible a la catación, el gusto agridulce de los vinos maníticos. Esto que se presenta cuando existe manita en el líquido, puede no ocurrir en aquellos casos en que el vino sufre, simultáneamente o sucesivamente, otras fermentaciones causadas por bacterios que atacan la manita, como he demostrado, y entonces el líquido no se presenta agridulce.

La catación, por consiguiente, no es un elemento absoluto en el

juicio de la sanidad de un vino, pues generalmente los datos que proporcionan son generales, permitiendo conocer si hay o no alteración, por la acidez volátil elevada, el gusto malo, decoloración, precipitaciones, etc. Sin embargo, constituye una orientación, especialmente en aquellas regiones donde se conocen aproximadamente los tipos corrientes de enfermedades.

El gran valor que se atribuyó a la catación, se debe al concepto que se había generalizado después de los estudios de PASTEUR, de que en los vinos había alteraciones definidas: el torcido, el amargo, etc., con características bien demarcadas.

Actualmente se sabe que microorganismos con diferente metabolismo y causantes de transformaciones diversas, pueden desarrollarse en un mismo vino, por lo cual es más propio manifestar que hay vinos alterados y no alteraciones de los vinos. Como ejemplo cito el caso de los vinos de Catamarca (vinos n° 1 y n° 2) estudiados, de los cuales se aislaron, el mismo germen manítico, el mismo coco maloláctico y el *Bacterium rectiforme*.

Esta observación debe correlacionarse con la de los demás vinos, en los cuales hay presencia simultánea de varios tipos de gérmenes, como ser: bacterios maníticos con cocos malolácticos, o bien bacterios del torcido con cocos malolácticos, o aún dos especies de bacterios maníticos con cocos malolácticos, como es el caso del vino en el cual se aisló *Bact. Müller-Thurgau* y *Bact. cocciforme* (vino n° 5).

Estas observaciones indican que no hay acción específica definida de los bacterios que producen las enfermedades de los vinos, y que si bien éstas pueden diferenciarse en grandes grupos, también pueden presentarse grados intermedios o alteraciones complejas, que son la consecuencia del desarrollo simultáneo o sucesivo de varios gérmenes.

Los vinos de Catamarca, ya mencionados, constituyen un buen ejemplo. Al hacerse el aislamiento el vino presentaba manita en abundancia; después de varios meses pudo observarse que esa substancia había desaparecido; esto indica que la manita producida por el *Bacterium intermedium*, microbio manítico aislado, fué posteriormente destruida por el *Bacterium rectiforme*, germen éste que es capaz de fermentar esa substancia.

El vino de Jujuy, a que me referí al comienzo (cap. I) es otro ejemplo típico. El aislamiento bacteriano permitió obtener dos gérmenes: uno productor de manita, y otro destructor de ácidos, con todas las características del *Bacterium acidovorax* de los vinos torcidos. El vino había fermentado sin ácido tartárico, pero no presentaba manita.

Es de suponer que por el desarrollo de *Bacterium acidovorax*, fué atacado el ácido tartárico, e igualmente la manita que pudiera haber-

se formado, dado que este microbio también posee la característica de fermentar esa substancia.

Por otra parte, es evidente que la existencia simultánea de gérmenes activos, que tienen diferente metabolismo o exigencias nutritivas, debe producir alteraciones complejas, sea que su actividad fermentativa se produzca al mismo tiempo, o bien sucesivamente aprovechando un microbio, las condiciones favorables que pudiera crearle el otro.

De lo expuesto se deduce que no es sino con mucha reserva que debe hablarse de alteraciones definidas en los vinos.

b) EL ANALISIS QUIMICO

Si la catación por sí sola no sirve para diagnosticar la alteración del un vino, el análisis químico puede ser una ayuda eficaz, que se completa luego con la observación microscópica.

El análisis químico de los vinos alterados no debe limitarse a las investigaciones sumarias que corrientemente se efectúan en la práctica industrial.

Las cifras globales de la acidez, a veces son insuficientes para interpretar una enfermedad. Considerando, por ejemplo, el caso de los vinos torcidos en que por el ataque del ácido tartárico, la acidez fija disminuye, como hay formación de ácido láctico, a expensas de la glicerina, también atacada, ácido que se incluye corrientemente en la acidez fija, este dato puede ser insuficiente para diagnosticar la alteración.

Lo conveniente en este caso es la determinación del ácido tartárico, para saber en qué proporción ha desaparecido; es claro que en nuestros vinos a veces no es posible orientarse, debido a que la tartrificación es una práctica industrial generalizada; sin embargo, en los vinos muy atacados todo el ácido tartárico desaparece. En el caso supuesto correspondería entonces investigar la glicerina para saber si ha sido atacada; además, la caracterización de los ácidos volátiles puede indicar esta enfermedad, debido a que se forma ácido propiónico.

El dato global de la acidez volátil igualmente tiene escaso valor diagnóstico, porque en todas las alteraciones de los vinos se forma; pero, si se investigan los principales ácidos volátiles presentes, pueden indicar el tipo de enfermedad. Caracterizándose el ácido propiónico, como se dijo, hay casi seguridad de haberse desarrollado los bacterios del torcido que lo producen a expensas de la glicerina.

La determinación del extracto seco libre de azúcares sirve a veces para conocer el tipo de gérmenes desarrollados. Un extracto elevado

en relación al extracto normal del mismo vino, unido a la presencia de manita, es indicio seguro de este tipo de fermentación. Un extracto bajo, por el contrario, indica desarrollo de bacterios del torcido, produciéndose por ataque del crémor tártaro, glicerina y tal vez otras substancias.

Pero, pueden presentarse casos de desarrollo simultáneo de estos dos tipos de alteraciones, que son los de mayor importancia en nuestro país.

El ejemplo del vino de Jujuy, que anteriormente mencioné, es ilustrativo; dicho vino no contenía ácido tartárico como tampoco manita, pero la investigación bacteriológica demostró la presencia de gérmenes maníticos y del torcido; estos últimos habrían destruido la manita que producen los primeros.

En casos como el mencionado, el análisis químico por si solo es insuficiente para diagnosticar los tipos de descomposición producidas; es imprescindible, entonces, el análisis bacteriológico a que más adelante me referiré.

Antes de concluir estas consideraciones sobre el análisis químico de los vinos enfermos, debo llamar la atención sobre la gran importancia que presenta la determinación del ácido láctico.

Como anteriormente hemos visto, este ácido es un constituyente normal del vino, proveniente de la fermentación maloláctica; sus proporciones dependen de la intensidad de este proceso, condicionado por las modalidades vinícolas de las zonas de elaboración (madurez y composición de las uvas, temperatura, etc.) (1).

El ácido láctico se forma también, como oportunamente vimos, por el ataque de substancias fermentescibles por los bacterios de las enfermedades (principalmente de los azúcares, por los gérmenes maníticos, de la glicerina, por los del torcido, etc.). Las cantidades de ácido láctico en vinos enfermos son, por consiguiente, mayores que en vinos sanos y en proporción al grado de ataque por los bacterios.

Puede interpretarse, entonces, las condiciones de sanidad de un vino, por la comparación de las cifras de la acidez volátil y del ácido láctico.

Estas consideraciones fueron aplicadas con éxito en vinos suizos por BARAGIOLA y GODET (2), y por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.

(1) Mayores datos sobre el contenido de ácido láctico en los vinos normales y sobre la determinación del ácido láctico en los vinos se encuentran en mi trabajo: *Alteraciones bacterianas de los vinos, etc.*, ya citado.

(2) BARAGIOLA, W. J. und GODET Ch., 1912, *Die Wertung der Milchsäure bei der Weinbeurteilung*. Mitt. a. d. Geb. d. Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene. Berna, 3, págs. 235-66.

Los primeros distinguen vinos con poco ácido láctico, menos de 2 por mil y vinos con mucho ácido láctico, formado, sea por la fermentación maloláctica o bien por los bacterios de las enfermedades con producción simultánea de ácidos volátiles.

MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER establecen una clasificación de los vinos por su contenido en ácido láctico y acidez volátil, la que aplicaron con buenos resultados en vinos italianos, MENSIO y GARINO-CANINA (1914).

Aquellos autores distinguen:

1) *Vinos con poco ácido láctico y poca acidez volátil*

Es el caso de los vinos sanos, recientemente elaborados, bien preparados; MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER dan como ejemplo un vino con 7,7 o/oo de acidez total en ácido málico, 0,60 o/oo de acidez volátil en ácido acético, y 1,18 o/oo de ácido láctico; se observan micrococos, pero en pequeño número.

MENSIO y GARINO-CANINA dan como cifras en este grupo, menos de 1 o/oo de acidez volátil y de 2 o/oo de ácido láctico.

2) *Vinos con mucho ácido láctico y poca acidez volátil*

Corresponde a vinos que han sufrido una intensa fermentación maloláctica. Los autores suizos dan como ejemplo un vino con 3,34 o/oo de acidez total en ácido málico, 0,62 o/oo de acidez volátil en ácido acético y 2,72 o/oo de ácido láctico. La observación microscópica denotó abundancia de micrococos (*Micrococcus variococcus*, *Micrococcus acidovorax*, *Micrococcus malolacticus*) y *Bacterium gracile*.

El ácido láctico puede provenir también del ataque de azúcares por *Micrococcus acidovorax* y *Micrococcus variococcus*, pero no por *Bacterium gracile* o *Micrococcus malolacticus*, que producen de ellos ácidos volátiles.

Los autores italianos encontraron vinos que se incluyen en esta clasificación, conteniendo más de 2 o/oo de ácido láctico y menos de 1,5 por mil de acidez volátil. La cantidad de ácido láctico variaba con el tipo de vino; en vinos de alta graduación alcohólica como el Barolo, Barbera, Barbaresco, oscilaba alrededor de dos gramos por litro, en vinos de baja graduación como el Gattinara, Cessona, etc., y aún los vinos tintos comunes de mesa, alcanzaba 3-3,5 o/oo.

En estos vinos, MENSIO y GARINO-CANINA encontraron gérmenes del tipo *Bacterium gracile*, pero más resistentes al alcohol, y raramente

micrococos. Atribuyen la formación del ácido láctico a la desintegración del ácido málico, que disminuyendo la aspereza del vino, los hace más mórbidos y bebibles, observando que cuando aquella es muy avanzada el vino se vuelve insípido y amarillento, lo que se designa por vino muy maduro.

3) *Vinos con poco ácido láctico y mucha acidez volátil*

Corresponde a los vinos precozmente acetificados, antes de la fermentación maloláctica, dependiendo la cantidad de ácidos volátiles, del grado de ataque por los organismos causantes de la misma, que la observación microscópica permite conocer (micodermas, bacterios acéticos).

En presencia de cantidades superiores a 1 0/00 de ácido láctico, puede suponerse que además de los gérmenes acetificantes pueden haberse desarrollado bacterios de las enfermedades, originándose el ácido láctico por ataque de los azúcares y de los ácidos del vino.

Con respecto a esta observación, MENSIO y GARINO-CANINA manifiestan la importancia que tienen posteriores investigaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, quienes comprobaron que los bacterios acéticos forman ácido láctico.

Los autores italianos dicen no haber encontrado vinos que pudieran incluirse en esta clasificación, por no existir en la zona vinícola experimentada, vinos acetificados.

4) *Vinos con mucho ácido láctico y mucha acidez volátil*

Es el caso de los vinos con alteraciones bacterianas, como la picadura láctica que observaron los autores suizos, correspondiente al desarrollo de *Bacterium Gayoni* y *Bacterium mannitopoeum*, y excepcionalmente *Bacterium gracile*.

La cantidad de ácidos volátiles (2-3 0/00) no alcanza regularmente las proporciones del ácido láctico, cuyo contenido varía según el grado de evolución de la enfermedad.

En los vinos italianos, MENSIO y GARINO-CANINA consideran para esta clasificación, los vinos enfermos, no solamente los maníticos, sino también los torcidos en que igualmente hay formación de ácido láctico. Como cifras de acidez volátil dan 2-3 0/00 y de ácido láctico 4-5 por mil.

MENSIO Y GARINO-CANINA concluyen que la determinación del ácido

lático no debe faltar, para juzgar la genuinidad de un vino, por su influencia sobre el extracto.

En presencia de acidez fija normal y acidez volátil normal, el ácido láctico proviene de la fermentación maloláctica, pero si la acidez fija se encuentra aumentada, su origen es el ataque de azúcares por esos mismos gérmenes o por los causantes de las enfermedades, habiendo entonces aumento de acidez volátil. La observación microscópica y los caracteres organolépticos dan entonces indicaciones útiles.

Una observación interesante que hacen MENSIO y GARINO-CANINA, es la referente a las aplicaciones de reglas como las de GAUTIER, ALPHEN, BLAREZ y ROOS, etc., para juzgar la genuinidad de los vinos. En estas reglas se considera la acidez fija del vino después de la fermentación alcohólica; si después de ésta se produjo la fermentación maloláctica, la acidez fija disminuyó, por la descomposición del ácido málico. En este caso, la aplicación de las reglas se hace mal, sosteniendo que se debe agregar a la acidez fija del vino la acidez málica correspondiente al ácido láctico presente, de acuerdo a la ecuación de la fermentación maloláctica.

Es necesario, por consiguiente, establecer previamente el origen del ácido láctico del vino, porque si éste proviene de la fermentación de azúcares o sustancias del extracto, la aplicación de la regla puede hacerse directamente sobre la acidez fija del vino.

DE ASTIS (1924, pág. 359), manifiesta, sin embargo, haber aplicado la corrección de la acidez en esta clase de cálculos sin obtener resultados favorables en la generalidad de los casos, y lo atribuye a pérdida de ácidos orgánicos, que los bacterios malolácticos destruirían directamente.

En lo que respecta a la aplicación de los conceptos mencionados, sobre ácido láctico y acidez volátil de los vinos argentinos, es del caso referirse nuevamente a la falta de un estudio sobre el contenido en ácido láctico en los vinos normales, única base sobre la cual es posible aplicar las clasificaciones citadas.

La importancia del conocimiento del ácido láctico en nuestros vinos es evidente, considerando que no se usa para corregir la acidez como otros ácidos (tartárico, por ejemplo), y que de su contenido, comparado con la acidez volátil, podrían conocerse las condiciones de su elaboración y su grado de salud. Es éste, por consiguiente, un estudio que urge efectuar.

Como última consideración respecto al análisis químico de los vinos alterados, creo conveniente repetir las observaciones de VENTRE sobre la acidez real de los vinos. Este autor, en Montpellier, observó que los vinos normales tienen pH 2.9 a 3.2 mientras que los vinos

torcidos, por la desaparición del ácido tartárico, tienen valores pH más elevados, hasta 3,8. La determinación del pH, serviría, entonces, de guía en el juicio de los vinos enfermos.

Para ésto, lo mismo que para el ácido láctico, hace falta conocer el pH de los vinos normales, y de las variadas regiones, asunto que tampoco ha sido investigado en el país ⁽¹⁾.

c) LA OBSERVACION MICROSCOPICA Y EL ANALISIS BACTERIOLOGICO

La observación microscópica es indudablemente lo primero que se efectúa en presencia de un vino sospechoso de alteración. Pero, análogamente a la catación, la observación microscópica aislada suministra datos muy generales, y es insuficiente para diagnosticar una enfermedad.

La combinación de la catación y la observación microscópica, permiten definir un estado de enfermedad, pero no caracterizar el tipo; es necesario el análisis químico, y, como ya hemos visto, a veces conviene dosar determinados constituyentes del vino con especialidad.

Cuando se trata de diferenciar bastoncitos de cocos, es muy fácil hacerlo por simple observación. Sin embargo, en ciertos vinos resulta difícil a veces diferenciar bacterios manífticos, que forman bastoncitos cortos unidos de a dos, de los micrococos, que también se presentan en esta forma; es el caso de *Bacterium cocciforme* que como su nombre lo indica, presenta formas redondeadas, siendo completamente difícil su diferenciación de los cocos, por simple observación.

Los mismos micrococos se presentan a veces en los vinos, en condiciones tales, que es difícil distinguirlos.

En el caso de bastoncitos, es aún más difícil diferenciar las diversas especies entre sí. Si es posible con mucha práctica distinguir los finos bastoncitos del torcido, de los gruesos bacterios manífticos, es imposi-

(1) El estudio del pH de los vinos normales, sería doblemente útil, pues serviría, además, para comprobar la adición de ácidos minerales que aumentan la concentración de iones H del vino.

El estudio en este último caso, que es obvio, debe efectuarse sobre vinos de auténtica e indudable procedencia, podría hacerse, como indica MORANI, por la comparación de las curvas de titulación potenciométrica de vinos normales y los vinos problemas. (V. MORANI, *Investigación potenciométrica de la adición de ácidos minerales a los vinos* Ann. Chim. Applic., 1930).

La investigación del pH también interesa, para establecer las condiciones de conservación de los vinos, en la medida en que influye, porque, según algunos autores, constituyentes orgánicos del vino, de núcleo fenólico, pero de baja concentración de iones Hidrógeno, también tendrían importancia. (SEMICHON y FLANZY, Ann. Fals. Fraud., 1930, 23:5-19).

ble, por más experiencia que se tenga, la diferenciación de las diversas especies de estos últimos por la simple observación microscópica; todos son bastoncitos gruesos, cortos, de bordes rectos, unidos a veces en cadenas, o filamentos no tabicados.

Por otra parte, en los vinos se presentan a veces varias especies bacterianas son simultaneidad, lo que hace más engorroso el problema.

De lo expuesto se deduce que para conocer con certeza la alteración de un vino, es necesario la catación, el análisis químico completo y el aislamiento y caracterización rápida de los gérmenes presentes.

En base a las características de los bacterios estudiados, considero conveniente usar la siguiente marcha de análisis bacteriológico rápido de los vinos:

a) Observación microscópica del vino, que permita conocer morfológicamente la flora bacteriana presente;

b) Siembra en mosto de cereales en anaerobiosis, con tapón de vaselina-parafina;

c) Desarrollo de colonias sobre placas de agar de mosto de malta, sembrando directamente del vino y del cultivo previo de enriquecimiento;

d) Picado de las colonias y desarrollo en mosto de cereales sin CaCO_3 en anaerobiosis, con tapón de vaselina-parafina, prefiriendo, cuando son iguales, los que provienen del vino.

Una vez obtenido el desarrollo se puede saber aproximadamente los gérmenes que existen.

Si había bacterios acéticos, por la anaerobiosis del cultivo no habrían desarrollado, eliminándose.

Si en uno de los cultivos aparece un germen móvil, se trata con toda seguridad de una infección, o del desarrollo de esporos presentes en el vino. Los bacterios de las enfermedades del vino son inmóviles y no esporulados.

Los bacterios maníticos se diferencian netamente de los demás por la formación de gases. Por esto, los tubos con mosto de cereales sin CaCO_3 aparecerán, por su presencia, con el tapón levantado. La comprobación se obtiene por la observación de las colonias, y por el desarrollo en agua de levadura levulosada, donde forman manita a las 24-48 horas.

Esta misma prueba conviene hacerla en caso de que no haya formación de gases.

Los demás gérmenes se separan por observación directa y por las colonias.

Los micrococos se reconocen enseguida, morfológicamente; además, *forman colonias muy pequeñas, redondeadas, lisas.*

Bacterium acidovorax y *Bacterium rectiforme* se reconocen fácilmente, por la observación de un cultivo de agua de levadura levulosa y glucosada. Mientras el primero forma cadenitas de artículos cortos, a veces en número elevado, hasta 50-60, el segundo da bastoncitos rectos muy alargados, que no se unen en mayor número que tres o cuatro. La observación de las colonias ayuda también al reconocimiento de esos dos gérmenes.

Este método rápido de investigación bacteriológica de los vinos enfermos, permite conocer en pocos días, con bastante aproximación, la flora bacteriana de los mismos. Para la determinación exacta de los gérmenes debe seguirse el método general empleado para su caracterización.

X. CONCLUSIONES

A. Considerando el proceso fermentativo de los microbios estudiados, y el establecido por los investigadores que se ocuparon de las alteraciones bacterianas de los vinos, pueden sacarse las siguientes conclusiones:

1. Los bacterios manífticos estudiados son los causantes de las alteraciones lactomanífticas de los vinos argentinos, pudiendo éstas desarrollarse en los mostos en fermentación, o en los vinos ya hechos, si la presencia de alimentos hidrocarbonados, azúcares especialmente, y demás condiciones fisiológicas se lo permiten.

2. El hecho de que haya especies de bacterios manífticos con temperatura óptima de 25° a 30° C., más bien baja, y de que se encuentren esos gérmenes en completa actividad en vinos elaborados en zonas de clima no muy cálido, autoriza a manifestar que la alteración lactomaníftica no es exclusiva de las regiones cálidas, a pesar de presentarse especialmente en ellas.

3. Los micrococos aislados son los causantes de la desintegración del ácido málico que pueda ocurrir en nuestros mostos, en aquellas zonas vinícolas cuya cosecha sea suficientemente rica en dicho ácido, como para permitirla.

4. El *Bacterium rectiforme* por su propiedad de fermentar el ácido málico, con producción de ácido láctico, puede considerarse como uno de los agentes de la fermentación maloláctica, si bien a veces es capaz de originar ácidos volátiles a expensas del mismo.

Las especies de bacterios manífticos que atacan el ácido málico, deben también considerarse como participantes de la desintegración de la acidez, especialmente porque producen la fermentación de ese ácido originando ácido láctico, pero no ácidos volátiles.

5. De acuerdo al proceso bioquímico de la enfermedad del torcido estudiado experimentalmente por MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER y las observaciones e investigaciones de otros investigadores, comparadas con los presentes resultados, debe considerarse el *Bacterium acidovorax* estudiado, como el microbio típico que origina el torcido de nuestros vinos.

Su actividad principal es la destrucción enérgica de los ácidos tartárico, cítrico y málico, con producción activa de ácidos volátiles, formándose, además, ácido láctico a expensas del ácido málico; y la parcial descomposición de la glicerina con formación de acidez fija y algo de acidez volátil.

6. El *Bacterium rectiforme*, microbio que tiene algunas características semejantes con el *Bacterium acidovorax*, como ser el ataque de la glicerina y de la manita, y la fermentación del ácido málico, debe considerarse un bacterio del torcido, especialmente por su capacidad de fermentar glicerina.

7. Las investigaciones efectuadas concuerdan, por lo tanto, con el proceso del torcido que establecieron MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, quienes demostraron que el mismo consiste en la destrucción del ácido tartárico con formación de ácido acético y carbónico y en el ataque de la glicerina con producción de ácido acético, propiónico y láctico, estableciendo que este último proceso era general en los vinos torcidos que estudiaron, mientras que el ataque del ácido tartárico a veces faltaba.

En la especie *Bacterium tartarophthorum* que ellos describen, hay formas que atacan el ácido tartárico y la glicerina, y otras que sólo atacan esta última.

En la enfermedad del torcido, el ataque de la glicerina sería, por lo tanto, una de las características generales y más importantes, lo que autoriza a considerar el *Bacterium rectiforme* estudiado, como participante de esa alteración.

En todos los vinos estudiados, sin embargo, había destrucción del ácido tartárico, y todas las cepas de *Bacterium acidovorax* investigadas, atacaron intensamente el ácido tartárico en cultivos artificiales.

8. La presencia casi general de micrococos malolácticos en todos los vinos enfermos estudiados, puede correlacionarse con las investigaciones de MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, quienes demostraron experimentalmente la intervención que esos gérmenes pueden tener a veces en el torcido, pudiendo sugerirse, que en determinadas condiciones esos micrococos contribuyan conjuntamente con el *Bacterium rectiforme*, al progreso de la enfermedad del torcido que causa *Bacterium acidovorax*.

9. Habiéndose encontrado le torcido en vinos hechos, ya fermentados, y considerando que los ácidos tartárico, málico y cítrico, son atacados por *Bacterium acidovorax* con mucha lentitud, puede suponerse que esa alteración es propia de los vinos hechos, y que si comienza en el mosto, ocurre al final de la fermentación, por ataque lento de las sustancias del extracto especialmente del ácido tartárico y la glicerina, llegando a su máximo desarrollo cuando el vino se encuentra en las vasijas de conservación o ya en los centros de consumo.

No puede excluirse, sin embargo, la posibilidad de que los gérmenes del torcido se desarrollen intensamente durante la fermentación alcohólica, sobre todo si se considera que son activos fermentadores de azúcares, los más enérgicos de todos los bacterios estudiados.

10. La facultad de fermentar manita por los bacterios de los vinos, que fuera considerada por LABORDE, como posible en los bacterios maníficos, pero no demostrada, y que, antes bien, fuera desvirtuada por DUBOURG, posteriormente, con respecto a *Bacterium Gayoni*, queda establecida en estas investigaciones.

Bacterium acidovorax y *Bacterium rectiforme*, en efecto, son capaces de atacar fácilmente esas sustancias sin producir ácidos volátiles, por lo que su desarrollo en vinos maníficos ocasiona la desaparición de la misma, contribuyendo a aumentar la descomposición por los productos que origina, entre los que se comprobó la existencia de ácidos fijos.

11. Dado que no está bien establecido en qué consiste el proceso químico de la enfermedad del torcido, si bien las investigaciones MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, aclararon muchos puntos, es conveniente realizar el estudio de la fermentación del ácido tartárico y la glicerina, por bacterios del tipo *tartarophthorum* o *acidovorax*, con métodos que permitan hacer el balance de las sustancias destruidas, y de los nuevos productos formados. Esto podría ventajosamente efectuarse mediante el procedimiento que se sigue en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Técnica de Delft (Holanda).

12. La coexistencia en un mismo vino de bacterios causantes de diferentes alteraciones, como es el caso general encontrado, demuestra una vez más que las enfermedades de los vinos, si bien pueden realizarse por especies bacterianas aisladas, casi siempre son el resultado de la actividad de varios microbios que se desarrollan simultáneamente, o bien sucesivamente, aprovechando las condiciones favorables que unos pueden crear a los otros.

Resulta así que las alteraciones de los vinos son procesos bioquímicos más complejos de lo que comunmente se cree.

13. El método de aislamiento directo de los gérmenes de las enfermedades de los vinos, utilizado, que por primera vez se cita en la bac-

teriología vínica, permite el conocimiento completo y seguro de los agentes de las alteraciones, y, como consecuencia, el conocimiento de los tipos de descomposiciones sufridas por los vinos.

Gracias a ese procedimiento es posible la caracterización inmediata de los bacterios, evitándose que puedan considerarse los gérmenes que accidentalmente invaden los cultivos de enriquecimiento, como los verdaderos causantes de las enfermedades, como probablemente ha ocurrido con los gérmenes que dieron origen a las polémicas que se encuentran descritas en la bibliografía.

El método directo de aislamiento tiene, además, la ventaja de evitar la reproducción artificial de las alteraciones.

B. De los resultados obtenidos en la investigación química y bacteriológica de los vinos estudiados, pueden hacerse, además, las consideraciones que siguen, algunas de interés práctico;

14. Juicio de vinos enfermos.

La catación y el análisis químico aislado, son elementos insuficientes para juzgar con acierto las alteraciones que ocurren en un vino enfermo.

La catación, a la que en otro tiempo se atribuyó importancia fundamental en el juicio de vinos alterados, tiene importancia muy secundaria, y en muchos casos el único dato que puede proporcionar, es el de si el vino está o no enfermo, por la acidez volátil, elevada, el gusto alterado, la materia colorante precipitada, etc.

El análisis químico, factor importantísimo para considerar la enfermedad de un vino, pierde su valor si no se ejecuta sobre los principales componentes del mismo, capaces de ser atacados por los microbios. Tiene poco valor el análisis sumario de un vino que sólo da a conocer el contenido total en compuestos afines.

De lo expuesto se deduce que siempre es necesaria la observación microscópica escrupulosa, para juzgar el vino enfermo, siendo ésta, por otra parte, insuficiente por si sola.

El conocimiento racional de un vino enfermo debe el resultado de la catación, del análisis químico completo, y de la observación microscópica seguida de la caracterización, aunque sea grosera, de los gérmenes presentes.

Las principales determinaciones químicas que deben hacerse en los vinos enfermos, además de las corrientes, como alcohol, acidez total, acidez volátil, extracto, etc., son: ácido láctico, ácido tartárico, glicerina y manita.

El ácido láctico por ser un compuesto que lo originan todos los bacterios del vino.

El ácido tartárico y la glicerina, para apreciar por su disminución si

se trata de un vino torcido. La investigación del ácido propiónico, entre los ácidos volátiles, puede servir de corroboración, pues se origina a expensas de la glicerina.

La manita, dado que por sí sola indica la existencia de la enfermedad que le da origen.

Como método de análisis bacteriológico rápido de un vino enfermo, puede seguirse el descripto, que permite diferenciar los micrococcos, los bacterios del torcido, y los bacterios maníticos de los vinos argentinos, por medios de cultivo en mosto de cereales sin calcio en anaerobiosis, con tapón de vaselina-parafina; y ligera caracterización por desarrollo en agua de levadura levulosada, y formación de colonias.

15. El ácido láctico en los vinos.

Dado que todos los bacterios estudiados, exceptuando *Bacterium Gayoni*, fermentan el ácido málico con producción de ácido láctico, y que, además, este ácido es producido por los diversos gérmenes en la fermentación de otras sustancias, como los azúcares, sobre todo considerando que son fermentos lácticos, se deduce que el contenido en ácido láctico de un vino es un dato valioso para juzgar su salud.

Pero, para ello es necesario conocer la proporción de ese ácido en vinos normales, dato que se desconoce con respecto a nuestros vinos, por no existir estudios efectuados, por lo menos al tiempo de hacer estas investigaciones.

Las determinaciones hechas a título informativo, en vinos sanos, permiten considerar el contenido normal de nuestros vinos en ácido láctico, variando entre 1 y 2 o/oo, aproximadamente.

Como en vinos enfermos se constataron siempre cantidades superiores a éstas, que a veces llegaron a 5 o/oo, se deduce lo importante que es el conocimiento del contenido normal de nuestros vinos en ácido láctico, máxime considerando que esta substancia no se usa corrientemente como correctivo de la acidez. Se podría conocer, entonces, aproximadamente, el grado de salud de un vino por el contenido en ácido láctico y acidez volátil como es usual en algunos países de Europa, desde hace muchos años.

16. Como todas las especies bacterianas encontradas en vinos argentinos, atacan con intensidad el ácido málico con producción de ácido láctico, y si bien muchas de ellas ocasionan la llamada desintegración pura de la acidez, otras, en cambio, originan ácidos volátiles, es necesario tener en cuenta las convenientes condiciones de higiene vinícola que debe reunir la práctica del agregado de jugo de uvas verdes para corregir la acidez, que se está usando en Cuyo, a fin de evitar su fracaso.

Teniendo en cuenta esta práctica enológica y la presencia constante

de bacterios malolácticos en casi todos los vinos observados, es conveniente estudiar el rol que incumbe a este tipo de gérmenes en nuestra vinificación.

Análoga observación a las anteriores, deba hacerse a la práctica de la acidificación con ácido cítrico, en regiones que por su clima sea más fácil el desarrollo de bacterios, dado que algunas especies descomponen intensamente ese ácido, originando acidez volátil.

17. El comportamiento de las diversas especies bacterianas en medios nutritivos artificiales, frente a los diversos antisépticos como son la acidez, el alcohol, el SO_2 , demuestra la necesidad de hacer estudios en vinos y mostos y en las diversas condiciones de conveniencia industrial, para establecer la proporción y la oportunidad del empleo de los mismos, incluso el tanino, para prevenir o combatir las enfermedades de nuestros vinos.

RESUMEN

1) Se investigaron las alteraciones bacterianas presentes en vinos de variadas regiones vinícolas de la República Argentina (Mendoza, San Juan, Río Negro, La Rioja, Catamarca, Jujuy, Buenos Aires), los que por sus caracteres organolépticos, observación microscópica y análisis químico, se podían considerar enfermos, constatándose la existencia de fermentaciones lactomaníticas y del torcido.

2) Se aislaron los bacterios presentes directamente del vino, empleando un método nuevo en bacteriología vínica, y se estudiaron los mismos en cultivo puro, utilizando algunos procedimientos no usados todavía en la investigación de las alteraciones de los vinos.

3) Se comprobó que los gérmenes aislados producen, en medios nutritivos artificiales adicionados de las sustancias fermentativas presentes en los vinos normales, las mismas transformaciones químicas constatadas en los vinos de donde fueron aislados. Se consideraron, en consecuencia, como los agentes de las alteraciones observadas, dado que fueron aislados directamente de los vinos, sin cultivos previos de enriquecimiento.

4) Se estudiaron en total, 22 cepas de bacterios, que se agruparon en ocho especies, de las cuales cinco se describen como nuevas, por presentar caracteres morfológicos, y fisiológicos distintos de las descritas en la bibliografía.

5) Cuatro de las especies: *Bacterium Gayoni* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, *Bacterium intermedium* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, *Bacterium cocciforme* (n. spec.), y *Bacterium Müller-Thur-*

gavi (n. spec.), son gérmenes lactomaníticos, causantes de este tipo de alteración en los vinos estudiados.

6) Dos especies: *Micrococcus variococcus* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER y *Micrococcus multivorax* (n. spec.), son bacterios malolácticos que se consideraron como representantes de los microorganismos de la fermentación maloláctica de los vinos argentinos, pues se observó su presencia casi general en los vinos investigados y no son los agentes de las enfermedades encontradas.

7) De las otras dos especies, *Bacterium acidovorax* (n. spec.), aislada exclusivamente de vinos torcidos, se verificó que es el agente de estas alteraciones, mientras que la otra, *Bacterium rectiforme* (n. spec.), además de ser un germen complementario de las mismas, se comprobó que por sus características de fermentación debe intervenir en la desintegración del ácido málico, conjuntamente con los micrococos.

8) Se analizan las características de los gérmenes estudiados y las transformaciones que causan, comparándolos con los tipos análogos conocidos, y se da una clave para la determinación de los bacterios de los vinos, basada en los caracteres morfológicos y de fermentación.

9) Se discute el criterio que debe seguirse para juzgar un vino con alteraciones bacterianas, considerándose que la catación, la observación microscópica y el análisis químico, aislados, son elementos de juicio insuficientes, debiendo utilizarse combinados. Se propone, en consecuencia, un método rápido de análisis bacteriológico de los vinos enfermos, y se considera la importancia que tiene la determinación del ácido láctico en los vinos.

RESUME

1) On a recherché les altérations bactériennes de quelques vins de diverses régions viticoles de la République Argentine (Mendoza, San Juan, Río Negro, La Rioja, Catamarca, Jujuy, Buenos Aires), qu'en raison de leurs caractères organoleptiques, et des résultats de l'observation microscopique et de l'analyse chimique, pouvaient être considérés malades, en y constatant des fermentations lactomannitiques et de la tourne.

2) On a isolé les bactéries présentes, directement du vin, au moyen d'une méthode nouvelle en bactériologie vinicole, et on a étudié les mêmes en culture pure, par quelques procédés non employés jusqu'aujourd'hui dans l'investigation des altérations des vins.

3) On a vérifié que les germes isolés produisent, dans des milieux nutritifs artificiels pourvus de substances fermentatives propres des vins normaux, les mêmes transformations chimiques constatées dans les vins dont ils furent isolés. On les a considérés, en conséquence comme les vrais agents des altérations observées, car ils furent isolés directement des vins, sans culture préalable d'enrichissement.

4) On a étudié, en total, 22 cultures de bactéries, qu'on a groupé en huit espèces, dont cinq sont décrites comme nouvelles, en raison de leurs caractères morphologiques et physiologiques différents des caractères des espèces décrites dans la bibliographie.

5) Quatre des espèces: *Bacterium Gayoni* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, *Bacterium intermedium* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, *Bacterium cocciforme* (n. spec.), et *Bacterium Müller-Thurgau* (n. spec.), sont des germes lactomannitiques, qui causèrent ce type d'altération dans les vins étudiés.

6) Deux espèces: *Micrococcus variococcus* MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER et *Micrococcus multivorax* (n. spec.), son bactéries malolactiques, que furent considérées comme représentantes des microorganismes de la fermentation malolactique des vins argentins, car on a observé leur présence presque général dans les vins étudiés, et elles ne sont pas les agents des maladies trouvées.

7) Quant aux autres deux espèces, *Bacterium acidovorax* (n. spec.) isolée exclusivement des vins tournés, on a constaté qu'il est l'agent de ces altérations, tandis que l'autre, *Bacterium rectiforme* (n. spec.), en plus d'être un germe complémentaire de celles-ci, on a vérifié que par ces caractéristiques de fermentation, doit participer avec les microcoques, dans la désintégration de l'acide malique.

8) On analyse les caractéristiques des germes étudiés et les transformations qu'ils produisent, en les comparant avec les types analogues connus, et on donne une clef pour la détermination des bactéries des vins, basée dans les caractères morphologiques et de fermentation.

9) On discute le critérium à suivre pour juger des vins avec d'altérations bactériennes et on considère que la dégustation, l'observation microscopique et l'analyse chimique, isolés, sont facteurs de jugement insuffisants et qu'ils doivent être appliqués en combinaison.

On propose, en consequence, une méthode rapide d'analyse bactériologique des vins malades, et on considère l'importance de la détermination de l'acide lactique dans les vins.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ARATA, P. N. 1903. *Industria vitivinícola* en: Informes Comisión de Investigación Vinícola. Anal. Min. de Agric. de la Na., tomo 1 (n° 1), págs. 175-257.

ARENA, A. 1935. *Las alteraciones bacterianas de los vinos. Con especial referencia a las encontradas en la República Argentina* (inédito).

ASTIS, G. DE. 1924. *Gli acidi del mosto e del vino*. Francesco Battiato. Editore. Catania.

BABO, U. V. VON UND MACH, E. 1910. *Handbuch des Weinbaues und der Kellerwirtschaft*, tomo II (4° ed.). Paul Parey. Berlín.

BORDAS, F., JOULIN ET DE RACZCOWSKI. 1898, a. *Sur l'amertume des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 126, págs. 598-99.

BORDAS, F., JOULIN ET DE RACZCOWSKI. 1898, b. *Sur les microorganismes des vins dits tournés*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 126, págs. 1050-53.

BORDAS, F., JOULIN ET DE RACZCOWSKI. 1898, c. *Amertume des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc., tomo 126, págs. 1291-93.

BORDAS, F., JOULIN ET DE RACZCOWSKI. 1898, d. *Des microorganismes des vins tournés*. Comp. Rend. Ac. Sc., tomo 126, págs. 1443-46.

CETTOLINI, S. 1921. *Malattie dei vini* (tercera ed.). Ulrico Hoepli. Milán.

COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC OF THE SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. *Manual of methods for pure culture study of Bacteria*. Copyright, 1923, 1926, 1930. Geneva. N. York.

DE ROSSI, G. 1917. *I micodermi del vino*. Le Staz. Sper. Agr. Ital., vol. 50 (fase 11-12), págs. 529-62.

DE ROSSI, G. 1927. *Microbiologia Agraria e Tecnica*. Unione Tipografico Editrice Torinese. Turín.

DUBOURG, E. 1912. *Recherches sur le ferment mannitique*. Ann. Inst. Past., tomo 26, págs. 923-31.

DUCLAUX, E. 1893. *Sur le vieillissement des vins*. Ann. Inst. Past., tomo 7, págs. 537-43.

DUCLAUX, E. 1901. *Trailé de Microbiologie*, tomo IV. Masson Cie. Editeur. París.

FABRE, J. H. ET BREMOND, E. 1931. *Le dosage de l'acide lactique dans les vins*. Ann. Fals. Fraud., tomo 24 (Nº 274), págs. 474-77.

FUHR, C. VON DER HEIDE MAYRHOFER Y F. SCHMITTHENNER. *Cap. Vino* en Química de Muspratt. Gran enciclopedia de Química Industrial, tomo IV. Editor Francisco Seix. Barcelona.

GASPARINI, A. 1914. *Sulla determinazione quantitativa dell'acido lattico nei vini*. Le Staz. Sper. Agr. Ital. vol. 47, págs. 752-75.

GAUTIER, A. 1878. *Sur une maladie non encore décrite des vins du midi de la France dits vins tournés*. Comp. Rend. Ac. Sc., tomo 86, págs. 1338-41.

GAYON, U. ET DUBOURG, E. 1894. *Sur les vins mannités*. Ann. Inst. Past., tomo 8, págs. 108-16.

GAYON, U. ET DUBOURG, E. 1901. *Nouvelles recherches sur le ferment mannitique*. Ann. Inst. Past., tomo 15, págs. 526-69.

GAYON, U. ET DUBOURG, E. 1904. *Sur la fermentation mannitique*. Ann. Inst. Past., tomo 18, págs. 385-86.

HUGHES, E. ET CHEVALIER, R. 1930. *L'acidité lactique de quelques vins de l'Herault*. Ann. Fals. Fraud., tomo 23, págs. 214-16.

ISOLA, U. 1903. *Análisis de los mostos y vinos en la Provincia de Mendoza*. En: Informes Comisión de Investigación Vitivinícola. An. Min. de Agric. de la Nac. tomo I (nº 1), págs. 147-74.

JORGENSEN, A. 1925. *Microorganisms and fermentation* (5ª ed.). Charles Griffin and Co. Lim. London.

KAYSER, E. 1911. *Sur la graisse des cidres*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 152, págs. 1422-24..

KAYSER, E. 1913. *Contribution a l'étude de la bière visqueuse*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 156, págs. 1266-68.

KAYSER, E. 1925. *Microbiología Agrícola* (traduc. 4ª ed. franc.). Salvat editores S. A. Barcelona.

KAYSER, E. Y DELAVAL. 1927. *Contribution a l'étude des vins amers*. Rev. Vit. tomo 67, págs. 277-82.

KAYSER, E. ET MANCEAU, E. 1906 a. *Sur la maladie de la graisse des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 142, págs. 725-27.

KAYSER, E. ET MANCEAU, E. 1906 b. *Sur la graisse des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 143, págs. 247-48.

KAYSER, E. ET MANCEAU, E. 1908. *Sur la graisse des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 146, págs. 92-94.

KAYSER, E. ET MANCEAU, E. 1909. *Sur les ferments de la graisse des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 149, págs. 740-42.

KROEMER, K. *Fehler und Krankheiten des Weines*. En: LAFAR F. Handbuch der Technischen Mykologie. Tomo V, cap. 18, págs. 495-538. Gustav Fischer. Jena, 1905-14.

KROEMER, K. *Hauptgärung und Nachgärung des Weines*. En: LAFAR F. Handbuch der Technischen Mykologie. Tomo V, cap. 17, págs. 423-94. Gustav Fischer, Jena, 1905-14.

LABORDE, J. 1898. *Sur les ferments des maladies des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 126, págs. 1223-26.

LABORDE, J. 1904. *Sur les ferments de la maladie des vins poussés ou tournés*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 138, págs. 228-31.

LABORDE, J. 1917. *Méthode nouvelle de séparation et de dosage des acides lactique, succinique et malique contenus dans les vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 165, págs. 793-95.

LABORDE, J. 1917 a. *Sur la constitution de l'acidité des vins sains et des vins malades*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 165, págs. 1017-20.

LABORDE, J. 1917 b. *Contribution a l'étude des aldéhydes du vin*. Ann. Ins. Past. Tomo 31, págs. 215-52.

LAVENIR, P. y LAVENIR, J. 1905. *Contribución al estudio de la composición de los vinos de la República Argentina. Provincia de Mendoza*. An. Min. Agr. de la Nac. Tomo III (nº 2), págs. 132 y sig.

LAVENIR, J. y SIMOIS, D. L. 1903. *El cultivo de la viña y la elaboración del vino en la provincia de Mendoza*. En: Informes Comisión de Investigación Vinícola. An. Min. Agr. de la Nac. Tomo I (nº 1), págs. 113-146.

MANCEAU, E. 1907. *Sur le Coccus anomalous et la maladie du bleu des vins de Champagne*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 145, págs. 352-54.

MATHIEU, L. 1928. *Sur l'amertume des vins*. Rev. Vit. Tomo 68 (I), págs. 74-79.

MAZÉ, P. ET PACOTTET, P. 1904. *Recherches sur les ferments des maladies des vins*. Ann. Inst. Past. Tomo 18, págs. 245-63. (Rev. Vit., 1904, tomo 21).

MAZÉ, P. ET PACOTTET, P. 1907. *Sur les ferments des maladies des vins et spécialement sur le Coccus anomalous et la maladie du bleu des vins de Champagne*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 145, págs. 141-43.

MAZÉ, P. ET PERRIER, A. 1903. *Sur la production de manite par les ferments des maladies des vins*. Ann. Inst. Past. Tomo 17, págs. 587-98.

MENSIO, C. E GARINO-CANINA, E. 1914. *Origine, quantità e significato dell'acido lattico in alcuni vini italiani*. Le Staz. Sper. Agr. Ital. Vol. 47, p. 385-409.

MESTREZAT, W. 1906. *Dosages de l'acide malique et de quelques acides fixes dans les jus fermentés ou non*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 143, págs. 185-86.

MICHEL, A. 1931. *Dosage de l'acide lactique dans les vins*. Ann. Fals. Fraud. Tomo 24 (Nº 274), págs. 471-74.

MÜLLER-THURGAU, H. UND OSTERWALDER, A. 1913. *Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen*. Centralb. für Bak. II abt. tomo 36 (foll. 210 págs.). G. Fischer. Jena.

MÜLLER-THURGAU, H. UND OSTERWALDER, A., 1917. *Weitere Beiträge zur Kenntnis der Mannitbakterien im Wein*. Centralb. für Bak. II abt. tomo 48, pág. 1-35.

MÜLLER-THURGAU, H. UND OSTERWALDER, A. 1919. *Ueber die durch Bakterien verursachten Zersetzung von Weinsäure und Glycerin im Wein*. Landw. Jahrb. der Schweiz. Tomo 33, págs. 313-61.

ORLA-JENSEN, S. 1919. *The lactic acid bacteria*. Memórias de la Academia

Real de Ciencias y Letras de Dinamarca. Copenhague. Sección de Ciencias, 8ª serie, 5 (2): 81-196. 51 lám.

PACOTTET, P. 1911. *Vinificación en la Provincia de Mendoza*. J. B. Bailliere e hijos. París.

PARÍS, G. 1907. *Acido lattico nei vini*. Le Staz. Sper. Agr. Ital. Vol. 40, págs. 689-720.

PARÍS, G. 1909. *Su alcuni prodotti dell'attività batterica dei fermenti mannitici*. Le Sta. Sper. Agr. Ital. Vol. 42 (fasc. VII), págs. 437-57.

PARÍS, G. 1931. *Principi teorici di Tecnica Agraria*. I. I. Industria Enológica, Stabilimento Tipografico G. Benucci. Perugia.

PASTEUR, L. *Etudes sur le vinaigre et sur le vin*. Tomo III de: Oeuvres de Pasteur, 1924, Masson et Cie. París.

ROSENTHIEL, A. 1908. *Du rôle de la fermentation de l'acide malique dans la vinification*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 147, págs. 150-153.

SANNINO, F. A. 1925. *Tratado de Enología*. (Trad. de la 2ª ed. ital.). Gustavo Gili, Editor.

SEMICHON, L. 1905. *Traité des maladies des vins*. Coalet et fils. Libr. Edit., Montpellier. Masson et Cie. Libr. Edit. París.

SEMICHON, L. ET FLANZY, M. 1930. *Etude des substances acides entrant dans la composition des vins*. 1er. Mem. Ann. Fals. Fraud. Tomo 23, págs. 5-19.

SEMICHON, L. ET FLANZY, M. 1931. *Etude des substances acides entrant dans la composition des vins*. 2eme. Mem.: Les acides volatiles. Ann. Fal. Fraud. Tomo 24, págs. 516-34.

SORIANO, S. 1935. *Dispositivo sencillo para micromanipulaciones*. Physis (Rev. Soc. Arg. Cienc. Nat.). Tomo XI, págs. 393-98.

TRILLAT, A. 1903. *L'aldéhyde acétique dans le vieillissement et les altérations du vin*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 136, págs. 171-73.

TRILLAT, A. 1906. *Sur la maladie de l'amertume des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc., tomo 143, págs. 1244-47.

TRILLAT, A., 1908. *L'aldéhyde acétique dans le vin: son origine et ses effects*. Ann. Inst. Past. Tomo 22, págs. 704-19, 753-62 y 876-95.

TRILLAT, A., ET SANTON. 1910. *L'aldéhyde acétique est il un produit normal de la fermentation alcoolique? II. Rôle des levures dans la formation de l'aldéhyde acétique en milieu alcoolique. III. Sur la disparition de l'aldéhyde acétique en présence des levures*. Ann. Inst. Past. Tomo 23, págs. 296, 302, 310.

VENTRE, J. 1925. *Du rôle de l'acidité réelle dans la préparation et la conservation des vins*. Charles Amat. Ed. París. Libr. Coulet. Montpellier.

VENTRE, J., 1931. *Traité de Vinification. II. Le vin, ses maladies, sa conservation*. Libr. Coulet, A. Dubois et R. Poulain. Montpellier.

VOISENET, E. 1910 a. *Sur la recherche de l'hexaméthylène-tétramine dans les moûts et les vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 150 págs. 879-82.

VOISENET, E., 1910 b. *Formation d'acroleïne dans la maladie de l'amertume des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 150, págs. 1614-16.

VOISENET, E., 1910 c. *Nouvelles recherches sur les vins amers et la fermentation acrylique de la glycérine*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 151, págs. 518-20.

VOISENET, E. 1911 a. *Sur un ferment d'amertume des vins agent de déshydratation de la glycérine*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 153, págs. 363-5.

VOISENET, E. 1911 b. *Considération nouvelles sur la maladie de l'amertume des vins dans ses rapports avec la fermentation acrylique de la glycérine*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 153, págs. 808-900.

VOISENET, E. 1913. a. *Nouvelles recherches sur un ferment des vins amers*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo. 156, págs. 1181-82.

VOISENET, E. 1913 b. *Le ferment de l'amertume des vins consomme-t-il la crème de tartre?* Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 156, págs. 1410-12.

VOISENET, E. 1914 a. *Sur un ferment contenu dans les eaux agent de déshydratation de la glycérine*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 158, págs. 195-97.

VOISENET, E. 1914 b. *Nouvelles recherches sur un ferment contenu dans les eaux agent de déshydratation de la glycérine*. Comp. Rend. Ac. Sc. tomo 158, págs. 734-36.

VOISENET, E., 1914 c. *Sur un ferment contenu dans les eaux agent de déshydratation de la glycérine*. Ann. Inst. Past. Tomo 28, págs. 807-18.

VOISENET, E. 1918. *Sur une bacterie de l'eau vegetant dans les vins amers capable de déshydrater la glycérine, Glycero-reaction*. Ann. Inst. Pas. Tomo 32, 476-510.

VOISENET, E. 1929. *Nouvelles recherches sur la nature de la substance qui, dans la maladie de l'amertume des vins, produit le goût amer*. Comp. Rend. Ac. S. Tomo 188, págs. 941-43.

VOISENET, E. 1929. *Le divinil glycol considéré comme agent de la saveur amère dans la maladie de l'amertume des vins*. Comp. Rend. Ac. Sc., tomo 188, págs. 1271-73.

WARCOLLIER, G. ET LE MOAL ANG. 1932. *Présence accidentelle d'acroleine dans les eaux-de-vie de cidres*. Comp. Rend. Ac. Sc. Tomo 194, pag. 1394.

ÍNDICE ANALÍTICO

I. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE LAS ALTERACIONES MICROBIANAS DE LOS VINOS	157
a) Evolución del concepto de las alteraciones de los vinos	157
b) Las diversas alteraciones microbianas de los vinos	159
1. La flor del vino. La acetificación	159
2. La fermentación lactomanítica	161
3. El torcido	164
4. La fermentación maloláctica	167
5. La viscosidad, grasitud o ahilamiento	169
6. El amargo	170
7. Otras alteraciones	172
II. ANTECEDENTES ARGENTINOS	172
III. INVESTIGACIONES PROPIAS	176
IV. MÉTODOS SEGUIDOS EN LAS INVESTIGACIONES REALIZADAS	178
a) Métodos utilizados en las investigaciones químicas	178
b) Métodos utilizados en las investigaciones bacteriológicas	181
1. El aislamiento y cultivo de los bacterios de los vinos	181
2. El estudio en cultivo puro de los bacterios aislados	188
V. RESULTADOS OBTENIDOS	198
a) Los vinos estudiados. Su composición química y alteración	198
1. Vinos con fermentación lactomanítica	200
2. Vinos torcidos	203
b) Los bacterios aislados. Sus características y agrupación	205
c) Los bacterios aislados en relación al tipo de alteración de los vinos estudiados	208
VI. ESTUDIO EN PARTICULAR DE LOS BACTERIOS AISLADOS	211
a) <i>Bacterium Gayoni</i>	211
b) <i>Bacterium intermedium</i>	218
c) <i>Bacterium cocciforme</i>	227
d) <i>Bacterium Müller-Thurgau</i>	232
e) <i>Bacterium acidovorax</i>	237
f) <i>Micrococcus variococcus</i>	251
g) <i>Micrococcus multivorax</i>	259
h) <i>Bacterium rectiforme</i>	266
i) <i>Bacterium spec</i>	274

VII. COMENTARIOS SOBRE LOS BACTERIOS AISLADOS	278
a) Los bacterios maníticos	279
b) Los bacterios del torcido	283
c) Los micrococos malolácticos	286
VIII. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS BACTERIOS AISLADOS Y CLAVE PARA DETERMINAR LOS BACTERIOS DE LOS VINOS	288
IX. JUICIO DE VINOS CON ALTERACIONES BACTERIANAS	295
a) La catación	295
b) El análisis químico	297
c) La observación microscópica y el análisis bacteriológico	302
X. CONCLUSIONES	304
Resumen	309
Resumé	310
Bibliografía consultada	311

EXPLICACIÓN DE LAS LÁMINAS

LÁMINA 1

Aumento 1000 diámetros

- Fig. 1. — *Bacterium Gayoni*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.
 » 2. — *Bacterium intermedium*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, cepa *a*
 » 3. — » » » » » » *b*.
 » 4. — » » » » » » *c*.
 » 5. — » » » » » » *d*.
 » 6. — » » » » » » *e*.
 » 7. — » » » » » » *f*.
 » 8. — *Bacterium cocciforme* (n. spec.).
 » 9. — *Bacterium Müller-Thurgau* (n. spec.).

LÁMINA 2

Aumento 1000 diámetros

- Fig. 1. — *Bacterium acidovorax* (n. spec.) cepa *a*.
 » 2. — » » » » *c*.
 » 3. — » » » » *d*.
 » 4. — *Micrococcus variococcus*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, cepa *d*.
 » 5. — » » » » *e*.
 » 6. — *Micrococcus multivorax* (n. spec.) cepa *a*.
 » 7. — » » » » *b*.
 » 8. — *Bacterium rectiforme* (n. spec.)
 » 9. — » spec.

LÁMINA 3

Colonias. Aumento 40 diámetros

- Fig. 1. — *Bacterium Gayoni*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER.
 » 2. — *Bacterium intermedium*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, cepa *a*.
 » 3. — » » » » » » *b*.
 » 4. — » » » » » » *d*.
 » 5. — *Bacterium cocciforme* (n. spec.)
 » 6. — *Bacterium Müller-Thurgau* (n. spec.)

LÁMINA 4

Colonias. Aumento 40 diámetros

- Fig. 1. — *Bacterium rectiforme*, (n. spec.).
 » 2. — *Bacterium acidovorax* (n. spec.), cepa *a*.
 » 3. — *Micrococcus variococcus*, MÜLLER-THURGAU y OSTERWALDER, cepa *c*.
 » 4. — *Micrococcus multivorax* (n. spec.).

Extracto seco de un vino manítico

- Fig. 5. — Tamaño natural.
 » 6. — Aumentado cuatro diámetros.

