Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

# Mycobacteriën

https://hdl.handle.net/1874/306620

A. qu. 192,
1938.
4° portef.

# MYCOBACTERIËN

E. M. SOMERMEIJER

A. qu.
192

# MYCOBACTERIËN

A.4: 192, 1938.

# MYCOBACTERIËN

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. J. BOEKE, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 27 JUNI 1938, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

ELISABETH MARIE SOMERMEIJER

GEBOREN TE DJOKDJAKARTA

KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT
1938

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

TU DELFT
BIBLIOTHEEK DER
TECHNISCHE HOGESCHOOL

AAN HEN — HETZIJ NOG,
HETZIJ NIET MEER IN LEVEN —
DIE MIJ HET NAASTE ZIJN.

## INHOUD.


Blz.

INLEIDING ..... 1

HOOFDSTUK I ..... 4
Het bacteriemateriaal.

HOOFDSTUK II ..... 9
Het gedrag t.o.z. van stikstofhoudende voedingsbodems.

HOOFDSTUK III ..... 22
Het gedrag t.o.z. van koolhydraten en aanverwante verbindingen.

HOOFDSTUK IV ..... 30
Het gedrag t.o.z. van vetten en vetachtige lichamen.

HOOFDSTUK V ..... 37
Eenige andere eigenschappen.

HOOFDSTUK VI ..... 48
Vergelijkend onderzoek naar vorm en kleurbaarheid van Mycobacteriën in alkalischen en zuren 4 % glycerol-bouillon.

HOOFDSTUK VII ..... 91
Opvattingen over zuur- en zuuralcoholvastheid.

HOOFDSTUK VIII ..... 100
Het isoleeren.

HOOFDSTUK IX ..... 107
Algemeene beschouwingen aangaande de onderlinge verwantschap der Mycobacteriën.

SAMENVATTING ..... 119

LIJST VAN PERSOONSNAMEN ..... 125

# INLEIDING.

In 1897 gaf Chester aan de groep van bacteriën, welke in eigenschappen overeenkomst vertoonen met het in 1896 door Lehmann en Neumann beschreven geslacht Mycobacterium en waarvan Mycobacterium tuberculosis het prototype vormt, den familienaam Mycobacteriën.

Hiermede wenschte hij uit te drukken, dat de bedoelde micro-organismen een aantal kenmerkende eigenschappen bezitten, welke hij, als volgt, in „A manual of determinative bacteriolgy; 1901" omschreef:

Cells short or long cylindrical — clavate — cuneate in form, which at times may show true branching, or as long-branched myceliallike filaments. Filaments not surrounded by a sheath. Without endospores, but with the formation of gonidia-like bodies due to a segmentation of the cells. Division at right angles to the axis of a rod or filament.

Bergey gaf in zijn boek, met eenzelfden titel, als Chester's in 1934 de volgende omschrijving:

Straight or slightly curved rods, frequently irregular in form, but rarely filamentous and with only slight and occasional branching. Often stain unevenly. No conidia formed.

Niet minder dan acht genera worden tot deze familie gerekend, waaronder Mycobacterium en Corynebacterium, welke beide slank en onbewegelijk zijn, maar onderling verschillen, doordat het eerstgenoemde genus zuurvast, het andere niet zuurvast moet heeten.

Wanneer men het genus Mycobacterium opslaat, blijkt het, dat Bergey daarin 21 verschillende soorten vereenigd heeft, welke onderscheiden worden in parasitaire en in saprophytische soorten.

De ontdekking van de tuberkelbacterie in 1884 door Koch gaf den stoot tot het vinden van een aantal overeenkomstige organismen, welke de eigenschap van zuurvast te zijn met genoemde microbe deelden, echter geen van alle parasitair, maar uitsluitend saprophytisch leefden. Men is wel eens gewoon deze groep van

## INLEIDING.

In 1897 gaf Chester aan de groep van bacteriën, welke in eigenschappen overeenkomst vertoonen met het in 1896 door Lehmann en Neumann beschreven geslacht Mycobacterium en waarvan Mycobacterium tuberculosis het prototype vormt, den familienaam Mycobacteriën.

Hiermede wenschte hij uit te drukken, dat de bedoelde micro-organismen een aantal kenmerkende eigenschappen bezitten, welke hij, als volgt, in „A manual of determinative bacteriolgy; 1901" omschreef:

Cells short or long cylindrical — clavate — cuneate in form, which at times may show true branching, or as long-branched myceliallike filaments. Filaments not surrounded by a sheath. Without endospores, but with the formation of gonidia-like bodies due to a segmentation of the cells. Division at right angles to the axis of a rod or filament.

Bergey gaf in zijn boek, met eenzelfden titel, als Chester's in 1934 de volgende omschrijving:

Straight or slightly curved rods, frequently irregular in form, but rarely filamentous and with only slight and occasional branching. Often stain unevenly. No conidia formed.

Niet minder dan acht genera worden tot deze familie gerekend, waaronder Mycobacterium en Corynebacterium, welke beide slank en onbewegelijk zijn, maar onderling verschillen, doordat het eerstgenoemde genus zuurvast, het andere niet zuurvast moet heeten.

Wanneer men het genus Mycobacterium opslaat, blijkt het, dat Bergey daarin 21 verschillende soorten vereenigd heeft, welke onderscheiden worden in parasitaire en in saprophytische soorten.

De ontdekking van de tuberkelbacterie in 1884 door Koch gaf den stoot tot het vinden van een aantal overeenkomstige organismen, welke de eigenschap van zuurvast te zijn met genoemde microbe deelden, echter geen van alle parasitair, maar uitsluitend saprophytisch leefden. Men is wel eens gewoon deze groep van

microörganismen als pseudo- of, voornamelijk in de Fransche literatuur, als paratuberkelbacteriën aan te duiden. Vooral de laatstbedoelde benaming is minder gelukkig, omdat J o h n e en F r o t h i n g h a m in 1895 een bacterie ontdekten, welke zij Paratuberkelbacterie noemden en welke geen saprophyt, maar integendeel een parasiet bleek te zijn. Het is dit organisme, dat zij herkenden als de oorzaak van een hypertrophische en chronische enteritis bij runderen (J o h n e's ziekte), welke doorgaans met den dood eindigt. Mycobacterium paratuberculosis, hoewel naverwant aan de tuberkelbacterie, verschilt nochtans daarvan, doordat de microbe apathogeen is ten opzichte van cavia en konijn.

In het volgende wenschen wij ons tot een aantal vertegenwoordigers der Mycobacteriaceae te bepalen.

Het zijn alle slanke, polymorphe, onbewegelijke, asporogene, meer of minder zuurvaste, maar Grampositieve staafjes, dikwijls met endogene korrels en met de neiging zich meer of minder te vertakken.

Het is bekend, dat men drie verschillende vormen van de tuberkelbacterie kan onderscheiden, het zijn deze, die als het humane, het bovine en het aviaire type zijn aan te duiden, welke met de paratuberkelbacterie de groep der parasitaire Mycobacteriën der warmbloedige dieren helpen vormen.

Als parasieten van koudbloedige dieren zijn in B e r g e y's manual beschreven:

Mycobacterium piscium, marinum (beide in visschen), M. ranae (kikvorsch), M. tropidonatum, thamnopheos (beide uit slangen) en M. cheloneï (schildpad).

Of er in deze gevallen van werkelijke parasieten sprake is, is nog twijfelachtig, omdat het hier, volgens B. L a n g e, gevallen betroffen, waarin de gevonden, zuurvaste bacteriën uit de omgeving, o.a. het water, afkomstig zouden zijn. Het is evenwel de vraag of men een dergelijke opvatting wel altijd aanvaarden kan, omdat M. piscium en marinum, evenals M. tropidonatum en thamnopheos toch beschreven staan als in staat ziekelijke weefselveranderingen

bij visschen, kikvorschen, hagedissen en slangen teweeg te brengen.

Zeker saprophytisch zijn o.a.:

Mycobact. smegmatis (Alvarez en Tavel 1885), M. butyricum (Petri 1897), M. berolinensis (Rabinowitsch 1897), dikwijls tezamen met de voorgaande Petri-Rabinowitsch' boterbacterie genoemd,

M. stercusis (Moeller 1898), M. phleï (Moeller 1898), M. graminis (Moeller 1899), waaraan later nog anderen toegevoegd werden, o.a. de zgn. trompetbacterie van Jacobitz en Kayser (1910) en de kraanbacterie der waterleidingen van Brem (1909) en Beitzke (1910).

Tot deze groep dienen waarschijnlijk mede gerekend te worden de door Söhngen in 1913 beschreven petroleumbacteriën, waarvan ook de nieuwe soorten (rubrum, album, luteum en hyalinum) met den naam Mycobacteriën te benoemen zijn.

Waar een zoo groote verscheidenheid van zuurvaste staafjes bestaat, leek het ons gewenscht van een aantal vertegenwoordigers dier groep de eigenschappen nog eens nader te bestudeeren en onderling te vergelijken.

## HOOFDSTUK I.

### Het bacteriemateriaal.

De stammen, waarmede ik werkte, zijn afkomstig uit het „Institut Pasteur" te Parijs, hetwelk de volgende bijzonderheden opgaf. Ik voeg de desbetreffende literatuur, voor zoover van belang, hieraan toe.

*B. Boquet:*

Een cultuur door Boquet geïsoleerd uit een rund, lijdende aan runder-enteritis, en geënt op aardappel met Sauton-oplossing, waaraan toegevoegd een extract van B. phleï.

A. Boquet, Ann. inst. Pasteur 42 I, 495 (1928).
F. W. Twort en G. L. Y. Ingram, A monograph on Johne's disease 1913.
J. Mc. Fadyean, A. L. Sheather en J. T. Edwards, J. compar. Pathol. and Therap. 25, 217 (1912).

*B. Bruynoghe:*

Deze stam is afgezonderd door Bruynoghe en Adant uit een koud abces van een kind. De eerste overenting geschiedde 2 weken later op aardappel.

R. Bruynoghe en M. Adant, Compt. rend. soc. biol. 111, 1050 (1932).
Vgl. B. luteum Söhngen. Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 37, 598 (1913).
H. J. Tiedemann, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 122, 483 (1931).
M. Ota en S. Sato, Compt. rend. soc. biol. 107, 1062 (1931).

*B. Valtis et van Deinse* (type wit en type rood):

Stam Tétard, afkomstig uit sputum van een kind (1932).

J. Valtis, G. Paisseau en F. van Deinse. Compt. rend. soc. biol. 111, 300 (1932).

*Schildpadbacterie* = *Mycobact. cheloneï*, Bergey (Friedmann).

Deze komt oorspronkelijk uit het serotherapeutisch instituut te Milaan.

A. Saenz, Ann. inst. Pasteur 47, 4 (1931).
F. F. Friedmann, Deutsche med. Wschr. 26, 464 (1903) en Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 34, 647 (1903).

*B. Thomoff:*

Uit Bulgaarsche boter afgezonderd.

*B. Darier:*

Geïsoleerd uit darm van een kind.

Zie: C. Ninni, Compt. rend. soc. biol. 107, 615 (1931).

*B. Kedrowski:*

In 1925 geïsoleerd uit een lepralijder. Volgens Kedrowski is dit de verwekker van de lepra.

W. J. Kedrowski, Z. Hyg. 37, 52 (1901) en Revue tub. 11, 893 (1930), gerefereerd in: Centr. ges. Hyg. 25, 111 (1931).

*B. Ninni:*

Ninni kweekte dit organisme uit etter van een cavia, die intraganglionnair met een aviaire tuberkelbacterie ingespoten was.

C. Ninni, Compt. rend. soc. biol. 107, 1046 (1931).

Eveneens, maar zonder nadere aanwijzing, zijn afkomstig van het „Institut Pasteur":

*Timotheebact.* = *Mycobact. phleï,* Bergey (Moeller).
*Mestbact.* = *Mycobact. stercusis,* Bergey (Moeller).
*Grasbact. II* = *Mycobact. graminis,* Bergey (Moeller).
*B. Milch Moeller.*

Zie voor deze vier: A. Moeller in
Therap. Monatsh. 12, 607 (1898).
Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 25, 369 (1898) en 30, 518 (1901).
Berl. thierärztl. Wschr. 100 (1898).

*B. Grassberger.*

Münch. med. Wschr. 46, 341 (1899).

*B. Karlinski.*

Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 29, 521 (1901).

*B. Korn = Mycobact. friburgensis*, Bergey (Korn).

Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 25, 532 (1899) en 27, 481 (1900).

*B. Marpmann.*

Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 14, 229 (1893).

*B. Rabinowitsch = Mycobact. berolinensis*, Bergey (Rabinowitsch).

Z. Hyg. 26, 90 (1897).

*B. Mayeranne.*

Literatuur onbekend.

*B. Pellegrini.*

Zie: F. E. Haag, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 71, 1 (1929).

*Slangbacterie:*

W. K. Sibley, Virchow's Archiv 116, 104 (1889).
M. thamnopheos, J. D. Aronson. J. inf. Dis. 44, 214 (1929).

De genoemde microben vormen een heterogene groep der Mycobacteriën. Sommigen toch zijn buitengewoon zuur- en alcoholvast; van anderen, zooals *B. Bruynoghe, B. Grassberger, B. Thomoff* en *B. Pellegrini,* is zuurvastheid dikwijls nauwelijks aanwezig.

Ook ten opzichte van den groei op verschillende, gebruikelijke voedingsbodems bestaat groot verschil; vooral de door Valtis en v. Deinse geïsoleerde organismen munten uit door geen of een zeer slechte en langzame ontwikkeling; zij naderen daardoor sterk tot de tuberkelbacteriën.

Maar ook *B. Ninni* was zeer kieskeurig. Het gelukte mij eerst na een paar jaar het organisme op de gewone media tot groei te brengen. Deze microbe vertoonde nog een eigenaardigheid: Bij het allengs wennen aan alkalischen bouillon-agar zonder glycerol, als voedingsbodem, bleek deze bacterie, welke tot dusver uitsluitend witte en korrelige kolonies vormde, na 2 dagen bij 37° en daarna een maand bij kamertemperatuur te zijn bewaard, plotseling, dicht bij het condensatiewater, een oranje en vettige variëteit af te splitsen; het merkwaardige was tevens, dat deze variëteit zeer veel overeenkomst vertoonde met *B. Pellegrini,* welke in vele eigen-

schappen ver van alle anderen afstaat. Ik zal deze 2 soorten onderscheiden als:

*B. Ninni wit* en *B. Ninni oranje.*

Ook bij de meeste anderen kwam de overgang in een andere variëteit voor. Eénmaal zag ik *B. v. Deinse wit* (korrelig) overgaan in *B. v. Deinse rood* (glad), maar meestal bleef de verandering van het witte type uitsluitend beperkt tot de pigmentwijzigingen. Zoo werden ook de *slangbacterie* en *B. cheloneï*, na jaren wit te zijn geweest, vrij plotseling duidelijk rose, maar bleven daarbij korrelig.

Alle bacteriën veranderen de $p_H$ soms niet onaanzienlijk. De meesten zijn niet veeleischend. Onderling komen zij veelal ook in pigmentvorming overeen. Vooral op den voedingsbodem van Loewenstein is deze, na 1—2 dagen broeden bij 37° en daarna eenige maanden bij kamertemperatuur bewaren, zeer mooi waar te nemen. Chargaff[1]) analyseerde van drie organismen de kleurstoffen volledig: *B. phleï* bevat $\beta$- en weinig $\gamma$-caroteen en verder een xanthophyl; *B. Pellegrini* $\beta$- en $\gamma$-caroteen en een eveneens nog niet geïdentificeerd xanthophyl; *B. Grassberger* $\beta$- en $\gamma$-caroteen, lycopeen en een xanthophyl, hetwelk aan dat van *B. Pellegrini* herinnert, maar dieper van kleur is. In alle zuurvaste bacteriën vond Chargaff $\gamma$-caroteen. Trouwens Moeller[2]) vermeldde reeds, dat volgens een mededeeling van H. Ritter-Kristelli *B. phleï* carotenen bevat.

Alle bacteriën vormen, bij goeden groei, op vloeibare voedingsbodems een dikke, rimpelige huid, welke langs de wanden van buis of kolf omhoog kruipt; de vloeistof blijft daarbij helder.

*B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* echter maken òf slechts de vloeistof troebel, òf er ontstaat aan de oppervlakte een vlakke, vettige huid, welke evenwel niet opkruipt. Alle soorten ontwikkelen een eigenaardigen, onaangenamen, eenigszins aan amine herinneren-

---

[1]) E. Chargaff, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 119, 121 (1930) en Ann. inst. Pasteur 52, 415 (1934).

[2]) A. Moeller, Therap. Monatsh. 12, 607 (1898).

den reuk, geheel verschillend van den zoetigen der tuberkelbacteriën.

Tenslotte wil ik er nog even op wijzen, dat in de oude literatuur eenige namen niet naar den ontdekker, maar naar de vindplaats gegeven zijn. Zoo heet de bacterie van Rabinowitsch: M. berolinensis (gevonden in Berlijnsche boter) en die van Korn: M. friburgensis (in boter uit Freiburg); de eerst gevonden boterbacterie, die van Petri, heet eenvoudig: M. butyricum. De eerste grasbacterie van Moeller (M. phleï) is genoemd naar het gras, waar dit organisme het meest op voorkomt, nml. Phleum pratense of timotheegras en vandaar ook den naam: timotheebacterie.

## HOOFDSTUK II.

### Het gedrag t.o.z. van stikstofhoudende voedingsbodems.

LITERATUUROVERZICHT:

De eerste onderzoekers (Rabinowitsch, Grassberger, Moeller, Korn[1])) vermeldden zwakke indoolvorming in alkalischen glycerol-bouillon; over peptonwater schreven zij niet. Karlinski[1]), eveneens in het eerstgenoemde milieu kweekend, berichtte: „Indolbildung konnte nicht sicher nachgewiesen werden."

Van Fransche zijde (Boquet, Saenz, Bruynoghe[1])) werd van indoolvorming geen melding gemaakt. Eichbaum[2]), Braun en mw.[3]) vonden geen indool (zie ook beneden).

Voor zoover vermeld, zijn al deze onderzoekers het eens over het niet vervloeien van alkalische bouillon-gelatine en over het niet coaguleeren van melk.

Mededeelingen, omtrent het gedrag dezer microben t.o.z. van andere stikstofhoudende verbindingen, vindt men slechts zeer weinig.

*B. phleï* en *cheloneï* zijn de eenige, welke uitvoeriger onderzocht zijn. Namelijk door Braun en mw. en wel t.o.z. van tryptophan in den vorm van den trypsinase-voedingsbodem volgens Frieber (0,02 % trypsinase in bouillon oplossen, chloroform en tolueen toevoegen, 24—48 uur bij 37° filtreeren, verdunnen met 3 deelen physiologische keukenzoutoplossing).

Door *B. phleï* ontstond hierop slechts een dun huidje, terwijl geen indool aangetoond kon worden. Op een 0,5 % tyrosine-oplossing met eenige zouten, waarin het aminozuur als uitsluitende koolstof- en stikstofbron dienst deed, duurde de vorming van een

---

[1]) Zie hoofdstuk I.

[2]) F. Eichbaum, Ergebn. Hyg. 15, 756 (1934).

[3]) Biochem. Z. 145, 381 (1924) en 146, 575 (1924).

huidje zeer lang; of hierbij phenol ontstond, gingen zij niet na. Eveneens merkten zij moeilijke huidvorming op glycine en urinezuurnatrium op.

*B. cheloneï* assimileerde de drie genoemde verbindingen niet.

Op natriumglutaminaat namen Braun en mw. een beteren groei waar, maar vooral goed ontwikkelden *B. phleï* en *cheloneï* zich op een alanine-oplossing.

Verder vermeldden de onderzoekers nog het niet ontstaan van tryptische fermenten op Loeffler's serum, hetwelk door *B. phleï* met een helgeel en door *B. cheloneï* met een vuilwit, dik beslag bedekt werd. Ook Eichbaum vond onder eigen en vreemde stammen geen, welke dit serum vervloeide. Hij schreef verder, dat ook volgens Loewenstein alle zuurvaste saprophyten eiwit- (en ook vet- en suiker-)splitsende fermenten missen.

Op agarplaten met gewasschen roode bloedlichaampjes van een konijn vertoonde *B. cheloneï* na 7 dagen goeden groei, maar geen haemolyse, terwijl Braun en mw. 2—3 dagen na enting met *B. phleï* wel haemolyse waarnamen.

EIGEN ONDERZOEKINGEN:

Alle stammen groeien op alkalische *bouillon-gelatine,* zij het dan ook zeer schraal, en wel in den steek, juist onder de oppervlakte; aan de oppervlakte zelf uitstekend (aërobe organismen!). De toevoeging van 4 % glycerol is vooral voor de ontwikkeling der twee Valtis en v. Deinse soorten gunstig, maar ook hier zeer weinig groei in den steek. Door hun groei bij 22° bewijzen de beide genoemde bacteriën, dat zij geen tuberkelbacteriën der warmbloedige dieren zijn, ondanks het feit, dat ze zich uitermate traag ontwikkelen. Geen enkele soort doet, zelfs na een maand, de gelatine vervloeien, hetgeen in overeenstemming is, zoowel met de oude, als met de nieuwe opgaven der literatuur.

Een dergelijke overeenstemming heerscht ook t.o.z. van Loeffler's *serum,* hetwelk ook ik evenmin vervloeid vond. Het is, evenals de alkalische bouillon-gelatine, een zeer goede voedingsbodem; zelfs groeien hierop de Valtis en v. Deinse bacteriën, zij het ook niet zoo weelderig.

Op *schapenbloedagar* nam ik nergens haemolyse waar (in tegenstelling met Braun en mw., ook niet bij *B. phleï*). De bacteriën ontwikkelen zich hierop echter niet zoo goed als op de twee reeds genoemde voedingsbodems, hetgeen zich ook uit in een geringere pigmentvorming.

Zoowel op alkalischen als op zuren *bouillon*, event. met 4 % glycerol, ontwikkelen alle zich goed. In den bouillon vormen ze in meerdere of mindere mate $H_2S$, hetgeen ik aantoonde door een papiertje, in loodacetaat gedrenkt, boven in de buis tegen de wattenprop aan te brengen.

*Peptonwater*, waarover in het volgende hoofdstuk nader geschreven zal worden, bleek een vrij slechte voedingsbodem te zijn.

Hierop onderzocht, nam ik na 4 weken, evenals na 1 week, een negatieve reactie op indool waar. Deze voerde ik uit volgens de Graaff[1]):

10 $cm^3$ peptonwater mengen met 5 $cm^3$ geconc. HCl (s.g. 1,19) en hierop zeer voorzichtig 2 $cm^3$ p-dimethylaminobenzaldehyde-oplossing (reagens van Ehrlich) schenken; sporen indool ($1 : 10^7$) geven nog een violetrooden ring.

Daar tryptophan meestal gemakkelijker af te breken is dan pepton zette ik het onderzoek voort met een tryptophanoplossing van de volgende samenstelling:

0,15 % $K_2 H PO_4$,
0,05 % $K H_2 PO_4$,
0,1 % $MgSO_4 . 7 H_2O$,
0,5 % NaCl en
0,06 % l-tryptophan (Fraenkel en Landau).

De $p_H$ was 7,0. Om eventueele ontleding zeker te voorkomen, filtreerde ik ter sterelisatie, deze oplossing door een Seitz-filter en onderzocht het filtraat op steriliteit. Geënt met *B. Rabinowitsch* en *B. Thomoff* waren hierop na één maand slechts dunne huidjes ontstaan, terwijl de oplossingen nog dezelfde, zeer lichtbruine kleur hadden; de $p_H$ vond ik onveranderd. De ringreactie op indool was

[1]) W. C. de Graaff, Tijdschr. vergel. Geneesk. 4, 157 (1919).

van de geënte vloeistoffen even zwak als die van de blancoproef. Evenzoo bleek dit het geval met de reactie van Salkowski[1]) (zoutzuur en zeer verdund ferrichloride) op β-indolylazijnzuur. Indien deze verbinding gevormd was, zou — althans na verwarming — een duidelijk kersroode kleur ontstaan.

Ook β-indolylpropionzuur bleek afwezig, daar de oplossing met een geconcentreerde kaliumnitrietoplossing en aangezuurd met eenig azijnzuur geen fijne naalden van de nitrosoverbinding deed ontstaan (reactie van Nencki[2])).

Uit deze resultaten is te besluiten, dat noch indool, noch indolylazijn- of -propionzuur gevormd zijn.

Anders wordt het echter, indien aan de genoemde oplossing nog *bovendien 0,5 % natriumlactaat* wordt toegevoegd.

De cultuurvloeistof kleurde zich in dit geval duidelijk bruin, de huid was vrij dik en de $p_H$ (oorspronkelijk 6,6) na één maand gestegen tot 9.0 voor *B. Thomoff,*

9,2 voor *B. Rabinowitsch, B. Milch Moeller, B. graminis* en

8,6 voor *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje.* .

Na verwarming met geconc. HCl werd de kleur van alle culturen meer roodachtig, terwijl de blancoproef lichtgeel bleef.

Nitriet bleek in deze gele culturen aanwezig en wel zoo sterk, dat met Griess-Romijn en na ongeveer 4 × verdunnen de vloeistoffen, behalve die van de blancoproef, reeds na ½ min. intensief rood werden.

Daar β-indolylazijnzuur met zoutzuur en nitriet een roode kleur geeft, was de aanwezigheid van het genoemde zuur mogelijk. Deze mogelijkheid werd nog grooter door den positieven uitslag der reactie van Salkowski. De reactie was in den met *B. Thomoff* geënten voedingsbodem minder intensief, dan in den met *B. Rabinowitsch, B. graminis* en *B. Milch Moeller* geënten, maar steeds sterker dan in de blancoproef; daarentegen slechts weinig sterker in de met *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* geënte vloeistof.

---

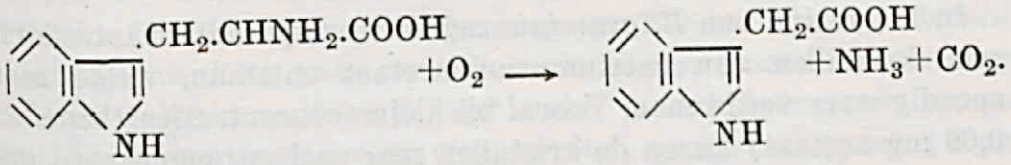
[1]) E. Salkowski, Z. physik. Chem. 9, 23 (1885).

[2]) Nencki, Montsh. Chem. 10, 506 (1889).

De ringreactie op indool vond ik, in vergelijking met de blancoproef, bij *B. Rabinowitsch, B. graminis* en *B. Milch Moeller* even zwak; bij *B. Thomoff, B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* kon ik zelfs zoo goed als geen ring waarnemen. Zie voor de laatstgenoemden eveneens blz. 16 (tyrosine met lactaat).

De reactie op β-indolylpropionzuur gaf steeds een negatief resultaat.

In de cultuurvloeistof vindt dus door *B. Rabinowitsch, B. graminis* en *B. Milch Moeller* en in mindere mate door *B. Thomoff* en in nog veel mindere mate door *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* de volgende reactie plaats:




De stijging van de pH zal te danken zijn aan het vrijkomen van ammoniak.

Analoog aan die op blz. 11 bereidde ik voedingsbodems met de aminozuren: glycine (0,5 %), d-alanine (0.05 %) en l-tyrosine (0,06 %). Zooals ik reeds in het literatuuroverzicht schreef vonden Braun en mw., dat glycine zeer ongeschikt was om als eenige stikstof- en koolstofbron te dienen; toevoeging van 0,5 % natriumlactaat verhoogde den groei aanmerkelijk. Beide feiten kon ik bevestigen. Het leek mij echter gewenscht de bacteriën ook op dezelfde zouten *zonder* een aminozuur, maar wel met het lactaat te enten; dit milieu voldeed iets beter, maar stond toch ver ten achter bij dat met glycine en lactaat beide.

*d-Alanine* bleek ook zonder lactaat een goede voedingsbodem te zijn behalve voor de twee v. Deinse stammen. Toch was de gunstige invloed van het lactaat, vooral op *B. Thomoff, B. cheloneï, B. Grassberger* en *B. Bruynoghe,* wel degelijk te merken.

Als de reactie in het alaninemilieu verloopt, zooals in dat met tryptophan, kan men azijnzuur verwachten. Om dit na te gaan

entte ik *B. graminis* en *B. Mayeranne* op 50 cm³ van genoemde vloeistof zonder lactaat ($p_H$ 7,0). Na een maand bij 37° gestaan te hebben was de $p_H$ in beide gevallen tot 8,2 gestegen. Ik bracht toen de vloeistof in een Kjeldahlkolf, voorzien van een spathelm, maakte met 4 N zwavelzuur juist zuur op congopapier, voegde magnesiumsulfaat [1]) toe en stoomde over. Het destillaat titreerde ik met 0,1 N natriumhydroxyde en dampte daarna droog. Het residu onderzocht ik microchemisch met natriumuranylformiaat volgens Krüger en Tschirch [2]) op azijnzuur.

Het overgestoomde van de blanco had ter neutralisatie noodig: 2,4 cm³ 0,1 N loog; van *B. graminis* en *B. Mayeranne* resp. 9, 4 en 7,0 cm³.

In het residu van *B. graminis* zag ik zeer sporadisch tetraëdrische kristallen van natriumuranylacetaat ontstaan, welke zeer spoedig weer verdwenen. Vooral bij kleine concentraties (beneden 0,09 mg acetaat) lossen de kristallen zeer snel op; omgekeerd gebruikt (dus op natrium) is het reagens veel gevoeliger: volgens Schoorl [3]) 0,0001 mg. Om deze redenen is het niet te verwonderen, dat ik de tetraëders in de drooggedampte rest van *B. Mayeranne* (volgens de titratie ook minder vluchtig zuur overgestoomd!) niet kon vinden.

Later zette ik nog eenige proeven in, nu met en zonder 0,5 % natriumlactaat; ik entte telkens 50 cm³ met *B. Rabinowitsch* en *B. Thomoff*. Na een maand broeden was de $p_H$ van beide zonder lactaat gestegen tot 8,4; met lactaat tot resp. 9,4 en 9,2.

De overgestoomde cultuur van *B. Rabinowitsch* zonder lactaat titreerde ik met 7,7 cm³ en die met lactaat met 4,0 cm³ loog. Voor *B. Thomoff* waren deze cijfers resp. 6,7 en 7,7 cm³. In geen der 4 gevallen kon ik tetraëders ontdekken.

Wat de veranderingen op de voedingsbodems met *l-tyrosine* aangaat het volgende:

Hierbij doen zich twee moeilijkheden voor, namelijk:

---

[1]) W. H. Olmsted en mw., J. biol. Chem. 85, 109 (1929—1930).
[2]) D. Krüger en T. Tschirch, Mikrochemie 7, 320 (1928).
[3]) N. Schoorl, Z. anal. Chem. 48, 593 (1909).

1. dat de reactie volgens Millon op phenol ook door tyrosine en de aromatische oxyzuren gegeven wordt, dus niet bruikbaar wordt!
2. dat deze reactie niet zeer gevoelig is.

De eerste moeilijkheid heb ik omzeild door over te stoomen, daar tyrosine en p-oxyphenylpropion- en -azijnzuur niet met waterdamp vluchtig zijn (phenol daarentegen wel) en de tweede door gebruik van het veel gevoeliger reagens van Folin en Ciocalteu[1]) te gebruiken.

Dit reagens wordt als volgt bereid:

Los 100 g natriumwolframaat en 25 g natriummolybdenaat op in 700 cm³ water in een kolf van 1½ l met terugvloeikoeler. Voeg hieraan 50 cm³ 85 % phosphorzuur en 100 cm³ geconcentreerd zoutzuur toe, kook zachtjes gedurende 10 uur, koel af en en voeg nu 150 g lithiumsulfaat, 50 cm³ water en 4 à 6 druppels broom toe. Kook overmaat broom weg, verdun, na afkoeling, tot 1 l en filtreer.

De vloeistof moet een goudgele kleur hebben (geen groenachtige tint).

Daar mij later bleek, dat dit reagens zóó gevoelig is, dat ook de blanco er even, maar duidelijk mee kleurde, besloot ik semi-quantitatief te werken.

Ik entte op den tyrosine-voedingsbodem zonder lactaat ($p_H$ 6,8 en door een Seitz filter gefiltreerd) *B. Rabinowitsch, slangbacterie, B. Bruynoghe* en *B. Thomoff*. Na een maand vond ik de $p_H$ en kleur van de culturen onveranderd. Er waren slechts dunne vliesjes gegroeid.

20 cm³ maakte ik met een paar druppels 10 % sodaoplossing alkalisch, leidde stoom door (zie voor het toestel bij alanine), ving 10 cm³ op, voegde hierbij 0,3 cm³ onverdund reagens en 3 cm³ verzadigde sodaoplossing en vergeleek na eenige uren, daar de kleur niet dadelijk het maximum bereikt. De aldus verkregen zeer lichtblauwe kleur bij de eerste 3 stammen stond maar zeer weinig, die van *B. Thomoff* belangrijk achter bij die van de blancoproef.

---

[1]) Zie H. D. Kay en W. R. Graham, J. dairy Research 6, 191 (1935).

Na daarna 1 liter overgestoomd te hebben, maakte ik met 4 N zwavelzuur zuur op congo, ving weer 10 cm³ destillaat op en voegde reagens en soda als boven toe. Nu werd de kleur van de blanco iets overtroffen door die van *B. Rabinowitsch* en de *slangbacterie,* terwijl die van *B. Bruynoghe* nagenoeg gelijk en die van *B. Thomoff* veel zwakker was.

Toen ik eenige maanden later culturen van de *slangbacterie, B. graminis, B. Rabinowitsch, B. Thomoff, B. Grassberger, B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* op tyrosine-oplossing met lactaat te verwerken had, paste ik, om grootere concentraties te verkrijgen, een andere methode toe:

10 cm³ alkalisch gemaakt met 0,5 cm³ 10 % sodaoplossing, waarna ik 3 maal met 20 cm³ aether uitschudde, de aetherische extracten met 10 cm³ water bij elkaar voegde en de aether liet verdampen.

Vervolgens voegde ik aan de reeds alkalisch uitgeschudde vloeistoffen 0,5 cm³ 20 % $H_2$ $SO_4$ toe, schudde eveneens 3 maal met 20 cm³ aether uit en dampte de aether van de extracten met 10 cm³ water af.

Hiervan en van het residu der alkalische extracties nam ik 4 cm³ en vergeleek na eenige uren de kleuren na toevoeging van 1 cm³ verzadigde sodaoplossing en 0,4 cm³ reagens met de eveneens aldus behandelde blancoproef (phenol en oxycarbonzuren geven zelfde reactie).

Phenol scheen, evenals bij het onderzoek op indool, niet gevormd te zijn, gezien het feit, dat de lichtblauwe kleur der alkalische extracten van de *slangbacterie, B. graminis, B. Rabinowitsch* en *B. Grassberger* na toevoeging van het reagens overeenkwam met die van de blancoproef; die van *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* was zoo goed als kleurloos en die van *B. Thomoff* wel wat sterker dan van deze, maar slechts ¼ van die van de blancoproef.

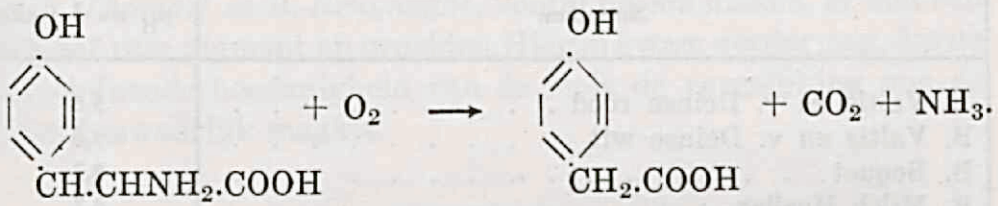
Het zure extract van *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* kleurde slechts iets sterker,

dat van *B. Grassberger* 3 ×,

dat van *B. Thomoff* 4 ×,

dat van *B. graminis, B. Rabinowitsch* en *slangbacterie,* 10 × zoo sterk als dat van de blancoproef.

Dit wil dus zeggen, dat door alle stammen (door *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* bijna niet) p-oxyphenylazijnzuur gevormd is in overeenstemming met de vorming van β-indolylazijnzuur uit tryptophan:




Uit de geelbruine verkleuring en de stijging van de $p_H$ viel reeds op te maken, dat er — in tegenstelling tot de vloeistof zonder lactaat — iets gebeurd moest zijn.

De $p_H$ steeg van 6,8 voor *B. Grassberger* tot 8,3,
voor *B. Pellegrini, B. Ninni oranje* en *B. Thomoff* tot 9,0 en
voor *B. graminis, B. Rabinowitsch* en *slangbacterie* tot 9,2.

De kleinere stijging door de eerste bacterie weerspiegelt zich in de kleinere hoeveelheid gevormd p-oxyphenylazijnzuur. Waaraan echter het uitzonderlijke gedrag van *B. Thomoff*, maar vooral van *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje*, toe te schrijven is, zoowel in de tryptophan- als in de tyrosine-oplossing, durf ik niet met zekerheid te schrijven; mogelijk aan een verder gaande oxydatie.

Tenslotte gebruikte ik als laatste aminozuur nog het *d-glutaminezuur*, echter slechts om groei en $p_H$ verandering na te gaan. Alle stammen, behalve die van Valtis en v. Deinse (geen groei!), konden hierop slechts een dun huidje, in de meeste gevallen zonder pigment, ontwikkelen.

De samenstelling was als volgt [1]):

0,5 % ammoniumglutaminaat,
0,05 % secund. ammoniumphosphaat en
0,05 % magnesiumsulfaat.

De $p_H$ steeg na 3 weken van 5,8 tot boven de 8, zooals uit achterstaande tabel te zien is; slechts *B. Pellegrini, B. Ninni wit* en *oranje* bleven er beneden.

---

[1]) T. Folpmers, Ant. v. Leeuwenh. 2, 345 (1935).

TABEL I.

**$p_H$ verandering na 3 weken in een d-glutaminezuurhoudenden voedingsbodem ($p_H$ 5,8):**

| Stammen | $p_H$ na 3 weken |
|---|---|
| B. Valtis en v. Deinse rood | 5,8 |
| B. Valtis en v. Deinse wit | 5,8 |
| B. Boquet | 8,7 |
| B. Milch Moeller | 8,7 |
| B. graminis Moeller | 8,7 |
| B. phleï Moeller | 8,6 |
| B. stercusis Moeller | 8,5 |
| B. berolinensis Rabinowitsch | 8,5 |
| B. friburgensis Korn | 8,6 |
| B. Marpmann | 8,7 |
| B. Karlinski | 8,7 |
| B. Darier | 8,6 |
| B. Mayeranne | 8,6 |
| B. Kedrowski | 8,7 |
| Slangbacterie | 8,4 |
| B. cheloneï | 8,5 |
| B. Bruynoghe | 8,4 |
| B. Thomoff | 8,4 |
| B. Grassberger | 8,5 |
| B. Pellegrini | 6,6 |
| B. Ninni oranje | 6,4 |
| B. Ninni wit | 8,2 |

Als laatste stikstofhoudende voedingsbodem koos ik nog de *centrifuge*-(tapte)-*melk*. Ook hierop kon ik, ofschoon in de literatuur als gunstig voor den groei bekend staand, de organismen van Valtis en v. Deinse niet kweeken. Na een paar dagen begon de melk door de andere stammen meer doorschijnend te worden. Eenigen tijd later bepaalde ik den zuurgraad en het formaldehydegetal. Daartoe titreerde ik 20 cm³ met 0,1 N natronloog en phenolphtaleïen als indicator tot juist roodkleurig, voegde daarna 5 cm³ op phenolpht. geneutraliseerde 40 % formaldehydeoplossing toe en titreerde weer met loog tot juist rood.

De kleuromslag vond ik buitengewoon moeilijk te zien; ook de toevoeging van 10 druppels van een 0,01 % alcoholische oplossing van methylgroen [1]) hielpen mij niets. De omslag werd nog bemoeilijkt door het feit, dat *B. Pellegrini, B. Ninni oranje, B. Grassberger, B. Thomoff en B. Bruynoghe,* vooral na een maand, er met een intensief rose pigment op groeiden. Hierbij kwam verder nog, dat de doorschijnende hoedanigheid van de melk de vergelijking met de blanco bezwaarlijk maakte.

TABEL II.

| Stammen | Zuurgraad (aantal cm³ 0,25 N loog per 100 cm³ melk) | | Formaldehydegetal | |
|---|---|---|---|---|
| | Na 5 dagen | Na 19 dagen | Na 5 dagen | Na 19 dagen |
| Blanco | 6,76 | 6,64 | 7,00 | 7,04 |
| B. Mayeranne | 0,44 0,32 | 0,24 | 7,12 7,28 | 7,00 |
| B. Kedrowski | 0,40 | 0,16 | 7,08 | 6,96 |
| B. Darier | 0,40 | 0,32 0,16 | 7,20 | 7,12 6,92 |
| B. graminis Moeller | 0,16 | 0,16 | 7,16 | 6,96 |
| B. cheloneï Friedmann | 0,48 | 0,32 | 7,00 | 7,24 |
| Slangbacterie | 0,28 | 0,24 | 6,92 | 7,12 |
| | 5 dagen | 1 maand | 5 dagen | 1 maand |
| Blanco | 7,00 | 7,00 | 7,04 | 7,28 |
| B. stercusis Moeller | 0,60 0,72 | 0,48 0,48 | 7,08 7,04 | 7,16 7,28 |
| B. friburgensis Korn | 0,24 | 0,16 | 7,60 | 7,48 |
| B. Kedrowski | 0,16 | 0,28 | 7,20 | 7,20 |
| B. phleï Moeller | 0,40 | 0,32 | 7,32 | 7,00 |
| B. Ninni wit | 3,68 3,84 | 0,80 0,64 | 6,80 6,56 | 7,36 7,32 |
| B. Ninni oranje | 0,60 0,48 | 0,32 0,32 | 6,44 6,00 | 6,40 6,28 |
| B. Pellegrini | 0,48 | 0,32 0,24 | 5,92 | 6,20 6,00 |

[1]) Zie W. C. de Graaff, l.c.

| Stammen | Zuurgraad (aantal $cm^3$ 0,25 N loog per 100 $cm^3$ melk) | | Formaldehydegetal | |
|---|---|---|---|---|
| | Na 5 dagen | Na 23 dagen | Na 5 dagen | Na 23 dagen |
| Blanco | 7,00 | 6,96 | 6,80 | 6,92 |
| B. Thomoff | 0,16 0,16 | 0,36 | 6,88 7,00 | 6,84 |
| B. Ninni wit | 5,96 | 0,56 | 6,84 | 6,64 |
| B. Ninni oranje | 0,16 | 0,36 | 5,80 | 5,80 |
| B. Kedrowski | — | 0,32 | 6,64 | 6,80 |
| B. Grassberger | 5,12 5,20 | 4,12 4,40 | 7,56 7,48 | 9,28 9,04 |
| B. Bruynoghe | 5,44 | 4,20 4,04 | 7,40 | 9,40 9,48 |
| B. graminis Moeller | — | — | 6,60 | 6,76 7,04 |
| | Na 5 dagen | Na 1 maand | Na 5 dagen | Na 1 maand |
| Blanco | 6,32 | 6,44 | 6,44 | 6,44 |
| B. Milch Moeller | — | 0,08 | 6,44 | 6,40 |
| B. Marpmann | — | — | 6,40 | 6,58 |
| B. Boquet | 0,16 | 0,32 | 6,36 | 6,32 |
| B. Karlinski | 0,08 | 0,08 | 6,48 | 6,28 |
| B. berolinensis Rabinow. | 0,16 | 0,20 | 6,60 | 6,42 |

Speciaal wat de kleur betrof, gaf het mengsel van phenolphtaleïen (10 druppels 1 % in 70 % alcohol) en broomthymolblauw (10 druppels 0,1 % in 20 % alcohol) [1]) — vooral met een standaard —een heele verbetering, hoewel natuurlijk de verschillende mate van doorschijnendheid nog altijd moeilijkheden bleef opleveren.

Vóór de titratie verdunde ik de melk met een gelijk vol. aqua dest..

De 20 $cm^3$ steriliseerde ik in erlenmeyers van 100 $cm^3$ eerst ¾ uur op 105° en den volgenden dag ¾ uur op 103°. Hierdoor kon echter caramellisatie niet geheel vermeden worden, maar bij 3 achtereenvolgende dagen op 100° steriliseeren was de melk niet steeds steriel.

---

1) J. P. A. Tuenter, Chem. Weekbl. 33, 671 (1936).

Uit voorgaande tabel ziet men, dat met uitzondering van de stammen *Pellegrini, Ninni oranje, Grassberger* en *Bruynoghe* het formaldehydegetal t.o.z. van de blancoproef practisch onveranderd gebleven is. Terwijl de eerste twee het genoemde getal doen dalen, is met de laatste twee het omgekeerde het geval. Het verschil van de cijfers voor *B. Ninni oranje* en *wit* ligt buiten de proeffouten. Men kan de overeenkomst tusschen *B. Ninni oranje* en *B. Pellegrini* opmerken. De zuurgraad wordt door alle stammen verlaagd, zij het dat *B. Grassberger, B. Bruynoghe* en *B. Ninni wit* nooit het neutrale punt bereiken voor dit mengsel van indicatoren.

Merkwaardig was, dat de kleur van *B. Thomoff* zoo snel na titratie terugliep. Reeds na ½ uur moest ik 0,4 $cm^3$ 0,1 N loog toevoegen om de vroegere tint terug te krijgen; na 3 uur bedroeg dit 1,20 $cm^3$, terwijl voor de andere slechts 0,2—0,3 $cm^3$ noodig waren.

Het paars kleuren van lakmoespapier bovenin de erlenmeyer, beginnend 3 dagen na enting, en het doorzichtig worden, waren aanleiding, dat we nog proeven wilden inzetten om eventueel gevormd amine over te stoomen. De melk als zoodanig kon ik niet gebruiken, daar deze met magnesiumoxyde ontleend werd. Daarom probeerde ik volgens de methode van C a r r e z [1]) met kaliumferrocyanide en zinkacetaat eiwitvrij te maken en pas daarna over te stoomen, maar het zwavelzuur in den ontvanger kon ik ook in dit geval niet volledig terugtitreeren. Daarna heb ik nog pogingen gewaagd om blanco en geënte melk volgens bovenstaande methode op precies dezelfde manier te behandelen, maar de uitkomsten waren te wisselend dan dat ik ze hier kan vermelden.

*Samenvatting:*

Alle bacteriën ontleedden de eiwitten van gelatine en bloed niet, wel die van melk.

Van de onderzochte aminozuren voldeed slechts d-alanine als eenige koolstof- en stikstofbron. Met lactaat als C- en l-tyrosine, resp. l-tryptophan als eenige N-bron, trad in eenige gevallen oxydatie tot p-oxyphenylazijnzuur, resp. $\beta$-indolylazijnzuur op.

[1]) Codex alimentarius no. 1, 8 (1920).

## HOOFDSTUK III.

### Het gedrag t.o.z. van koolhydraten en aanverwante verbindingen.

LITERATUUROVERZICHT:

Ook wat betreft groei en eventueele ontleding van bovenstaande verbindingen zijn deze cultuur-eigenschappen, zoowel in de oude als de nieuwe literatuur zeer spaarzaam beschreven. Een voedingsbodem met glucose is meestal niet genoemd en in het geval, dat dit wel gebeurde, nam men geen vergisting waar (K o r n, K a r l i n s k i)[1]). Wel werden culturen op aardappel beschreven als goed groeiend (R a b i n o w i t s c h, M o e l l e r, G r a s s b e r g e r, S a e n z) [1]), maar ook als minder geschikt (K o r n, K a r l i n s k i).

Onder E i c h b a u m's 49 stammen van verschillende herkomst was er slechts één, welke een duidelijke glucosevergisting gaf. E i c h b a u m schreef van de andere: „In den verschiedensten flüssigen Zuckernährböden entweder schwache Säure- oder Alkalibildung." Jammer, dat hij niet de samenstelling van die verschillende voedingsbodems opgegeven heeft.

B r a u n en mw. vonden amylase niet aanwezig in *B. phleï* en *B. cheloneï,* evenmin lactase, invertase en maltase, indien zij werkten met door filtratie kiemvrij gemaakte oplossingen.

Dezelfde meening was S ö h n g e n toegedaan, die *B. phleï* en *B. luteum* (volgens B r u y n o g h e en A d a n t veel overeenkomst vertoonend met de door hen geïsoleerde bacterie) van amylase, echter ook van galactase, lactase, maltase, invertase en aesculinase ontbloot achtte.

Volgens B r a u n en mw. bleken glucose en fructose assimileerbaar voor de door hen onderzochte Mycobacteriën *(B. phleï, B. cheloneï, B. Rabinowitsch, B. Korn)*; hetzelfde namen zij ook van glycerol waar, zoodat zij de bevinding van vele voorgaande onderzoekers bevestigden. B.v. is glycerol het hoofdbestanddeel der

---

[1]) Zie hoofdstuk I.

oplossing van Sauton (oorspronkelijk van Koch). De lichtgele kleur hiervan gaat na enting met Mycobacteriën over in een groenachtige (Schubert[1]), de Grolier[2]), Saenz[3]), Boquet[4])).

Dit verschijnsel werd het eerst opgemerkt bij de humane tuberkelstammen, welke destijds in Lübeck hun noodlottige werking hebben uitgeoefend.

Boquet[4]) heeft beschreven, dat de bij runderen enteritis veroorzakende bacterie op Sauton's voedingsbodem met 10 % extract van *B. phleï* geënt, de $p_H$ doet dalen tot 6 na 3 en tot 4,9 na 8 à 10 weken. Hij nam ook het zuurworden waar bij andere zuurvaste organismen. Door *B. phleï* steeg de $p_H$ na 3 dagen tot 8, maar daalde na 9 dagen tot 6 en na 2 weken tot 4,5.

Verder kweekte Boquet[5]) zijn microbe op den voedingsbodem van Sabouraud[6]) met extract van *B. phleï*, waarop zich eerst slechts enkele kolonies ontwikkelden, maar daarna toch een sterke vermeerdering optrad.

### EIGEN PROEVEN:

Op ongekookten, maar gesteriliseerden *aardappel* met 4 % glycerol-bouillon, groeiden alle stammen uitstekend, dikwijls met goede pigmentvorming. Dit milieu voldeed zeer veel beter dan de in soda gekookte stukjes aardappel. Verder merkte ik in beide gevallen een duidelijk verschil op tusschen blauwen en gelen aardappel: de groei op de blauwe soort is beter dan op de gele.

Op een bij 110° gesteriliseerde *zoutoplossing* volgens Wolff[7]) met aardappel- of maranta-zetmeel, kon ik bijna geen ontwikkeling zien. De bacteriën moesten echter toch het zetmeel iets aangetast

---

1) J. Schubert, Centr. Bakter. Parasitenk. I. Abt. Orig. 125, 364 (1932).
2) A. de Grolier, Compt. rend. soc. biol. 113, 1506 (1903).
3) A. Saenz, Ann. inst. Pasteur 47, 4 (1931).
4) A. Boquet, Idem 42 I, 495 (1928).
5) A. Boquet, Compt. rend. soc. biol. 97, 43 (1927).
6) R. Sabouraud, Ann. inst. Pasteur 11, 134 (1897).
7) H. Wolff, Biochem. Z. 158, 319 (1925).

hebben, daar toevoeging van een jodiumoplossing niet langer een zuiver blauwe, maar een meer paarsachtige kleur gaf.

*Peptonwater* met *amylum solubile* (½ uur op 110° gesteriliseerd, daar ook hier sterilisatie door een Seitz filter niet mogelijk was) bleek een betere voedingsbodem te zijn. De $p_H$ bereikte na 2 weken dezelfde waarde als in peptonwater alleen. Jodiumtoevoeging aan deze zetmeeloplossing gaf na 2 weken slechts bij *B. Thomoff* en *B. Grassberger* een blauwachtige tint; alle andere ontkleurden na een voorbijgaande paarskleuring onmiddellijk of binnen een kwartier. Na een maand ontkleurden de 2 genoemde stammen, evenals de rest, na één minuut.

(Ontkleuring van de jodiumoplossing had ook in een peptonwatercultuur van 2 weken plaats; door jodiumbindende stof?)

In plaats van zetmeel voegde ik ook 0,5 % *d-glucose,* resp. *lactose* aan peptonwater toe en steriliseerde ½ uur op 110°; ook hier bleek de $p_H$ na 2 weken te zijn gestegen en wel in beide gevallen tot ongeveer dezelfde waarde als in peptonwater met amylum solubile en peptonwater alleen.

Verder entte ik alle stammen op een *zoutoplossing* volgens Wolff (zie vorige blz.) en 0,5 % glucose of lactose als eenige koolstofbron. In tegenstelling met peptonwater waarin, met lactose de ontwikkeling betrekkelijk weinig minder was dan in dat met glucose, kon ik in de anorganische zoutoplossing met glucose nog duidelijk groei waarnemen, echter zoo goed als geen in die met lactose, vooral als ik de sterilisatie door middel van filtratie toepaste. In de lactose-oplossingen bleef de $p_H$ nagenoeg gelijk, maar daalde in de glucose-oplossingen.

Uit het voorgaande mag men toch *niet* besluiten, dat wanneer een Mycobacterie de keus heeft tusschen een stikstofbron en een assimileerbare suiker zij aan de eerstgenoemde stof de voorkeur geeft en pas, als men deze weglaat, de laatste gaat afbreken. Want in een Sautonoplossing zijn een goede, stikstofhoudende stof (l-asparagine) en een goede koolstofbron aanwezig (glycerol), de laatste echter in grootere hoeveelheden, zooals uit onderstaand voorschrift blijkt:

In 3 à 400 cm³ water lost men op:
4 g l-asparagine,
2 g citroenzuur,
0,5 g kaliumbiphosphaat,
0,5 g $MgSO_4 . 7H_2O$ en
0,05 g ijzercitraat (als katalysator).

Na oplossen voegt men onder goed schudden 30 cm³ glycerol (s.g. 1,26) toe, vult op tot 1 liter en stelt met geconcentreerde ammonia (s.g. 0,9) op $p_H$ 7,2 in [1]).

Behalve voor *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje,* welke de $p_H$ onveranderd lieten, hadden al mijn stammen de $p_H$ na 2 weken verlaagd.

In het literatuuroverzicht vermeldde ik reeds, dat Boquet na 3 dagen voor *B. phleï* een stijging waarnam, welke na den negenden dag in een daling veranderd was. Mijn ondervinding daarentegen was juist tegengesteld:

Door *B. phleï* daalde de $p_H$ na 2 dagen tot 5,8 en na 9 dagen zelfs tot 4,6. Hierna vond, waarschijnlijk door het verbruikt zijn van de glycerol, een stijging plaats:

de $p_H$ was na 2 weken 5,2.

TABEL III.

**$p_H$ veranderingen door B. graminis.**

| | 2 dagen | 4 dagen | 9 dagen | 2 weken | 4 weken |
|---|---|---|---|---|---|
| Glucose-peptonw. (6,8) | | 7,2 | 8,0 | 8,2 | |
| Lactose-peptonw. (6,8) | 7,1 | 7,3 | 8,2 | 8,4 | 8,6 |
| Zoutopl. + gluc. (6,8) | 6,4 | 5,8 | 4,2 | 4,2 | |
| Sauton's opl. (7,2) . . | 5,8 | | 4,6 | 5,2 | |

[1]) Een door L. Lange verbeterde voedingsbodem, geciteerd door J. Schubert, Centr. Bakt. Orig. I. Abt. 125, 364 (1932).

Voor *B. graminis* verkreeg ik vrijwel dezelfde waarden.

Voor het $p_H$ verloop door dezen stam in eenige voedingsbodems zie tabel III.

De stam T h o m o f f echter verhoogde de $p_H$ eerst: na 2 dagen 7,6; na 4 dagen 8,2. Hierop volgde een daling:

na 7 dagen 7,8; na 10 dagen 6,0;

na 2 weken 5,8; na 3½ week 5,2; na 8 weken 4,7.

Deze anomalie is niet aan een verontreiniging te wijten, daar alle 3 door S c h o u t e n geïsoleerde ééncelculturen (1 granulum en 2 staafjes van verschillende lengte, zie hoofdstuk VIII) dit eveneens vertoonden.

*B. Grassberger* en *B. Bruynoghe* geven deze eigenaardigheid niet te zien; de $p_H$ gaat geleidelijk naar beneden.

Ook in de oplossing volgens V o g e s-P r o s k a u e r (bestaande uit gelijke deelen pepton, glucose en kaliumbiphosphaat, nml. 5 g in 800 $cm^3$ aqua dest.) hebben de organismen de keus tusschen een koolhydraat en een stikstofhoudend bestanddeel. Er trad flinke groei op, gepaard gaande met duidelijke pigmentvorming.

De methylrood- en V o g e s-P r o s k a u e r proef waren beide negatief. De waarden der $p_H$'s lagen, na gelijken bebroedingstijd, beneden die van peptonwater alleen en ook nog iets beneden die met 0,5 % glucose er bij.

Hieruit is te besluiten, dat — indien een goede stikstofbron en een koolhydraat met een geschikte configuratie naast elkaar in een voedingsbodem voorkomen — beide afgebroken worden.

In tabel IV op blz. 28 vindt men de $p_H$ verandering in de beschreven voedingsbodems.

Als tweeden, glycerolhoudenden voedingsbodem (naast S a u t o n's oplossing) koos ik dien met urinezuur van K o s e r [1]; hierin komt bovendien als stikstof- en tegelijk koolstofbron het volgens B r a u n en mw. moeilijk aantastbare urinezuur voor.

---

[1]) S. A. K o s e r, J. inf. Dis. 23, 377 (1918).

De samenstelling is als volgt:
0,5 % NaCl,
0,02 % $MgSO_4 . 7H_2O$,
0,1 % $K_2 H PO_4$,
0,01 % $CaCl_2 . 6 H_2O$,
3 % glycerol en
0,05 % urinezuur.

Als vergelijking kweekte ik ook op de andere oplossing van Koser, welke citraat als eenige koolstofbron bevat [2]). Volgens Braun en mw. groeide *B. phleï* zeer schraal op citraat, indien geen andere koolstofbron aanwezig was.

De samenstelling luidt als volgt:
Hoeveelheden van NaCl, $MgSO_4 . 7 H_2O$ en $K_2HPO_4$ als voren, verder:
0,1 % $(NH_4) H_2 PO_4$ en
0,277 % natriumcitraat. $p_H$ moet 6,8 zijn.

Ook mijn stammen vormden, na 2 weken, hierop slechts een zeer dun vliesje, echter op de oplossing met urinezuur reeds binnen een week een flinke, rimpelige huid.

Op den voedingsbodem volgens Sabouraud, maar eenigszins gewijzigd (10 g pepton, 5 druppels ijsazijn, 20 g agar en 40 g van een koolhydraat of aanverwante verbinding) met glucose groeiden *B. Pellegrini* en *B. Grassberger* beter en met intenser pigment dan wanneer de glucose door maltose vervangen was.

Voor de twee bovengenoemde bacteriën en *B. Milch Moeller* bleken *peptonwater* met *0,5 % l-fructose* resp. *d-mannitol* een veel betere ontwikkeling te geven dan met *maltose* resp. *d-galactose* (alle 4 voedingsbodems zijn 3 achtereenvolgende dagen bij 100° gesteriliseerd). Deze resultaten komen met die van Söhngen en eveneens met die van Braun en mw. overeen.

In *saccharose-peptonwater* verkreeg ik met alle bacteriën en vrij schralen groei.

---

[1]) S. A. Koser, J. Bact. 8, 493 (1923).

## TABEL IV.

### pH veranderingen na 2 weken.

| Stammen | Peptonwater (6.8) | Peptw. + amylum solubile (6.8) | Peptw. + 0.5 °/₀ glucose (6.8) | Peptw. + 0.5 °/₀ lact. (6.8) | Zoutopl. + 0.5 °/₀ glucose (Seitz filtr.) (6.8) | Zoutopl. + 0.5 °/₀ glucose (½ u. 110°) (6.8) | Zoutopl. + 0.5 °/₀ lact. (Seitz filtr.) (6.8) | Zoutopl. + 0.5 °/₀ lactose (½ u. 110°) (6.8) | Santon opl. (7.2) | V.P. opl. (7.6) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B. Boquet . . . . . | 8,6 | 8,4 | 8,2 | 8,2 | 4,2 | 4,0 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,7 |
| B. Milch Moeller . . | 8,6 | 8,4 | 8,4 | 8,2 | 4,4 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 8,0 |
| B. graminis Moeller . | 8,4 | 8,5 | 8,2 | 8,4 | 4,2 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,8 |
| B. phleï Moeller . . . | 8,6 | 8,7 | 8,4 | 8,4 | 4,6 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 5,0 | 7,8 |
| B. stercusis Moeller . | 8,6 | 8,4 | 8,4 | 8,3 | 4,6 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 5,4 | 7,6 |
| B. berolinensis Rabinowitsch . . . . . | 8,6 | 8,7 | 8,3 | 8,3 | 4,4 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,7 |
| B. friburgensis Korn . | 8,6 | 8,6 | 8,2 | 8,3 | 4,2 | 4,0 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,8 |
| B. Marpmann . . . | 8,7 | 8,7 | 8,1 | 8,1 | 4,2 | 4,0 | 6,7 | 6,4 | 5,4 | 7,8 |
| B. Karlinski . . . . | 8,7 | 8,6 | 8,3 | 8,1 | 4,0 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 8,0 |
| B. Darier . . . . . | 8,6 | 8,7 | 8,4 | 8,3 | 4,6 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 8,0 |
| B. Mayeranne . . . | 8,5 | 8,7 | 8,3 | 8,2 | 4,0 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,0 | 7,8 |
| B. Kedrowski . . . | 8,4 | 8,6 | 8,1 | 8,3 | 4,2 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,8 |
| Slangbacterie . . . . | 8,4 | 7,8 | 8,2 | 8,4 | 4,0 | 4,0 | 6,7 | 6,4 | 5,2 | 7,5 |
| B. cheloneï . . . . | 8,2 | 7,7 | 8,2 | 8,2 | 4,6 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,4 | 7,5 |
| B. Bruynoghe . . . | 8,0 | 7,8 | 7,6 | 7,8 | 4,8 | 5,0 | 6,7 | 6,6 | 5,6 | 7,4 |
| B. Thomoff . . . . | 7,8 | 7,8 | 7,0 | 7,6 | 4,0 | 4,2 | 6,7 | 6,4 | 5,8 | 7,4 |
| B. Grassberger . . . | 8,0 | 7,8 | 7,6 | 7,8 | 5,0 | 4,8 | 6,7 | 6,4 | 5,4 | 7,6 |
| B. Pellegrini . . . . | 7,2 | 7,6 | 7,2 | 7,2 | 4,6 | 4,6 | 6,7 | 6,4 | 7,2 | 6,8 |
| B. Ninni oranje . . . | 7,4 | 7,8 | 7,2 | 7,2 | 4,4 | 4,4 | 6,7 | 6,4 | 7,0 | 6,8 |
| B. Ninni wit . . . . | 8,4 | 8,4 | 8,0 | 8,2 | 5,4 | 5,2 | 6,7 | 6,6 | 5,6 | 8,0 |

Verder entte ik nog *B. Milch Moeller* en *B. Pellegrini* op peptonwater met 0,5 % aesculien, waarop ik in het geheel geen groei kon waarnemen.

*Samenvatting* der koolhydraten en aanverwante verbindingen:

Zoo goed als geheel afwezig zijn: Amylase, lactase, galactase, maltase, invertase, aesculinase.

Wel bezitten de bacteriën glucose-, glycerol-, fructose- en mannitolsplitsende fermenten; de laatste 2 althans in *B. Pellegrini, B. Milch Moeller* en *B. Grassberger* voorkomend.

## HOOFDSTUK IV.

### Het gedrag ten opzichte van vetten en vetachtige lichamen.

LITERATUUROVERZICHT:

Rabinowitsch[1]) kweekte haar bacterie op boteragar om te zien of de zuurvastheid met de aanwezigheid van vet samenhing. Ze vergeleek het organisme met eveneens op boteragar gegroeide *B. coli, B. pyocyaneum, Staphylococcus pyogens aureus,* maar volgens haar werden deze drie niet zuurvast. Bienstock[2]) en Gottstein[3]) vonden echter, dat deze microben eenzelfde zuurvastheid konden verkrijgen als *tuberkelbacteriën.* Gottstein heeft echter dit feit later toch niet juist bevonden. Hij stelde verder vast, dat de intensiteit van den groei niet van het zuurvastworden afhankelijk was.

Grassberger[4]) vermeldde van zijn organisme, dat het op gewonen agar, na 24 uur, tot 3 $\mu$ lang geworden was met dikwijls toegespitste einden, maar geen spoor van zuurvastheid vertoonde. Spoot hij deze staafjes, met boter vermengd, in bij cavia's, dan hadden ze na 10 à 40 dagen gelegenheid gehad om op de entplaats uit te groeien tot lange draden van 20 $\mu$, welke bundelvormig vereenigd, kolfvormig verdikt en dikwijls duidelijk vertakt waren. Ze vertoonden bovendien een geringe, maar toch waarneembare zuurvastheid.

Karlinski[5]) vermeldde slechts goeden groei en oranje pigmentvorming op agar met 5 tot 10 % boter.

Volgens Söhngen[6]) tasten Mycobacteriën neutrale vetten aan zonder lipase te vormen. Na 2 uur kweeken tusschen 25° en

---

[1]) L. Rabinowitsch, Z. Hyg. 26, 90 (1897).
[2]) B. Bienstock, Fortschr. Med. 4, 193 (1886).
[3]) A. Gottstein, Id. 4, 252 (1886).
[4]) R. Grassberger, Münch. med. Wschr. 46, 341 (1899).
[5]) J. Karlinski, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 29, 521 (1901).
[6]) N. L. Söhngen, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 37, 598 (1913).

35° vond hij een geringe ontleding, indien hij de bacteriën met krijt op een dunne laag vet in een buis entte: de entplaatsen vertoonden witte plekken tengevolge van zeepvormige (sic!). Daarentegen kon hij geen door agar diffundeerende lipase aantoonen.

Goede voedingsbodems waren volgens W e b e r [1]) agar met vet met een hoog smeltpunt, b.v. rund-, varkens-, schapenvet en lanoline (75 % wolvet en 25 % water). Vooral op de lanoline-agar behielden de eigenlijk niet-zuurvaste *smegmabacteriën* en die van G r a s s b e r g e r voor een groot deel hun fuchsinekleur zelfs na 10 minuten ontkleuren met 3 % zoutzuren alcohol. Bij het enten op gewonen (alkalischen bouillon-) agar ging deze zuurvastheid weder zoo goed als volledig verloren; toch bleven nog enkele staafjes rood (W e b e r veronderstelde door sporen vet om de bacterie). Op boteragar verkreeg ook hij een weelderigen groei; nam hij gelijke deelen boter en agar dan waren alle staafjes zuurvast.

E i c h b a u m [2]) wreef een niet meer zuurvasten stam achtereenvolgens met vaseline, lanoline, paraffine liquidum, melk en boter: hierdoor was de stam meerendeels zuurvast geworden (kon tegen 15 minuten ontkleuren met 3 % zoutzuren alcohol). Het beste voldeden lanoline en vaseline; in melk gekweekt daarentegen waren slechts enkele niet ontkleurd. Ook *pseudodiphtheriebacteriën* kon hij aldus zuurvast maken. Met *coli-*, *typhus-*, *tetanus-* en *diphteriebacteriën* verkreeg hij zeer wisselende resultaten. Op één uitzondering na konden coccen een ontkleuring niet verdragen.

De eigenschap, om op vethoudende voedingsbodems zuurvast te worden, betitelde E i c h b a u m als **exogene zuurvastheid**, in tegenstelling met de echte **endogeen** zuurvaste organismen, welke hun roode kleur eveneens vertoonen, indien men ze tevoren kort met aether of xyleen ontvet had.

Ook door kweeken op vethoudende voedingsbodems gelukte het E i c h b a u m de meeste bacteriën een zekere zuurvastheid te doen verkrijgen.

Volgens H o l m a n (geciteerd door E i c h b a u m) kunnen

---

[1]) A. W e b e r, Arb. ksl. Gesundh.amt **19**, 251 (1903).

[2]) F. E i c h b a u m, Ergebn. Hyg. **14**, 82 (1933).

Gram-negatieve moeilijker zuurvast gemaakt worden dan de Gram-positieve microben. Echter niet alleen levende organismen vertoonden de reeds veel genoemde eigenschap. Streek Eichbaum een dunne laag lanoline uit en kleurde deze volgens Ziehl-Neelsen, dan zag hij nergens roode plekken. Vermengde hij de lanoline met kaolien of diatomeënaarde, dan nam hij deze vooral na kaolientoevoeging waar. Behandelde hij eerst met xyleen, kleurde en ontkleurde daarna, dan bevonden zich in het praeparaat slechts blauwgekleurde bestanddeelen. Zoo kon hij ook roode bloedlichaampjes zuurvast maken.

Evenals Loewenstein[1]) voor de zuurvaste staven eiwit- en suikersplitsende fermenten ontkent, is hetzelfde met vetsplitsende het geval.

Ook Braun en mw.[2]) achtten lipasen in *B. phleï* en *cheloneï* afwezig.

Een geheel ander soort proeven voerde Lansberg[3]) uit. Hij entte diverse bacteriën in olijf-, sesamolie en levertraan. Terwijl *anthraxbacil* en *Staphylococcus pyogenes* in olijfolie zoowel bij 37° als bij kamertemp. oplosten en Lansberg dit ook van de *tuberkelbacterie* verwachtte, bleek deze laatste in olijfolie niet de minste verandering te vertoonen en na eenigen tijd (het aantal dagen noemt hij niet) nog duidelijken en normalen groei op glycerolaardappel te geven. In levertraan echter veranderde de kleur eerst in geel, daarna in bruin en na 1½ maand waren er slechts roode schilfertjes over. Haalde Lansberg deze er uit, ontvette ze met aether en paste hij tenslotte de kleuring van Ziehl-Neelsen toe, dan vond hij geen bacterie meer.

Hij ontdekte ook het merkwaardige feit, dat *tuberkelbacteriën* van olijfolie en levertraan het joodadditiegetal verlagen en de refractie verhoogen.

---

[1]) E. Loewenstein, Geciteerd door Eichbaum (blz. 106).
[2]) H. Braun e.a., Bioch. Z. 145, 381 (1924) en 146, 573 (1924).
[3]) L. M. Lansberg, Diss. Leiden 1919.

Voor Staphylococcus pyogenes albus kon hij geen verband vinden tusschen joodadditiegetal en bactericide eigenschappen van verschillende vetten en aanverwante lichamen.

EIGEN PROEVEN:

Voor de beoordeeling van de eventueele vermeerdering der zuurvastheid bereidde ik een agar volgens S ö h n g e n (op 100 $cm^3$ aqua dest. gelijke deelen kaliumbiphosphaat, ammoniumchloride en magnesiumsulfaat, nml. 50 mg en 2 g goed uitgewasschen agar) en voegde hieraan 1 % van verschillende vetachtige lichamen toe. Op deze in cultuurbuizen uitgegoten agar, waarvan ik de $p_H$ op 7,2 stelde, wreef ik het bacteriemateriaal zoo goed mogelijk uit op de plaatsen waar de vetachtige stoffen zich hadden afgezet. Ik bezigde de stammen: *Thomoff, Bruynoghe, Grassberger, Pellegrino* en *Ninni oranje,* welke alle zeer weinig of niet zuurvast zijn.

Op den agar met lijnolie, levertraan en spermaceti nam ik geen, op dien met wolvet en bijenwas nauwelijks eenigen groei waar. Wel bleek groei op te treden, indien ik aan den agar cacao- of cocosvet toevoegde. Deze beide hebben een laag smeltpunt. Dit klopt dus niet met het door W e b e r gevonden feit, dat juist dergelijke stoffen met een hoog smeltpunt tezamen met agar een goede voedingsbodem zijn.

Met alle vetachtige lichamen bleken, zelfs na 2 minuten ontkleuren met 5 % zwavelzuur, alle genoemde organismen maar voor een klein deel zuurvast te zijn gebleven. Soms kwam het wel voor, dat na ontkleuring in 5 % zoutzuren alcohol nog enkele staafjes rood waren. Ik kon echter noch verschil in gedrag tusschen de verschillende stammen, noch tusschen de genoemde stoffen waarnemen. Wel maakte het, bij het praeparaten maken, onderscheid hoeveel vet er met het bacteriemateriaal meeging en of ik zorgvuldig uitstreek. Was de hoeveelheid „vet" groot, dan belette de dikkere omhulling de ontkleuring. Het ontkleuringsmiddel had dan geen gelegenheid om door te dringen. Waren de bacteriën minder goed uitgestreken (het gelijkmatig uitstrijken ging altijd zeer moeilijk), dan kon ik ook hierin meer rood verwachten. Vandaar de zeer wisselende resultaten.

Na 1 minuut spoelen in aether of xyleen vóór het kleuren was

er van de zuurvastheid zoo goed als niets meer over, behalve de praeparaten van *B. Thomoff*, welke na 2 minuten ontkleuren in 5 % zwavelzuur nog voor ongeveer de helft roode elementen vertoonden. Van zuuralcoholvastheid was daarentegen geen sprake meer: in ½ minuut in 5 % zoutzuren alcohol ontkleurde alles.

Ten slotte gebruikte ik als vergelijking de gedeeltelijk zuuralcoholvaste *B. cheloneï*. Ik entte op cocosvetagar af van een alkalische bouillonagarcultuur, welke na 10 minuten ontkleuren met 5 % zoutzuren alcohol 10 % roode staafjes bevatte. Na 5 dagen bij 37° aanraking met het cocosvet vond ik met laatstgenoemde ontkleuring 20 % rood en na 1 minuut (ook na 1 uur) aether- of xyleenontvetting dezelfde zuuralcoholvastheid als de cultuur, waarvan ik uitging.

Als samenvatting kan ik schrijven, dat ik op de genoemde stoffen bij alle bacteriën, waarmee ik werkte, een *geringe exogene zuurvastheid* en nauwelijks een dito zuuralcoholvastheid waarnam; deze waren onafhankelijk van den groei.

Om eventueele *lipasen* op te sporen, smolt ik in Petrischalen een vet, na bekoeling goot ik hierop alkalischen bouillon-agar en entte daarna al mijn stammen. Evenmin als S ö h n g e n kon ik een lipolytische werking, van welk organisme ook, vaststellen. Hierna herhaalde ik zijn proeven door den binnenwand van cultuurbuizen met dunne laagjes wolvet, bijenwas, cocosvet of cacaoboter te bedekken, hierop tezamen met krijt een weinig bacteriemateriaal aan te brengen en plaatste de buizen met de eerste 2 stoffen bij 30° en die met de laatste twee bij 25°. Nooit zag ik echter op de entplaatsen eenige verandering optreden, zelfs niet na 2 dagen (vgl.: Bij S ö h n g e n reeds na 2 uur).

De proeven van L a n s b e r g besloot ik te verrichten met twee monsters levertraan, beide van het merk O l u f H o l m, nml.:

1. een natuurlijke levertraan met joodadditiegetal 154 [1]) en $n_D^{20}$ 1,4786 en
2. een gestoomde met de resp. constanten 153 [1]) en 1,4786.

[1]) Alle bepalingen van het joodadditiegetal voerde ik uit volgens H. P. K a u f m a n n, Studien auf dem Fettgebiet 1935.

*B. Boquet* op beide vertoonde reeds een geringe bruinkleuring na 3 dagen. Na 1 week waren de bacteriën roodbruin geworden en was het volume zeer verminderd.

Na 1½ maand (altijd bij 37°) echter, waarin L a n s b e r g geen bacteriën meer in de roode schilfertjes aantrof, kon ik in de praeparaten van beide nog duidelijk zeer gegranuleerde bacteriën waarnemen en verkreeg ik nog groei (mits ik niet te weinig entte; zie volgend hoofdstuk) op alkalischen bouillon-agar, hoewel eerst na 5 dagen en als afzonderlijke kolonietjes. Vanwege de bactericide eigenschappen van de levertraan nam ik voorzorg om zoo weinig mogelijk bij het afenten hiervan mee te nemen door de buis zoo schuin te houden, dat de levertraan van den bodem af vloeide en de bacteriën „vrij" lagen. Zelfs een inwerking van levertraan van 4 maanden was niet voldoende om de levensvatbaarheid teniet te doen gaan (microscopisch beeld als boven beschreven).

Verder entte ik nog *B. Bruynoghe, B. Pellegrini en B. Ninni oranje,* welke alle, nu na 4 weken, na overenting op agar nog groei vertoonden en *B. Thomoff,* welke, na 3 weken met levertraan in

TABEL V.

**Overzicht van het verloop van J. add. getal en $n_D^{20}$ in 2 levertranen.**

| | J add. get. | $n_D^{20}$ |
|---|---|---|
| levertr. 1 | 154 | 1,4786 |
| „ 2 | 153 | 1,4786 |
| B. Boquet . . . . . 4 mnd. op ltr 1 | 122 | 1,4812 |
| „ 4 „ „ „ 2 | | 1,4811 |
| „ 2½ „ „ „ 1 | 124 | 1,4810 |
| „ 2½ „ „ „ 2 | 122 | 1,4812 |
| „ 2 „ „ „ 1 | 124 | 1,4811 |
| B. Bruynoghe . . . . . 4 weken „ „ 1 | 136 | 1,4798 |
| B. Thomoff . . . . . 3 „ „ „ 1 | 144 | 1,4794 |
| B. Pellegrini . . . . . 4 „ „ „ 1 | 146 | 1,4793 |
| „ 4 „ „ „ 2 | 140 | 1,4796 |
| B. Ninni oranje . . . . 4 „ „ „ 1 | 139 | 1,4796 |

aanraking te zijn geweest, op alkalischen bouillon-agar tot ontwikkeling te brengen was.

Uit tabel V ziet men, dat door alle onderzochte organismen het joodadditiegetal verlaagd en de refractie verhoogd wordt, hetgeen overkomt met de proeven van Lansberg met tuberkelbacteriën in levertraan. De waarden zijn afhankelijk van de hoeveelheden geënt materiaal.

## HOOFDSTUK V.

### Eenige andere eigenschappen.

LITERATUUROVERZICHT.

Bij het isoleeren van Mycobacteriën uit aarde gebruikte Söhngen[1]), na een vloeibaren voedingsbodem, een met agar, waarvan ik de samenstelling reeds op blz. 37 gaf:

Uitgewasschen agar 2 g
$K_2HPO_4$ 0,05 g
$MgSO_4 . 7 H_2O$ 0,05 g
} in 100 g aqua dest.

Als koolstofbron deed 1 % paraffine of petroleumdamp dienst.

Hij heeft nooit een verklaring gegeven, waarom hij het ammoniumchloride (0,05 %), hetwelk in de oplossing aanwezig was en dat ik ook aan den agar in het vorige hoofdstuk toevoegde, in het vaste milieu wegliet.

Mycobacteriën zouden zich met de Actinomycessoorten van alle andere bacteriën (ook de Corynebacteriën) onderscheiden door het kunnen assimileeren van de twee genoemde stoffen, als eenige koolstofbron[2]).

Braun en mw. gingen nog verder door ook de koolstofbron weg te laten: ze entten op een *zuiver anorganische oplossing* (zie blz. 44). Noch het warmbloedige, noch het koudbloedige type van de tuberkelbacterie (waartoe zij *B. cheloneï* rekenden) waren volgens hen bij machte om de koolstof uit de gasvormige verbindingen, waarmede de broedstoof is gevuld, te betrekken, wel echter de echte, zuurvaste saprophyten. Hun techniek is de volgende:

Ze kweekten niet in buisjes, maar in erlenmeyers om zooveel mogelijk aan aerobe omstandigheden te voldoen en entten met een groot oog voorzichtig van een vasten voedingsbodem af, welke — naar gelang het een vlug of langzaam groeiende cultuur betrof — eenige dagen of eenige weken oud was. Had zich na zekeren tijd

---

[1]) N. L. Söhngen, l.c.

[2]) F. E. Haag, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 71, 1 (1927).

een dun vliesje op de voedingsvloeistof gevormd, dan entten zij eenige oogjes daarvan in een nieuwe hoeveelheid van de oplossing. Zoo voerden zij 5 zgn. passages of overentingen uit. Trad ook na de 5de overenting groei op, dan kon men — volgens hen — zeker zijn, dat de organismen niet leefden van meegesleepte stoffen. Letterlijk staat er:

„Erst die Erfüllung dieser Forderung (nml. het kweeken in 5 passages) gibt uns die Sicherheit, dass der Körperbau der Mikroorganismen allein aus den dargebotenen Nährstoffen und nicht etwa aus den mitübertragenen Nährmaterialien der glycerin-bouillonhaltigen oder eierhaltigen Nährböden oder durch Reservestoffe, die in den Bakterienleibern aus der Zeit ihrer Zucht auf optimalen Nährböden herrühren, erfolgt."

De 5 passages werden door mij met de stammen *Rabinowitsch, Korn* en *phleum* uitgevoerd; de *trompet-* of *kraanbacterie* deed het echter nauwelijks met de broedstooflucht.

Ook indien B r a u n en mw. een goede koolstofbron (½ % alcohol of acetaat) gaven, en niet tevens een stikstofhoudende verbinding, trad goeden groei met bovengenoemde organismen op, behalve in het geval met de *kraanbacterie*. Dus ook stikstofbehoefte kan blijkbaar door de broedstooflucht gedekt worden.

Tijdens het herhalen van deze proeven kwam bij mij twijfel op aan de met stelligheid uitgesproken meening, dat er na 5 passages geen meegesleepte stoffen zouden zijn, want waarom beginnen B r a u n en mw. af te enten met een groot oog en waarom zetten zij eenige erlenmeyers tegelijk in? Omdat het wel eens niet lukte?! Echter wat zou er meegesleept kunnen worden? Toen ik hiervoor de literatuur doorzocht, vond ik eensdeels onderzoekers, die zich bezig hielden met de beantwoording van de vraag:

Bevatten deze bacteriën vitaminen om den groei te bevorderen?

En anderen, die zich afvroegen:

Bevatten ze een of meer specifieke groeistoffen?

Om met het eerste te beginnen:

D a m o n [1]) gaf jonge, witte ratten een dieet, waarin vitamine B (geen nadere aanduiding, 1924!) ontbrak. Nadat een duidelijke

[1]) S. R. D a m o n, J. path. Bact. 27, 163 (1924).

gewichtsvermindering opgetreden was, verving hij een deel van het zetmeel door gedroogde *B. phleï,* gekweekt op een glycerol-bouillon, welke vrij van vitamine B was. Bedroeg dit deel 7,5 %, dan bracht dit een sterke verandering in den gezondheidstoestand ten goede teweeg.

Conclusie: *B. phleï* kan vitamine B synthetiseeren.

3 Jaar later publiceerde U y e i [1]) zijn proeven omtrent den invloed der vitaminen A en D, in den vorm van geconcentreerde levertraan „oscodol", vitamine B, in dien van H a r r i s' gist, en vitaminen B en C, als sinaasappelen, tomaten en koolsap, op virulente en avirulente humane en bovine *tuberkelbacteriën.* Levertraan bleek den groei niet of slechts zeer weinig te stimuleeren. De grens voor een merkbaar effect lag, in 't geval H a r r i s' gist toegevoegd werd, bij $^1/_{1000}$, in dat van sinaasappel- en tomatensap bij $^1/_{100}$ en voor koolsap bij $^1/_{20}$.

Hij vond het niet waarschijnlijk, dat deze organismen hun betere ontwikkeling aan vitamine C dankten; wel echter aan B, hetgeen volgens hem overeenkwam met de onderzoekingen van T h j ø t t a en A v e r y, D a v i s, K l i g l e r, e.a., die met andere pathogene bacteriën gewerkt hebben. Ze hebben het niet allen zoo duidelijk uitgesproken, want in dien tijd was de chemische natuur van vitamine B nog niet opgehelderd.

Verleden jaar ging L e i t n e r [2]) de al of niet wenschelijkheid der vitaminen B en C na, nu echter werkend met de zuivere stoffen. Hij gebruikte den synthetischen voedingsbodem van L o c k e m a n n, terwijl U y e i dien van L o n g had gebruikt.

Volgens hem had vitamine C een gunstige werking: max. 0,0035—0,007 %; bij 0,028 % begon een remming. De gunstige invloed van vitamine B daarentegen was lang niet zoo duidelijk merkbaar; hier lag het maximum tusschen 0,0875 en 0,35 %, terwijl bij 0,7 % een remming optrad.

Echter, volgens B o i s s e v a i n en S p i l l a n e [3]), remt reeds

---

[1]) N. U y e i, J. inf. Dis. 40, 433 (1927).

[2]) S. J. L e i t n e r, Klin. Wschr. 16, 1423 (1937).

[3]) Ch. H. B o i s s e v a i n en J. H. S p i l l a n e Jr., Am. Rev. Tbc 35, 661 (1937).

0,001 % l-ascorbinezuur in een kunstmatigen voedingsbodem. Bijzonderheden hieromtrent kan ik niet vermelden, daar het artikel in een voor mij ontoegankelijk tijdschrift voorkomt, zoodat ik mij met een referaat in Centr. ges. Hyg. 40, 163 (1937) tevreden moest stellen.

Nu de tweede vraag:

U y e i [1]) deed gelijktijdig met zijn onderzoek naar vitaminen, dat naar groeibevorderende stoffen. Daar noch het aceton-, noch het waterige extract (dit laatste bereid uit de rest na de behandeling met aceton) van aviaire, humane en bovine *tuberkelbacteriën*, noch tuberculine, toegevoegd aan een kunstmatig milieu, een beteren groei gaven, veronderstelde hij, dat, òf de stof bij het bereiden vernietigd werd, òf dat W i l d i e r s' biostheorie niet op *tuberkelbacteriën* van toepassing was.

B o r r e l en mw. [2]) vonden door toevoeging aan een eveneens kunstmatigen voedingsbodem, van 0,1 % van een gedurende één uur op 60° verhit kaarsfiltraat eener 2 maanden oude cultuur van humane *tuberkelbacteriën*, na 45 dagen, een verhooging van 74 % der normale ontwikkeling. Verhitting van het filtraat gedurende 1 uur op 110° gaf een 2½ × zoo groote opbrengst als onverhit.

Dit laatste kon S c h m i d t [3]) niet bevestigen. Hij nam daarom in het onverhitte filtraat (door Seitz filter) een 2den onafhankelijken, thermolabielen, groeibevorderenden factor aan. Hij gaf als verklaring van het verschil aan, dat hij met een vlug en B o r r e l met mw. met een langzaam groeienden stam hadden gewerkt. Volgens B o r r e l en mw. is de werking onspecifiek, d.w.z. ze kan evengoed door bovine en aviaire, als door humane stammen bewerkstelligd worden, zelfs door vertegenwoordigers van het geslacht Mucor.

Zoowel S c h m i d t als B o r r e l en mw. stelden groeibevordering door caviabloed vast. Kleine hoeveelheden verhit bloed werkten beter dan groote (1 %). S c h m i d t nam het omgekeerde bij

---

[1]) N. U y e i, J. inf. Dis. 40, 425 (1937).

[2]) A. B o r r e l, L. B o e z en A. d e C o u l o n, Compt. rend. biol. 89, 191 (1923).

[3]) H. S c h m i d t, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 94, 94 (1925).

versch bloed minder duidelijk waar dan Borrel en mw.. Eerstgenoemde bevestigde nog eens het bekende feit, dat zuivere filtraten een remmenden invloed uitoefenen.

Wagliang[1]) gaf als groeibevorderend een toevoeging van 2 à 4 % gistextract en tomatensap aan een vloeibaar, synthetisch milieu voor humane en bovine *tuberkelbacteriën* op.

Het voorgaande is van belang in verband met het zoo moeilijke isoleeren en voortkweeken van de echte *paratuberkelbacterie,* welke reeds in 1895 door Johne en Frothingham[2]) ontdekt was. In mijn verzameling komt deze voor onder den naam van *B. Boquet.*

Twort en Ingram[3]) hebben zich veel moeite gegeven om er achter te komen welke stof er voor den groei noodig is. Ze bevonden het in chloroform onoplosbare, maar in water oplosbare deel van het alcoholisch extract van *B. phleï* — welke op glycerolbouillon gegroeid was — het beste. Behoorlijke resultaten verkregen ze ook, indien ze de glycerol vervingen door glucose, fructose, mannitol, erythritol, aethanol, propanol en hooi-extract. Het vervangen van *B. phleï* door *B. Karlinski, B. Marpmann, B. Grassberger* en *humane tuberkelbacteriën,* kwam ongeveer op hetzelfde neer. Daarentegen voldeden, behalve de niet-zuurvaste, niet: *B. Rabinowitsch* en *bovine tuberkelbacteriën;* het *aviaire* type wel, maar minder goed. ½ uur verhitting der geschikte organismen in een physiologische zoutoplossing op 120° veranderde de werking niet.

Het in chloroform onoplosbare deel bleek de zuurste fractie van het alcoholisch extract te zijn. Daarom meenden Twort en Ingram, dat het groeibevorderende agens een *organisch zuur* moest zijn. Daarna onderzochten ze een geheele reeks zuren op een stimuleerende werking; echter van alle bleek deze zoo goed als negatief te zijn. Eenig effect had nog 1 % glycerolzuur; ook tar-

---

[1]) Wagliang, Compt. rend. soc. biol. 112, 429 (1933).

[2]) Johne en Frothingham, Deutsche Z. Thiermed. 21, 438 (1895).

[3]) F. W. Twort en G. L. Y. Ingram, A monograph on Johne's disease. 1913.

tron- en gluconzuur, maar minder. Geen aantoonbare werking hadden (in gehalten van 0,01—1 %):

wijnsteen-, fumaar-, maleïne-, aconiet-, glycol-, glyoxyl-, slijm-, barnsteen- en oxaalzuur.

De stam, waarmee ze dit onderzoek uitvoerden, was reeds 12 maanden in cultuur (gegroeid op een eihoudenden voedingsbodem met *B. phleï*).

Boquet[1]) deed vergeefsche pogingen met amylum solubile (zie ook het artikel van Wagliang), inulien, lecithine en asch van *B. phleï*. Hij veronderstelde, dat de stof te vergelijken zou zijn met bios en naderen zou tot de thermostabiele factor X van Thjøtta en Avery[2]).

Helaas hebben Lange en Pescatore[3]) bij hun kort geleden ondernomen isolatieproeven niet op het werk hunner voorgangers voortgebouwd en niet gepoogd door toevoeging van een vitamine of groeifactor (identieke begrippen?) het kweeken vlugger te doen geschieden. Ze stelden zich met de toevoeging van glycerol-extract van *B. phleï* aan glycerol-bouillon tevreden, maar namen waar, dat kieskeurige organismen het soms opeens zonder die toevoeging konden stellen. Dit feit vind ik des te ernstiger, daar reeds Twort en Ingram in een andere publicatie[4]) de mogelijkheid geopperd hebben, dat de stof, of volgens hen waarschijnlijker een groep van stoffen met hetzelfde radicaal, verband houden met de vitaminen. Uit dit werk, waarin ze de resultaten beschreven met alcoholische extracten (waarom ze nu het in chloroform oplosbare deel het beste oordeelden is mij niet duidelijk) van verschillende zaden, bloemen, vruchten en paddestoelen, krijg ik den indruk, dat vitamine B een groeibevorderende factor kan zijn. Positieve resultaten verkregen ze nml. met tarwe, gerst, haver, maïs, lijnzaad, vijgen en vijgezaad, zekere boonen (Physostigma) en erwten („culinary pea"), bepaalde rozijnen (aangeduid als

---

1) A. Boquet, Ann. inst. Pasteur 42 I, 495 (1928).

2) T. Thjøtta en O. T. Avery, J. exper. Med. 34, 97 en 455 (1921).

3) L. Lange en H. Pescatore, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 140, 1 (1937).

4) F. W. Twort en G. L. Y. Ingram, Id. 73, 277 (1914).

„muscatels" en „dried grape", welke door den kruidenier als „currants" verkocht worden). Al deze producten bevatten echter zeer veel vitamine B!

Op één uitzondering na gaven alle onderzochte gisten een negatief resultaat.

De uitkomsten van verschillende monsters van dezelfde zaden waren nogal wisselend; deze wisselingen weten ze aan verschil in rijpheid, klimaat en grondsoort.

Belangrijk is wel, dat de bovengenoemde producten niet alleen een goeden groei van laboratoriumstammen mogelijk maakten, maar ook bij de isolatie voldeden (hetgeen met glycerinezuur niet het geval zou zijn), hoewel minder dan extracten van de reeds opgesomde, zuurvaste bacteriën.

Om tot de resultaten uit de monografie terug te keeren, wil het mij niet uit den zin, dat vitamine $B_1$ de eenige factor voor den groei zou zijn, gezien ook de andere door mij aangehaalde artikelen. Uit de monografie zou blijken, dat het een zuur is, naverwant aan de koolhydraten; dus vitamine C? Met de bestendigheid, die T w o r t en I n g r a m beschreven (30 minuten verhitten op 120° zou niet schaden) komt dit echter niet uit.

Hoe het dan ook zij, er is nog veel werk te verrichten als het voorafgaande nauwkeurig overgedaan wordt met kunstmatige voedingsbodems, in plaats van die met ei, zooals T w o r t en I n g r a m gebruikten. Ook voor een ander moeilijk kweekbaar organisme zou dat werk van groote beteekenis kunnen zijn, nml. voor *B. leprae* [1]), waaraan ook de twee bovengenoemde onderzoekers hun krachten gegeven hebben. Alle stoffen, waarmee ze de proeven ter bevordering van den groei van J o h n e's bacterie uitvoerden, bleken geen invloed uit te oefenen, ook niet de speciaal voor dit doel bereide extracten van menschelijk haar en menschelijke huid (en dito van ratten voor de rattenlepra), noch zeewieren.

---

[1]) A. V a u d r e m e r en C. B r u n, die in Presse médicale 92, 1812 (1935) een samenvatting van de 3 vorige artikelen gaven, kweekten dit reeds in 1874 door H a n s e n ontdekte organisme op een kunstmatigen voedingsbodem met Aspergillus fumigatus.

Ik wil deze hoofdstukken eindigen met de vragen:

Hebben alle oorspronkelijk *zuurvaste bacteriën* dezelfde groeifactoren en zou bij ontkenning hiervan er uit te besluiten zijn of hiermede groepsgewijze indeeling mogelijk is?

EIGEN PROEVEN:

Op een suspensie van mijn stammen goot ik in een Petrischaal den agar volgens S ö h n g e n met paraffine liquidum als koolstofbron. Na 3—4 dagen merkte ik op, dat er wel kolonietjes, behalve met de twee stammen van V a l t i s en v a n D e i n s e (dikwijls nog niet ter grootte van een speldeknop) optraden, maar slechts als de bacterie-suspensie dik genoeg was. Het ontbreken van een stikstofbron viel duidelijk op te merken, o.a. ook aan het ontbreken van pigment (alleen *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* waren iets rose). Dit wreekte zich nog meer, toen ik — volgens S ö h n g e n — den agar goot in een diep conisch schaaltje en, na het omgekeerd te hebben, plaatste op een deksel van een kleine Petrischaal, waarop reeds een schaaltje met petroleum (fractie 170°—290°) stond. Hierop gelukte het mij slechts éénmaal, om een stam tot ontwikkeling te brengen.

Na toevoeging van 0,05 % ammoniumchloride aan den agar kon ik met petroleum als koolstofbron, zooals boven beschreven, een goede vermeerdering en nu tevens met pigmentvorming waarnemen. Echter ook zonder petroleum groeiden de stammen, hoewel in mindere mate! Daarom verwonderde het mij ook niet, dat alle stammen, behalve de twee bovengenoemde, ook op den geheel anorganischen voedingsbodem van W o l f f (B r a u n gaf iets andere hoeveelheden) groeiden. De samenstelling was als volgt:

Opgelost in aqua dest.:

0,5 % NaCl,
0,1 % $MgSO_4$. 7 $H_2O$,
0,05 % $KH_2\ PO_4$,
0,15 % $K_2\ HPO_4$,
0,25 % $(NH_4)_2\ SO_4$.

De erlenmeyers van 50 cm³ kookte ik tevoren met koningswater goed uit, spoelde daarna om met aqua dest., steriliseerde en vulde

tenslotte met ong. 7 $cm^3$ van bovenstaande, gesteriliseerde oplossing.

Hoewel ik niet met een groot, maar met een klein oog van een ongeveer 24 uur oude, alkalische bouillon-agarcultuur afentte en na ongeveer 4 dagen reeds het begin van een zeer dun vliesje (van onderen af gezien!) ontdekken kon, merkte ik toch, dat ik niet met minimale hoeveelheden (zooals bij het enten op alkalischen bouillon-agar en gelatine, e.d.) volstaan kon. Steeds binnen een week, entte ik één oogje over op nieuwe vloeistof; zoo werkte ik voort, tot ik 5 passages verkregen had. Steeds vlugger trad het vliesje op, soms reeds binnen 48 uur.

Om uit te maken of de groei soms aan koolzuur te danken was, plaatste ik de erlenmeyers, na enting, in een glazen vat, waarin schaaltjes gevuld met geconcentreerde loog, zoog het geheel luchtledig, liet daarna lucht door waschflesschen met loog binnenstroomen, herhaalde dit proces nog eens, om zeker te zijn, dat geen $CO_2$ meer aanwezig was en sloot tenslotte het vat af.

Van groei was na 1 week nog niets te merken. Dit kan echter ook aan andere factoren, behalve het ontbreken van koolzuur, gelegen hebben, nml. het luchtledig zuigen, de sterke wateronttrekking en ook aan het geheel ontbreken van de broedstoofatmosfeer. Het is toch bij 37° plaatsend — betere resultaten verkreeg, indien de broedstoof vol stond of juist vol gestaan had.

Om na te gaan hoe een Mycobacterie op gistextract groeit en in hoe verre deze ontwikkeling door eenige, nader te noemen stoffen bevorderd of tegengewerkt kan worden, werd [1]) *B. Rabinowitsch* geënt op de volgende voedingsbodems (alle ½ uur bij 110° gestereliseerd), waarbij groei optrad:

1. Extractum Saccharomyces cerevisiae (in 1 l 3 g 5 min. op 115° verhitten en filtreeren).
2. Idem met er in opgelost:
   magnesium-, mangaan-, koper-, titaansulfaat, ferriammo-

[1]) Door J. K. Bottema, chem. drs..

niumcitraat, zinklactaat en secund. calciumphosphaat (van ieder 5 mg per l).

3. No. 2 met 0,3 % lecithine.
4. No. 3 met 0,3 % cholesterol (het cholesterol eerst in zoo weinig mogelijk alcohol oplossen en dit onder roeren in de oplossing druppelen).
5. No. 1 met 0,3 % lecithine.
6. No. 1 met 0,3 % cholesterol.
7. No. 1 met 0,3 % cholesterol en lecithine.

} dus zonder de zouten!

*B. Rabinowitsch* groeide niet op lecithine of cholesterol alleen, ook niet op een van beide met zouten; evenmin op de combinatie van beide, noch als er bovendien zouten aan toegevoegd werden.

De gevolgtrekkingen waren:

I. Zouten bleken een grooten invloed te hebben op voedingsbodems, waarop reeds zonder deze toevoeging ontwikkeling optrad: meer huid- en pigmentvorming.
II. Cholesterol, aan een oplossing met lecithine toegevoegd, hield den groei tegen. Cholesterol alleen bleek bevorderend te werken (overeenstemming met S ö h n g e n).
III. Extract. Saccharomyces cer. is onmisbaar.

Met de voedingsbodems no. 1, no. 5 en no. 7 en bovendien met een mengsel van gelijke deelen 0,3 % waterig lecithine en cholesterol zette ik het onderzoek met *B. Boquet, B. phleï, B. cheloneï, B. Bruynoghe, B. Thomoff* en *B. Pellegrini* voort.

Geen der stammen kon op de combinatie lecithine + cholesterol gedijen, ook niet, nadat ik dezen zuren voedingsbodem van $p_H$ 5,2 op 7,2 gebracht had.

Lecithinetoevoeging aan het Saccharomycesextract gaf nauwelijks eenig verschil te zien met het zuivere extract: in beide gevallen was, na 1 dag een dun huidje gevormd. Met cholesterol bovendien bleek het milieu duidelijk minder geschikt voor genoemde organismen te maken.

Proeven met toevoeging van gistextract aan kunstmatige voedingsbodems zijn niet uitgevoerd, evenmin als die met toevoeging

van filtraten van bouillonculturen. Wel werkte ik met de zuivere filtraten van *B. graminis,* welke ik gedurende wisselende tijden bij 37° op zuren glycerol-bouillon had laten groeien.

Den eersten keer filtreerde ik na één week af. Na enting nam ik na 2 dagen broeden, een flinke huidvorming waar bij *B. phleï, B. Milch Moeller, B. Boquet, B. Kedrowski* en *B. Thomoff;* een dun huidje bij *B. Bruynoghe, B. cheloneï, B. Grassberger* en de *slangbacterie. B. Pellegrini* groeide troebel, *B. Valtis en v. Deinse wit* zelfs na 3 weken in het geheel niet, terwijl *B. Ninni wit* (toen nog in een langzaam groeiend stadium) eerst na 4 dagen ontwikkeling vertoonde.

Het filtraat van de 8 weken oude cultuur van *B. graminis* bevond ik nog niet uitgeput voor *B. phleï, B. Milch Moeller, B. Boquet, B. Kedrowski, B. Thomoff* en *B. Ninni wit.*

## HOOFDSTUK VI.

### Vergelijkend onderzoek naar vorm en kleurbaarheid van Mycobacteriën in alkalischen en zuren 4 %-glycerolbouillon.

LITERATUUROVERZICHT:

Moeller[1]) beschreef de betrekkingen tusschen de *tuberkelbacterie* en eenige zuurvaste *saprophyten*. Hierin kan men lezen, dat wat kleurbaarheid betreft, zijn tweede *grasbacterie* (waarvan het uiterlijk sterk aan het organisme van Rabinowitsch herinnert) zich tinctorieel als de *timothee- (B. phleï)*, maar ook als de *tuberkelbacterie* gedroeg; slechts in oude culturen nam hij eenig verlies van de zuurvastheid waar. Vergeleken met laatstgenoemde vertoonden ook zijn uit melk en mest geïsoleerde bacteriën slechts geringe afwijkingen.

Ook de morphologie van alle genoemde organismen kwam grootendeels overeen. Evenals in de *tuberkelbacterie* zag hij in de genoemde organismen donker gekleurde korrels, tevens vertakkingen en, aan één uiteinde, soms knodsvormige aanzwellingen.

Een kleurmethode gaf hij niet op, wel de afmetingen. Nml. *B. graminis*[2]) 1—5 $\mu$ lang en 0,2—0,4 $\mu$ breed; *B. stercusis*[3]) 1—4 $\mu$ lang en 0,2—0.4 $\mu$ breed; *B. phleï*[4]) 1—4 $\mu$ lang en 0,2—0,5 $\mu$ breed.

Saenz[5]) stelde vast, dat het uiterlijk en de zuurvastheid van *B. cheloneï* (de schildpadbacterie van Friedmann) wisselden met het milieu en den ouderdom van de cultuur. Op eihoudende voedingsbodems trof hij in ketens van 2 tot 6 gerangschikte coccoïde vormen aan. In jonge culturen waren de niet-zuurvaste talrijk; in beter ontwikkelde boden ze, na met fuchsine gekleurd te zijn, weerstand aan de ontkleurende werking van 33 % $HNO_3$ en

---

[1]) A. Moeller, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 30, 513 (1901).
[2]) Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 25, 369 (1898).
[4]) Ther. Monatsh. 12, 607 (1898).
[4]) Ther. Mon. hefte 12, 607 (1898).
[5]) A. Saenz, Ann. inst. Pasteur 47, 4 (1931).

aan die van alcohol bij 90°. Saenz schreef in dit verband: „Ce sont donc des bacilles acido-alcoolo-resistants vrais". Van welk milieu ze ook kwamen: alle elementen waren steeds Grampositief.

Braun en mw.[1]) stelden de zuurvastheid van ditzelfde organisme met groote regelmatigheid vast. Na Gramkleuring verkregen zij slanke, donkerblauwe staafjes, waarin talrijke korrels.

Tenslotte vermeldde Friedmann[2]) zelf, dat zijn culturen volledig zuur- en alcoholvast waren, maar dat in jonge, zoowel als in oude, ook niet-zuurvaste elementen voorkwamen. Na 6—8 weken nam hij, als involutievormen, korrels en draden waar. Hij bepaalde tevens de lengten van op verschillende voedingsbodems gegroeide stammen en vond 1,6—4,5 $\mu$.

Boquet[3]) zag in de door Johne's bacterie geïnfecteerde weefsels: staafjes van 1—2 $\mu$ lang, cocco-bacillen, korrels; verder ook lange staafjes en aan één kant opgezwollen elementen. De polymorphie was vooral duidelijk in vloeibare voedingsbodems. Door polymorphie en uiterlijk deden deze bacteriën hem meer denken aan *B. phleï*, dan aan de bacterie van Koch. Gekleurd volgens Ziehl-Neelsen waren ze eenvormig rood of door één of meer donkere korrels gestippeld, dus duidelijk zuurvast, evenals Gram-positief.

Johne en Frothingham[4]) konden na de kleuring van hun bacterie, volgens Ziehl (½—15 minuten in salpeter- resp. zwavelzuur of alcohol ontkleurd), niet het minste verschil aantoonen met de *tuberkelbacteriën* van zoogdieren. Wel waren ze volgens hen iets kleiner en korreliger dan laatstgenoemde organismen, maar ze gaven toe, dat ook bij het zoogdiertype wel kleinere vormen voorkomen. Coliachtige en coccoïde staafjes vonden ze vooral in de bovenste deelen der necrotische slijmhuid van aangetaste runderen.

---

[1]) Biochem. Z. 146, 575 (1924).

[2]) F. F. Friedmann, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 34, 647 (1903).

[3]) A. Boquet, Ann. inst. Pasteur 42 I, 495 (1928).

[4]) Johne en Frothingham, Deutsche Z. Thiermed. 21, 438 (1895).

Bruynoghe en Adant[1]) gaven als lengte voor het door hen geïsoleerde organisme op: gemiddeld 6 à 8 $\mu$ lang; in glycerol-bouillon gekweekt, bleken de staafjes korter. Volgens hen was de bacterie toen Gram-positief en zuur- en alcoholvast, onafhankelijk van ouderdom en milieu, en onderscheidde zich daardoor van *B. luteum* Söhngen, waarbij de alcoholvastheid juist ontbrak.

In de literatuur vond ik twee bacteriën, uit slangen geïsoleerd, beschreven:

Ten eerste door Sibley[2]), die geen morphologische en cultureele bijzonderheden opgaf en slechts den pathologisch-anatomischen bouw der organen van de aangetaste slangen mededeelde en ten tweede door Aronson[3]), die den naam *Mycobacterium thamnopheos* gaf. Hij stelde als gemiddelde lengte 4—7 $\mu$ vast. Vertakkingen zag hij nooit, wel donker gekleurde poolkorrels. De fuchsinekleur werd door enkele nog vastgehouden na 10 minuten ontkleuren met 25 % zwavelzuur; vele waren echter reeds ontkleurd door 3 minuten inwerking van 3 % zout- of 5 % salpeterzuur. Na 3 minuten in 96 % alcohol hadden alle staafjes hun zuurvastheid verloren. Kleurbaarheid volgens Gram bestond bij alle. Daar de afkomst bij de mij ter beschikking gestelde organismen niet vermeld was, weet ik niet of de „slangbacterie", welke bij dit onderzoek is gebruikt, één van deze twee beschrevenen is of een geheel andere.

---

EIGEN ONDERZOEK:

Zooals ik reeds boven dit hoofdstuk schreef, werkte ik met alkalischen (a) en met zuren (z) 4 % glycerol-bouillon als voedingsbodem. De eerste had een $p_H$ 7,2 en de tweede een van 6,2. Deze vloeistoffen entte ik telkens met een ongeveer 24 uur oude, gewone, alkalische bouillonagarcultuur en plaatste de buisjes, waarin 5 cm$^3$, bouillon bij 22°, 37° en 45°.

Na bepaalde tijden nam ik met een oogje iets van de gevormde

---

[1]) R. Bruynoghe en M. Adant, Compt. rend. biol. **111**, 1051 (1932).
[2]) W. K. Sibley, Virch. Arch. **116**, 104 (1889).
[3]) J. D. Aronson, J. inf. Dis. **44**, 214 (1929).

huid, doopte dit eenige malen in een druppel schoon water om bouillonresten te verwijderen en streek zorgvuldig op een schoon voorwerpglas uit. Na drogen aan de lucht, fixeerde ik het praeparaat voorzichtig in de vlam.

Telkens maakte ik van hetzelfde huidje eenige praeparaten tegelijk, om ze te kleuren volgens:

1. Ziehl-Neelsen.
2. Fontès.
3. Gram.
4. Much.

Daar ik de opgegeven tijden, vooral de kleuring met methylviolet, bij methode 2 en 4 te lang vond, daar deze berekend was op het kleuren in weefsels, verkortte ik deze.

Van alle kleuringsmethoden zal ik slechts de door mij toegepaste hieronder vermelden.

1 a. Ziehl-Neelsen (als afkorting Z.-N. zonder meer):

In de warmte (tot juist dampvorming) 3 min. kleuren met carbolfuchsine, na bekoeling goed afspoelen met water, laten drogen ×, *10 minuten* ontkleuren in *5 % zoutzuren alcohol,* afspoelen, laten drogen, nakleuren met waterige methyleenblauwoplossing, afspoelen, laten drogen.

*b.* de door mij toegepaste veranderingen betroffen den ontkleuringstijd (van ½ min. af tot 24 uur toe) en het ontkleuringsmiddel. I.p.v. 5 % zoutzuren alcohol gebruikte ik, naar gelang de omstandigheden, ook 5 en 1 % zwavel- en 3 % zoutzuur.

2. Fontès[1]) (als afkorting F):

Als boven tot het kruisje, daarna ½ min. boven de vlam kleuren (tot juist dampvorming) met carbolmethylviolet (10 cm³ verzadigde alcoholische oplossing van methylviolet met 90 cm³ 2 % phenol), na 1½ min. afkoelen, beitste ik, zonder afspoelen, 2 minuten met lugol, hierna volgde 1 min. ontkleuren met een mengsel van gelijke deelen aceton en alcohol van 96 %, tenslotte afspoelen

---

[1]) Vgl. A. Fontès, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 49, 317 (1907).

met water en als aangegeven nakleuren met methyleenblauwoplossing.

3. Gram (als afkorting G):

Tot juist dampvorming gedurende ½ min. kleuren met carbolgentiaanviolet, 1½ min. laten afkoelen, zonder vooraf afspoelen, 2 min. beitsen met lugol °, 1 min. ontkleuren in alcohol van 96 %, afspoelen, laten drogen, 1 min. nakleuren met 20 × verdunde carbolfuchsine, naspoelen, drogen.

4. Much[1]) (als afkorting M.):

Als 3 tot het nulletje, daarna achtereenvolgens ontkleuren: 1 min. met 5 % salpeter-, 10 sec. met 3 % zoutzuur en 1 min. met gelijke deelen aceton en 96 % alcohol, na afspoelen als Gram nakleuren.

(Much kleurde zelf niet na).

2 en 4 zijn speciale kleuringen voor eventueele granula.

Het resultaat der kleuringen is in de onderstaande tabellen aangegeven, terwijl aan het eind van iedere tabel een samenvatting volgt:

**B. Boquet.**

| | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|
| 45° 2 d.: | *Z.-N.:*<br>*Roode staafjes, 0,7—3,3 μ*, met fijne, donkere korrels.<br>*F.:* Minder korreling dan in Z.-N.. Alle staafjes rood.<br>*G.:* Geen korreling. Alles donkerblauw.<br>*M.:* Rose staafjes met fijne, blauwe korrels. | *Z.-N.:*<br>Iets minder gekorreld dan *a.* 0,7—2,4 *μ*.<br>*F.:* Als *a.*<br>*G.:* Als *a.*<br>*M.:* Als *a.* |

[1]) Vgl. H. Much, Beitr. Klin. Tbk. 8, 85 en 357 (1907).

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 3 d.: | *Z.-N.:* Roode, gekorr. staafjes, tot 6 $\mu$ (meeste 2 $\mu$). Eenige myceliumachtige vertakkingen 5—10 $\mu$.<br>*F.:* Als na 2 d. fijne, gekorrelde, roode staafjes. Ong. ½ der staafjes is niet gekorreld.<br>*G.:* Onduidelijke korreling. Alles +.<br>*M.:* Ong. ½ is zeer mooi gekorreld. | *Z.-N.:* Minder duidelijke korreling dan na 2 d.; 0,7—3 $\mu$, meeste 2 $\mu$. Spaarzame vertakkingen.<br>*F.:* Ongeveer als *a*.<br>*G.:* Bijna geen korreling. Alles +, op één draad van 7 $\mu$ na.<br>*M.:* Iets minder duidelijk gekorreld dan *a*. |
| | 5 d.: | *Z.-N.:* Ook hier duidelijk gekorreld. 1—10 $\mu$. Van de lange vormen is omtrek zoo goed als niet te zien.<br>Na *4 uur* ontkleuren: Nog flets rood.<br>*F.:* Behalve fijne korreling, verdikking te zien. Niet zoo'n mooie korreling als in Z.-N..<br>Lange draden zijn bezig uiteen te vallen in staafjes.<br>*G.:* Vrijwel niets van korreling te zien. Slechts een paar Gramnegatief.<br>Hier duidelijk coccoïde vormen.<br>*M.:* Fijn gekorreld, maar de andere rose staafjes zijn dikwijls flauw zichtbaar. | *Z.-N.:* Vrij duidelijke, soms uitpuilende korreling. 1—7 $\mu$. Nog steeds spaarzame vertakkingen.<br>*„Z.-N." 4 u.:* Als *a*, nog duidelijk gekorreld.<br>*F.:* Ook onduidelijker gekorreld dan Z.-N.. Evenals *a:* alles rood. Kleine vormen het duidelijkst gekorreld.<br>*G.:* Kleinste vormen soms duidelijk gekorreld. Coccoïde vormen doen zich, evenals in *a*, voor als losse korrels.<br>*M.:* Als *a*. |
| | 8 d.: | *Z.-N.:* Rood, gekorreld. Tot 8 $\mu$ (vele 2 $\mu$). Nog steeds vertakkingen.<br>*F.:* 25 % is mooi gekorreld. Ook hier is van vele draden de omtrek bijna onzichtbaar.<br>*G.:* Eenige korreling, alleen te merken aan uitpuilingen. Zoo goed als alle +. | *Z.-N.: 0,6—6* $\mu$ roode, weinig en hoogstens eindstandig gekorrelde staven. Zeer weinig vertakkingen.<br>*F.:* Weinig duidelijk gekorreld.<br>*G.:* Soms heel fijne korreling. Als *a:* +. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 8 d.: | *M.:* Fijne en grove granulatie; ook hier is omtrek dikwijls niet zichtbaar. | *M.:* Fijn gekorreld. Omtrek als *a*. |
| | 2 w.: | Als na 8 dagen. | Draden zijn uiteengevallen in staafjes van 0,6 tot 3 $\mu$; de kleinste vormen, welke op coccen lijken, overwegen. In alle praeparaten weinig korreling; in de langste staafjes nog het meest. |
| | 4 w.: | *Z.-N.:* Nu hierin uiteengevallen draden: 0,4—6 $\mu$, maar zeer veel staafjes van 1 $\mu$. Evenals *z* steeds zuuralcoholvast en G +. Weinig korreling.<br>*F.:* Zelfs de kleinste duidelijk fijn gekorreld. Coccoïde vormen als losse granula.<br>*M.:* Als F. | *Z.-N.:* Nog meer uiteengevallen, nu hoogstens 2 $\mu$ en als boven zeer weinig gekorreld.<br>*F.:* Als *a*.<br>*M.:* Als *a*. |
| 37° | 2 d.: | *Z.-N.: 0,8—2,5 $\mu$ roode,* onduidelijk gekorrelde staafjes; meeste ruim 1 $\mu$.<br>*F.:* Ong. ½ der bacteriën is vrij duidelijk gekorreld. Korrels dicht naast elkaar gelegen; zie *z*.<br>*G.:* +; geen korreling.<br>*M.:* Fijn gekorrelde, dunne roode staafjes. | *Z.-N.:* 0,8—2 $\mu$ *roode* staafjes, waarvan enkele fijn gekorreld.<br>*F.:* Zeer gekorreld, zoodat het geheel een donkerblauwen indruk geeft; rood daardoor weinig te zien.<br>*G.:* Als *a*.<br>*M.:* Als *a*. |
| | 3 d.: | Vrijwel hetzelfde als na 2 dagen. | |
| | 5 d.: | *Z.-N.: 0,6—5 $\mu$* (gemiddeld 2 à 3 $\mu$) gekorrelde, roode staven. Van enkele lange is de samenhang niet goed meer zichtbaar.<br>*„Z.-N." 4 uur:* Nog flets rose; duidelijk gekorreld. | *Z.-N.:* Tot 10 $\mu$, gemidd. 3—4 $\mu$). Verder als *a*.<br>*„Z.-N." 4 uur:* Als *a*. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| | *F.:* Zeer fijn gekorreld; korrels liggen dicht tegen elkaar aan. Van nu af treden enkele blauwe staven op.<br>*G.:* Behalve kleine uitzonderingen alles +. Geen korreling.<br>*M.:* Goed gekorreld, behalve de kleinste. Van eenige is de omtrek vervaagd. | *F.:* Als *a*, maar ook hier is het Z.-N. pp. wat korreling betreft toch mooier.<br>*G.:* Als *a*.<br>*M.:* Als *a*, maar meer gekorreld. Evenals in *a* op losse granula gelijkende vormen. |
| 8 d.: | *Z.-N.:* Meeste staafjes ruim 1 $\mu$, toch 7 $\mu$ geen uitzondering;; in het M-pp. zelfs 1 van 16 $\mu$. Veelvuldige myceliumachtige vertakkingen: soms 3 à 4 takken. 10 % flets rose.<br>*F.:* Duidelijk gekorreld. Alles nog rood.<br>*G.:* In lange vormen iets, maar onduidelijk gekorreld. Alles +.<br>*M.:* Nogal duidelijk gekorreld. Omtrek dikwijls verdwenen. Losse korrels? | *Z.-N.:* Gemiddeld 1,5 $\mu$; tot 12 $\mu$. Alles rood. Korrels zeer donker: net zoo paarsachtig als in F. Vertakkingen als in *a*.<br>*F.:* Korreling niet zoo duidelijk als in Z.-N..<br>*G.:* Bijna geen korreling en alles +.<br>*M.:* Als *a*. |
| 2 w.: | *Z.-N.:* Gedeeltelijk uiteengevallen, nog wel enkele fletse draden en vertakkingen; weinig langer dan 4 $\mu$.<br>*F.:* Korreling meestal niet duidelijk; nog 't duidelijkst in staafjes tot 1,5 $\mu$.<br>*G.:* Door uitpuiling soms iets van korreling te zien.<br>*M.:* Vele mooi gekorreld. Van ong. ¼ is de omtrek weg. | *Z.-N.:* Meeste 0,6—3 $\mu$; de enkele vertakkingen tot 8 $\mu$ bezig om uiteen te vallen. Lange vormen ook hier flets gekleurd. Fijne korreling.<br>*F.:* Slechts 20 % vrij duidelijk gekorreld.<br>*G.:* Ook hier evenals in *a* bijna niet gekorreld.<br>*M.:* Fijne en duidelijke korreling, ong. als *a*. |
| 4 w.: | Komt op hetzelfde neer als na 2 weken. | |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| 22° 2 d.: | *Z.-N.:* Niet-gekorrelde staafjes (gemidd. 1 $\mu$) 0,8—3 $\mu$. Van de kleinste zijn een paar flets blauw. | *Z.-N.:* 0,6—1,7 $\mu$. Soms eindstandige korreling. Blauw als *a.* |
| | *F.:* Mooi gekorreld, maar de staafjes zijn meer blauw dan rood. | *F.:* Zeer gekorreld; in een staafje van 1 $\mu$ 4 à 5 korrels. Staafjes eigenlijk niet rood te noemen. |
| | *G.:* Paarsachtig, niet gekorreld. | *G.:* Als *a.* |
| | *M.:* Slechts weinig gekorreld; in langste staafjes vrij duidelijk. | *M.:* Beter gekorreld dan *a.* |
| 1 w. en 2 w.: | *Z.-N.: 0,6—4 $\mu$* (gemiddeld 2 $\mu$). Zuurvasth. als na 2 d. | *Z.-N.:* 0,3—3 $\mu$ (meeste kleiner dan 1 $\mu$). Zuurvasth. als boven. |
| | *F.: Geen* roode staafjes. Van de meeste is de omtrek flauw zichtbaar. Slechts duidelijk rijtjes losse, donkere korrels. | *F.:* Geen rood. Rijtjes losse korrels. |

*Samenvatting (B. Boquet):*

Wat betreft de ontwikkeling bij 37° en 45°, is er geen principieel verschil op te merken; alleen gaat ze bij eerstgenoemde temperatuur wat langzamer, zoodat een cultuur van 5 dagen bij 45° ongeveer gelijk staat met een van 8 dagen bij 37°.

In den zuren glycerol-bouillon nam ik iets kortere vormen dan in den alkalischen waar, maar overigens kwamen in beide dezelfde vormen voor, nml.:

Eerst korte, onduidelijk gekorrelde staafjes, dan langere duidelijker gekorrelde; daarna verschenen vertakkingen (uit korrels ontspringend) en onregelmatig gekleurde draden (omtrek dikwijls onzichtbaar!); deze laatste vielen tenslotte uiteen, waardoor de korrels vrij werden, maar vrijwel meteen begonnen uit te groeien tot coccoïde staafjes. Zoo goed als steeds, voor zoover de omtrek

zichtbaar was, waren de staafjes *goed zuuralcoholvast*. Niet alleen na 4 uur, maar ook na langere ontkleuring in zoutz. alcohol was nog van blauw geen sprake. De korrels waren donker gekleurd. Ook de ontkleuring met aceton en alcohol (F o n t è s) verdroegen de staafjes goed.

G r a m-praeparaten vertoonden bijna alle positieve elementen (overeenkomstig de literatuur); zoo ik hierin eenige korreling zag was deze zéér onduidelijk.

Volgens M u c h behandeld, bleken de praeparaten dikwijls even mooi gekorreld als volgens Z.-N.; de toevoeging van aceton in de ontkleuring volgens M u c h was, vgl. bij G r a m, duidelijk merkbaar. In eerstgenoemde waren de korrels G r a m + en de staven —. De korreling in F. was niet zoo mooi waar te nemen, daar hierin de korrels veelal zeer dicht opgehoopt waren; het rood van den omtrek kwam daardoor niet steeds duidelijk uit.

Een geheel ander beeld vertoonden de culturen bij 22° gekweekt. De huid, zoowel op den zuren, als op den alkalischen bouillon, bleef dun en ging gemakkelijk stuk; die bij 37° en 45° was na één week al dik, rimpelig, omhoog kruipend en moeilijk uit te strijken. Ook microscopisch maakte het een groot onderscheid.

De staafjes waren nog grootendeels zuuralcoholvast, maar de sterker werkende aceton-alcohol (F) *ontkleurde* ze totaal. Wel zijn ze G r a m +. Van draden of vertakkingen geen sprake. De lengte vertoonde overeenkomst met die der bacteriën, welke B o q u e t in de weefsels aantrof; deze laatste bezaten echter duidelijke zuuralcoholvastheid.

---

**B. Thomoff.**

| | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|
| 45° 3 d.: | Nog geen vliesje; daarom geen praeparaten gemaakt. Op *z* een zeer dun vliesje. | *Z.-N.:* 0,4—1,4 $\mu$ dunne, *blauwe* staafjes, maar enkele iets gekorreld. Vele liggen //.<br>*„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Geen rood. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 3 d.: | | *M.:* Ook hierin weinig korreling. |
| | | *„Z.-N." ½ min. $H_2SO_4$:* 0,3—2 $\mu$ blauwe, gekorrelde staafjes. | *„Z.-N." ½ min. $H_2SO_4$:* Als na 3 d.: meest nog niet 1 $\mu$. Ook blauw. Korreling twijfelachtig. |
| | | *F.:* Blauwe staafjes met donkere korrels. Door 't blauw is de korreling niet duidelijk. | *F.:* Als *a*, maar toch iets duidelijker gekorreld. |
| | | *M.:* Wel fijne, maar toch onduidelijke korreling. Losse korrels. | *M.:* Als *a*. |
| | | Hierna geen pp. meer gemaakt, omdat de vliesjes niet meer bij groeiden. | |
| 37° | 1 d.: | *„Z.-N." 1 min 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—2 $\mu$ *blauwe* staafjes, waarvan de grootste soms duidelijk gekorreld zijn. | *„Z.-N." 1 min 1 % $H_2SO_4$:* Als *a*, maar lengte tot 3 $\mu$. |
| | | *F.:* Vrij duidelijk gekorrelde blauwe staafjes, zelfs de kleinste. | *F.:* Als *a*. |
| | | *G.:* Niets van korreling te zien; het // en V liggen is hier duidelijk. Bijna alles +. | *G.:* Iets van korreling te zien. Verder als *a*. |
| | | *M.:* Maar weinig duidelijker dan G. | *M.:* Ong. als G. |
| | 4 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Meest flets blauwe staafjes van nog geen 2 $\mu$. | *„Z.-N." 1 min 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—3 $\mu$ (meeste 2 $\mu$) blauwe, duidelijk eindstandig gekorrelde staafjes. |
| | | *F.:* Vooral eindstandig duidelijk gekorreld. | *F.:* Vrij goede korreling; geen niet-gekorrelde. |
| | | *G.:* Als na 1 dag: niet gekorreld. | *G.:* Als *a;* echter in grootste nog iets korreling. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| | | *M.*: Ongeveer als G. | *M.*: Iets duidelijker gekorr. dan in G. |
| | 9 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1% $H_2SO_4$:* 0,4—2 $\mu$ (gemidd. 1 $\mu$) gekorrelde, blauwe staafjes. | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Tot 6 $\mu$ blauwe staafjes; duidelijker gekorreld dan *a*, vooral eindstandig. |
| | | *F.*: Duidelijker gekorreld dan „Z.-N.". Losse korrels. | *F.*: Duidelijke korreling als „Z.-N.". Losse korrels. |
| | | *G.*: Als na 4 d.. Soms iets verdikt. | *G.*: Vrij duidelijk gekorreld. |
| | | *M.*: Fijn gegranuleerd. Losse korrels. | *M.*: Niet veel verschil met G. |
| 22° | 1 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,4—2,4 $\mu$ *blauwe*, duidelijk gekorrelde staafjes; de korte overwegen. | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Als *a*, maar tot 4 $\mu$. |
| | | *F.*: ½ is zeer duidelijk gekorreld. | *F.*: Als *a*, maar hier komen de korrels nog duidelijker uit. |
| | | *G.*: Bijna geen korreling. | *G.*: Iets minder onduidelijk dan *a*. |
| | | *M.*: Vooral hier valt de // ligging duidelijk op. Slechts weinig korreling. | *M.*: Vrij duidelijk gekorreld, maar F. toch het beste. |
| | 4 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—1,4 $\mu$ (gemiddeld 1 $\mu$) gekorrelde blauwe staafjes. | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Tot bijna 2 $\mu$ gekorrelde blauwe staafjes. |
| | | *F.*: Fijne korreling. | *F.*: Vooral aan uiteinden duidelijk gekorreld. |
| | | *M.*: Korreling niet duidelijk. Weer // gerangschikt. | *M.*: Vrij duidelijk gekorreld. Ook hier. |
| | 8 d.: | *„Z-N." ½min. 3% HCl:* Blauwe, duidelijk gekorrelde staafjes: 0,6—2 $\mu$ (meest 1,5 $\mu$). | *„Z.-N." ½ min. 3 % HCl:* Tot 2 $\mu$ gekorrelde blauwe staafjes, ongeveer als *a*. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 22° | 8 d.: | *F.:* Duidel. gekorrelde blauwe staafjes.<br>*M.:* Duidelijk gekorrelde staafjes; de grootste hebben 4 korrels. Mooier dan F. | *F.:* Als *a.*<br>*M.:* Zelfs kleinste zijn goed gekorreld. |
| | 12 d.: | *„Z.-N." ½ min. 3 % HCl:* 0,4 tot bijna 3 $\mu$ wazig blauwe staafjes met duidelijke korreling.<br>*F.:* Zeer duidelijke korreling, staafjes dikwijls kleurloos.<br>*M.:* Ook hier duidelijke korreling. | *„Z.-N." ½ min 3 % HCl:* Ook hier flets blauwe staafjes tot 2½ $\mu$, maar ook 5 % roode staafjes. Er zijn meer weinig beneden 1 $\mu$.<br>*F.:* Zeer fijn gekorreld.<br>*M.:* Als *a*, maar nog mooier. |
| | 18 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—3 $\mu$ zeer flets blauw gekleurde staafjes met zeer duidelijke korreling.<br>*M.:* Zeer mooi gekorreld, vooral eindstandige korreling duidelijk. | *„Z.-N." 1 min 1 % $H_2SO_4$:* Tot 4 $\mu$; paar % roode en verder fletse staafjes; korreling: matig. Na behandeling van het pp. ½ d. in xyleen nog steeds eenige *roode* staafjes.<br>*M.:* Als *a.* De M. pp. zijn over 't algemeen mooier dan de „Z.-N.". |
| | 24 d.: | Tot 4,5 $\mu$; verder als boven. | Nu is ook 't rood flets. Staafjes meest kleiner dan in *a.* |

*Samenvatting (B. Thomoff):*

1. Noch in zuren, noch in alkalischen glycerol-bouillon bestaat zuuralcoholvastheid, hoogstens een geringe zuurvastheid en dan nog slechts in de eerstgenoemde vloeistof bij 22° gekweekt.

2. Over het algemeen is de groei bij alle temperaturen in het eerstgenoemde milieu beter dan in het tweede.

3. 45° is de meest ongeschikte temperatuur voor dit organisme; bij 22° komt de dikste huid en met de meeste pigmentvorming voor (oranje-vleeschkleurig); hierbij is het verschil tusschen a en z slechts gering.

4. Bij 37° zijn de staafjes in z meestal langer en meer gekorreld dan in a; bij 22° bestaat de sterkste granulatie en hierbij zijn in a de staafjes langer, evenals bij 45°.

6. Polymorphie beperkt zich tot coccoïde vormen, welke zich somtijds als losse korrels voordien, en tot korte en iets langere staafjes. Vertakkingen en draden komen niet voor. Bij de kleine elementen is duidelijk de evenwijdige ligging en die in V-vorm waar te nemen, vooral in M u c h-praeparaten.

---

**B. Bruynoghe.**

| | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|
| 45° 1 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,4—1,2 $\mu$ iets gekorrelde, *blauwe* staafjes. | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—1,6 $\mu$. Staafjes fletser dan in *a*. Donkerroode korrels in staafjes, waarvan omtrek bijna zichtbaar is. |
| | *5 sec.:* Geen enkel rood staafje. | *10 sec.:* Nu ook een paar roode staafjes. |
| | *G.:* Zoo goed als geen korreling. | *G.:* Ongeveer als *a*. |
| | *M.:* Scheelt niet veel met G. Evenwijdige ligging als in *z*. | *M.:* Ongeveer als *a*, maar vrij duidelijk zijn staafjes met 1 eindstandige korrel. |
| 3 d.: | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$* (niet nagekleurd): Zeer fletse roode staafjes 0,4—1,4 $\mu$. | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Meeste staafjes zijn flets rose 0,5—1,6 $\mu$. 30 % zeer duidelijk gekorreld: de langste. |
| | *Nagekleurd:* Alles blauw en goed gekorreld. | *Nagekleurd:* Geen enkel rood staafje. |
| | *M.:* Van de langste is een enkele gekorreld. | *M.:* Korreling maar matig. |
| 1 w.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,3—0,8 $\mu$: vele typische coccoïde vormen (blauw). | *„Z.-N." 1 min 1 % $H_2SO_4$:* 0,2—1,4 $\mu$ (meeste nog niet 1 $\mu$): zoo goed als alles blauw; bijna niet gekorreld. |
| | *M.:* Vormen als citroenen. Zoo goed als geen korreling. | *M.:* Als *a*. |

---

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 37° | 1 d.: | *Z.-N.:* 0,4—2 $\mu$ blauw gekorreld.<br>*F.:* Alles gekorreld.<br>*G.:* Zeer weinig korreling. Op een enkele uitzondering na alles +.<br>*M.:* Vrijwel hetzelfde als G. | *Z.-N.:* 0,3—1,4 $\mu$ iets gekorrelde blauwe // staafjes.<br>*F.:* Ong. als Z.-N.<br>*G.:* Als *a*.<br>*M.:* Als *a*. |
| | 4 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min.:* 0,3—1 $\mu$ (meeste 0,5 $\mu$) blauwe gekorrelde staafjes.<br>*3 min. 1 % $H_2SO_4$:* Flets blauw, maar zoo goed als geen rood.<br>*M.:* Zoo goed als geen korreling. | „*Z.-N.*" ½ *min.:* Iets duidelijker gekorreld dan in *a*. 0,2—1,7 $\mu$.<br>*3 min. 1 % $H_2SO_4$:* Bijna geen rood. Zeer flets gekleurd.<br>*M.:* Vrij duidelijke korreling. |
| | 1 w.: | „*Z.-N.*" *1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Blauwe, soms eindstandig gekorrelde staafjes. Lengte als na 4 d.. | „*Z.-N.*" *1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Duidelijk gekorreld. |
| | 11 d.: | „*Z.-N.*" *1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,4—0,7 $\mu$ duidelijk blauwe, iets gekorrelde, ovoïde staafjes. //<br>*M.:* Iets gekorreld. //-ige ligging. | „*Z.-N.*" *1 min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,2—1 $\mu$. Achter elkaar liggende, net of een draad stuk gegaan is.<br>*M.:* Als *a*. |
| 22° | 3 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,3—1 $\mu$ gekorrelde, flets blauwe, // staafjes, *10—20 % rood.*<br>*M.:* Bijna geen korreling. | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—2 $\mu$, gekorrelde, blauwe staafjes.<br>*M.:* Korreling moeilijk te zien, behalve sommige eindstandige. |
| | 10 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Alle blauw (soms flets): 0,3—1 $\mu$; nu duidelijk gekorreld. | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* 0,6—1,8 $\mu$ gekorr. blauw (maar fletser dan *a*). Heel enkele roode staafjes. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| 22° 10 d.: | *M.:* In groepjes (meest 4) gerangschikte coccoïde staafjes. Geen korreling. | *M.:* Iets korreling. Hoewel grooter dan in *a*, toch ook vele kleine vormen. |
| 2½ w.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Lengte als boven. Zonder nakleuren vrij duidelijk rood.<br>*M.:* Gekorreld. | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Als boven.<br>*M.:* Korreling niet te zien. |

*Samenvatting (B. B r u y n o g h e):*

Evenals van B. T h o m o f f vertoonen ook de praeparaten van B. B r u y n o g h e een weinig polymorph beeld. De lengten van de laatste blijven zelfs nog beneden die van eerstgenoemde bacterie; 2 $\mu$ is het maximum, hetwelk slechts in zuren bouillon voorkomt. Van zuuralcoholvastheid is ook hier geen sprake. *Zuurvastheid is al zeldzaam.*

Deze schijnbare tegenspraak met de literatuur zal ik nog in het volgende hoofdstuk behandelen.

Wat de groei bij 22° en 45° betreft, zijn beide organismen elkaars spiegelbeeld.

De korreling in M u c h-praeparaten kan ik maar zeer matig noemen; in z beter dan in a. In Z.-N. praeparaten zijn de korrels nog het duidelijkst zichtbaar en zijn de omtrekken der staafjes dikwijls flets.

---

**B. Ninni (wit)**

In den tijd, dat ik deze bacterie op a en z entte, was zij nog in het langzame groeistadium en wilde zich bij 45° niet ontwikkelen.

De huidjes waren bij 37° en 22° niet stevig. Na 5 dagen gingen die bij 37° stuk; daarom maakte ik eerst na 10 dagen praeparaten.

| | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|
| 37° 10 d.: | *Z.-N.:* Zeer fijn en duidelijk gekorrelde *roode* staafjes van 0,8—2,4 $\mu$. Geen blauw.<br>*6 uur:* Weinig verschil met het bovenstaande; slechts enkele blauw.<br>*F.:* Zeer fijn gekorreld; korrels iets donkerder dan in Z.-N. Duidelijk *roode* staafjes.<br><br>*G.:* Geen korreling, wel verdikkingen aan het eind.<br>*M.:* Zeer fijn, maar vrij onduid. gekorreld (ook kleinste gekorreld). Omtrek vrij flets. F. en Z.-N. mooier | *Z.-N.:* Als *a*, maar tot 3 $\mu$ en van sommige is de omtrek weg; daardoor losse korrels?<br>*6 uur:* Ook als bovenstaand.<br><br>*F.:* Ook hier zijn korrels donkerder dan in Z.-N.; het Z.-N. pp. is het mooist. Alles duidelijk *rood.*<br>*G.:* Eenige korreling waar te nemen.<br>*M.:* Ongeveer als *a*. |
| 3 w.: | | *Z.-N.:* tot 6 $\mu$, mooi gekorrelde staafjes. Draadachtig beeld. Omtrek van sommige weg.<br>*6 uur:* Nog duidelijk rood gekorrelde staafjes, hoewel 20 % flets.<br>*F.:* 40 % flets rose staafjes: alle duidelijk gekorreld.<br>*G.:* Weinig korreling. Alles +. |

22° Hierin ontstond eerst ook een huidje, hetwelk naar beneden zakte. Hierna ontstond slechts op *z*, 5 weken na enting, een dun huidje.

A l l e e n *z*.

5 w.: *Z.-N.:* 0,6—2 $\mu$ mooi gekorrelde, *roode* staafjes, waarvan vele cocachtig en daardoor lijkend op losse korrels.
*2 uur:* Maar weinig fletser geworden.
*F.:* Staafjes zijn *bijna niet rood.* Duidelijk fijne korreling.
*G.:* Wel iets gekorreld. Alles +.
*M.:* Vrij mooie korreling.

*Samenvatting (B. N i n n i w i t):*

Ook hier is de polymorphie van weinig beteekenis. Er bestaat een *goede zuuralcoholvastheid.* Bij 22° gekweekt *ontkleuren* echter de staafjes door aceton-alcohol.

De korreling kan ik over het algemeen goed noemen.

Toen de bacterie langzamerhand vlugger was gaan groeien, zette ik deze proeven eenige jaren later nog eens in. Ik kweekte bij 37° en 22°.

| | | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|---|
| 37° | 4 d.: | *Z.-N.:* 0,6—1,6 $\mu$ onduidelijk gekorrelde, *roode* staafjes.<br>*F.:* Blauwe staafjes met duidelijke (paarse) korrels. *Geen rood.* | *Z.-N.:* Als *a.*<br>*F.:* Als *a.* |
| | 6 d.: | *„Z.-N." 2 uur:* Roode, meest niet-gekorrelde staafjes 0,8—4 $\mu$. Ong. 10 % blauw.<br>*F.:* Gekorrelde staafjes, waarvan omtrek vervaagd is. | „Z.-N." 2 uur: 0,6—2 $\mu$ niet-gekorrelde roode staafjes. 20 % flets rood.<br>*F.:* Als *a.* |
| | 17 d.: | *Z.-N.:* 0,3—0,8 $\mu$ roode, niet-gekorrelde staafjes (huid zakte onderwijl naar beneden, zoodat er geen andere pp. te maken vielen). | *Z.-N.:* 0,5—2 $\mu$ roode, gekorrelde staafjes.<br>*F.:* Vrij onduidelijk rose staafjes. Korreling in Z.-N. is mooier.<br>*G.:* Alles +. Geen korreling. |
| 22° | 4 d.: | *Z.-N.:* Dunne, *roode* staafjes: 0,3—1,2 $\mu$; laatste met 3 korrels. 2 $\mu$ is een zeldzaamheid. | *Z.-N.:* 0,6—1,5 $\mu$ (zeer zelden: 2 $\mu$). Ook zeer dunne, *roode* staafjes. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 22° | 4 d.: | *F.:* Gekorrelde staafjes. Omtrekken hebben nog een iets rose schijn.<br>*G.:* Paarse, niet-gekorrelde staafjes. | *F.:* Sterk gekorreld; omtrek vervaagd: losse korrels.<br>*G.:* Als *a.* |
| | 8 d.: | *Z.-N.:* Als na 4 dagen.<br>*F.:* Het rose is vrij onduidelijk. | *Z.-N.:* Als na 4 dagen.<br>*F.:* Als na 4 dagen. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* 0,3—0,6 $\mu$ roode, vrijwel niet-gekorrelde staafjes. | *Z.-N.:* 0,5—1,2 $\mu$, vrijwel niet-gekorrelde staafjes. |

*2de samenvatting (B. Ninni wit):*

In z waren de vormen iets langer dan in a en beide, vooral bij 37°, korter dan in de vorige reeks. In tegenstelling hiermede bleken nu de staafjes bij 37° ontstaan, in de Fontès-praeparaten niet gekleurd te zijn. Ook hier waren alle elementen Gram-positief.

Deze bacteriën vormden op z een dikkere huid dan op a; bij 22° was deze dikker dan bij 37°. Ook op andere voedingsbodems gaf dit organisme de voorkeur aan een lagere kweektemperatuur dan 37°, bijv. 25°. Daardoor nadert dit (behalve door grootere zuuralcoholvastheid bij 37° dan bij 22°) tot het zgn. koudbloedige type, waarvan ik nu hieronder twee vertegenwoordigers zal beschrijven. Eerst:

---

**B. cheloneï (schildpadbacterie).**

| | | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|---|
| 45° | 19 u.: | *Z.-N.:* Alle *blauwe* 0,4—0,8 $\mu$ staafjes, veel //. Iets gekorreld.<br>*1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Nog alles blauw (vrij wazig). | *Z.-N.:* 0,2—1,2 $\mu$; verder als *a.* |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 19 u.: | *F.:* Blauwpaarse, zeer kleine elementen. Vrij donker, ongeveer als G.<br>*G.:* Een heel enkel rose staafje, verder +. Geen korreling. // liggend.<br>*M.:* Roodpaars gekorreld. | *F.:* Donkerpaars; korreling niet duidelijk.<br>*G.:* Enkele zeer fletse rose. Geen korreling. // liggend.<br>*M.:* Als *a*. |
| | 3 d.: | *Z.-N.:* 0,2—0,8 $\mu$; nu vrij duidelijk blauw en gekorreld. Indruk: verzameling coccen.<br>*1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Alles blauw op een heel enkel rood staafje na.<br>*F.:* Hetzelfde als na 1 dag.<br>*G.:* In keurige rijen geordende coccen. Geen korreling en geen rood.<br>*M.:* Rooder dan G., maar weinig korreling. | *Z.-N.:* 0,4—1,6 $\mu$. Gekorreld en blauw.<br>*1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Vrij duidelijk gekorrelde staafjes; alles blauw.<br>*F.:* Duidelijke korreling.<br>*G.:* Soms als koolspitsen tegen elkaar liggend. Verder als *a*.<br>*M.:* Als *a*. |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* Lengte tot 1 $\mu$. Niet rood, alleen duidelijk blauw. Nu veel 2 tegenover elkaar liggende staafjes.<br>*F.:* Indruk: losse korrels.<br>*G.:* Zoo donker als F. Slechts een paar % rood.<br>*M.:* Ook hier weer rooder dan G., maar geen duidelijke korreling. | *Z.-N.:* Lengte als na 3 d.. Iets gekorreld. Vrij wazig blauw, geen rood.<br>*„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Net een verzameling blauwe coccen als *a* in Z.-N.<br>*F.:* Iets van korreling te zien.<br>*G.:* 5 % rood. Zeer onduidelijke korreling.<br>*M.:* Ook hier onduidelijke korreling. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* 0,4—12 $\mu$. Kleine staafjes (tot 3 $\mu$) dikwijls //. Veel korrels. Geen rood. | *Z.-N.:* 0,3—2 $\mu$. Een heel enkel rood staafje. //. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| 45° 2 w.: | *Z.-N.* (vervolg): *Enkele lange* (deze 12 $\mu$) *als kurketrekkers* gewonden en sommige geleede draden. | |
| | *F.:* Alles donkerblauw, behalve de draden, welke flets gekleurd zijn. Korreling in staafjes onduidelijk. | *F.:* Korrels donker; rest is wazig. |
| | *G.: Draden: rose.* Staafjes soms iets gekorreld. Vele cocachtige, welke aan 1 kant puntig zijn. | *G.:* Iets gekorreld. Langste staafjes onregelmatig gekleurd (geleed). |
| | *M.:* Iets meer korreling in staafjes dan G.. Een enkele slechts weinig gewonden draad, welke overal paars is. Andere draden en dikke staven met onregelmatig gekleurde protoplasten. | *M.:* Weinig gekorreld. Verder als G. |
| 3 w.[1]): | *Z.-N.:* Nog steeds donkere korrels op wazigen ondergrond (staafjes). Draden (tot 30 $\mu$) aan het uiteenvallen: stukken er van zijn flets: tot 5 $\mu$. Geen kurketrekkers. | *Z.-N.:* Als 1 week geleden. |
| | *„Z.-N." 2 min. 1 % $H_2SO_4$:* Nog alles blauw. | *„Z.-N." 2 min. 1 % $H_2SO_4$:* Alles flets blauw. |
| | *M.: Rijtjes korrels;* omtrek verdwenen. Leege draden. Grootste elementen zijn rood. Kleine staafjes duidelijk eindstandig gekorreld. | *M.:* Enkele gekorrelde staafjes. Hierin meer staafjesachtig dan in Z.-N.. |
| 4 w.[1]): | *Z.-N.:* Weer als in het begin kleine, donkere korrels in zeer fletse staafjes. Tot 4 $\mu$, maar meeste 1 $\mu$. Nog een enkele fletse draad van 10 $\mu$. | |

[1]) Na het verdampte water eerst aangevuld te hebben.

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 4 w.: | *F.:* Omtrek der staafjes dikwijls kleurloos. Zeer mooi gekorreld (korrels 0,3 $\mu$).<br>*M.:* Langste vrij duidelijk gekorreld (rose korrels!), kleinste niet. | |
| 37° | 18 u.: | *Z.-N.:* 0,6—1,5 $\mu$. Donkere korrels in *zeer fletsblauwe* staafjes. 5 % gekorrelde, roode staafjes; deze meest iets langer dan de blauwe.<br>*„Z.-N." ½ uur:* Geen rood meer.<br>*F.:* Onduidelijke korreling. Geen rood.<br>*G.:* Alle +. Meeste staafjes, paar coccoïden. Geen korreling.<br>*M.:* Iets gekorreld. | *Z.-N.:* 0,4—2 $\mu$ gekorrelde, blauwe staafjes. 5 à 10 % gekorrelde, roode tot 3 $\mu$.<br>*„Z.-N." ½ uur:* Evenmin rood.<br>*F.:* Iets gekorrelde en toegespitste staafjes. Geen rood.<br>*G.:* Als *a*.<br>*M.:* Ook hier iets gekorreld. |
| | 3 d.: | *Z.-N.:* 0,2—1 $\mu$. Vele kleine vormen. Nog maar een heel enkel rood staafje.<br>*„Z.-N." ½ u.:* Geen enkel rood staafje. Ook hierin duidelijk, dat staafjes kleiner zijn dan na 1 dag.<br>*„Z.-N." 5 sec. 1 % $H_2SO_4$:* Ong. ½ blauw, ½ paarsachtig, maar geen rood.<br>*F.:* Iets gekorreld donkerblauw.<br>*G.:* Geen korreling; alles +. Zonder beitsen met J.: rood en gekorreld.<br>*M.:* Eigenlijk hetzelfde als *g*. | *Z.-N.:* 0,6—1,6 $\mu$. Gekorreld. 20 % rood.<br>*„Z.-N." 1 u.:* Bijna geen rood meer.<br>*F.:* Zeer gekorreld. Slechts een heel enkel rood staafje.<br>*G.:* Bijna alles +. Zonder beitsen: Ook rood.<br>*M.:* Weinig verschil met G.. |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* 0,3—2 $\mu$. Blauw gekorreld, maar geen roode. Langste: flets. Vele coccoïden. | *Z.-N.:* 0,6—3 $\mu$. Duidelijk gekorreld. 10 % rood. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| 37° 1 w.: | *F.:* Korreling zeer matig. Omtrek dikwijls niet te zien.<br>*G.:* Bijna geen korreling. //. Alles paars.<br>*M.:* Slechts iets gekorreld. | *F.:* Geen rood. Soms vrij duidelijk gekorreld. Veel citroenvormigen.<br>*G.:* Iets meer korreling dan in *a*. Vooral duidelijk: 1 eindstand. korrel.<br>*M.:* Als G. |
| 16 d.: | *Z.-N.:* 0,7—2,5 $\mu$. Alle gekorreld, blauw.<br>*F.:* Fijn paars gekorreld. Bijna geen niet-gekorreld.<br>*M.:* Korreling 't duidelijkst bij de allerkleinste (eindstandig). In grootere staven vooral dikke korrels. | *Z.-N.:* 10 % rood, vooral eindstandig gekorreld. 0,3—1,8 $\mu$. Bl.: ong. 1 $\mu$; deze net een verzameling cocjes.<br>*F.:* Lang niet zoo mooi gekorreld als *a*.<br>*M.:* Korreling niet duidelijk. |
| 23 d.[1]: | *Z.-N.:* 0,6—3 $\mu$. *60 % blauw.* Bl. en rood duidelijk gekorreld.<br>*„Z.-N." 1 uur:* Nog 40 % rood.<br>*F.:* Fijne, maar onduidelijke korrels (blauwe staafjes nog het duidelijkst), 40 % rood.<br>*M.:* Vele //, fijn gekorrelde staafjes. Geen niet-gekorreld. | *Z.-N.:* 0,6—3 $\mu$. *20 % rood.* In staafjes zitten platte korrels dicht op elkaar.<br>*„Z.-N." 1 uur:* Als na 10 min..<br>*F.:* Ook hier zijn korrels in de blauwe staafjes het duidelijkst. 20 % rood.<br>*M.:* Korreling meest zeer onduidelijk. Eenige dikke staven als in Z.-N.. |
| 5½ w.[1]: | *Z.-N.:* 80 % rood. 0,3—2,5 $\mu$. Gekorreld, vooral blauw.<br>*„Z.-N." 6 u.:* Evenveel rood als boven, maar ook blauw flets.<br>*F.:* Weinig gekorreld. 70 % rood.<br>*G.:* Iets gekorreld, vooral kleine staafjes met 1 eindstandige korrel. | *Z.-N.:* 0,6—4 $\mu$ (meeste 2 $\mu$). Ook hier roode (30 %) minder duidelijk gekorreld.<br>*„Z.N." 6 u.:* Zelfde geldt ook voor *z*.<br>*F.:* Duidelijke en zeer fijne korreling. 30 % rood.<br>*G.:* Enkele dikke met snoeren korrels. Anders geen korreling. |

[1]) Nadat ik het verdampte water eerst weer heb bijgevuld.

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 22° | 2 d.: | *Z.-N.:* 0,6—1,6 $\mu$. Duidelijk *blauwe* fijne staafjes. | *Z.-N.:* 0,2—2 $\mu$. Zeer gekorrelde (eindst.) blauwe staafjes. Gemiddeld iets grooter dan *a*. Eenige zeer fletse roode. |
| | | *„Z.-N." 2 min. 1 % $H_2SO_4$:* Nog alles blauw. | *„Z.-N." 2 min. 1 % $H_2SO_4$:* ½ flets rood. |
| | | *F.:* Korreling onduidelijk. | *F.:* Vrij goed gekorreld (als Z.-N.). Alles blauw. |
| | | *G.:* Bijna niet gekorreld. //. | *G.:* Enkele dikke gekorrelde. Sporadisch rood. Net of er telkens 2 diplococcen zijn. |
| | | *M.:* Hier evenals in G. vrijwel geen korreling. | *M.:* Slechts enkele duidelijk en fijn gekorreld. |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* 0,4—2 $\mu$. *20 % rood:* meest de langste. Verder blauwe, fletse staafjes met kleine korrels. | *Z.-N.:* 0,4—2 $\mu$. *90 %* duidelijk gekorrelde, *roode staafjes.* Meest 1 eindstandige korrel. |
| | | *„Z.-N." 1 uur:* Als boven, maar blauw en rood zijn fletser geworden. | *„Z.-N." 1 uur:* Als boven. |
| | | | *„Z.-N." 1 min. 1 % $H_2SO_4$:* Bijna alles duidelijk rood. |
| | | *F.:* 10 % rood. Blauw meest korter en evenals rood gekorreld. | *F.:* 50 % rood. Ook hier meest eindstandige korreling. |
| | | *G.:* Bijna geen korreling. //. Zonder beitsen: Hetzelfde. | *G.:* Geen rood en geen korreling. Zonder beitsen: Hetzelfde. |
| | | *M.:* Geen duidelijke korreling. | *M.:* Korreling onduidelijk. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* 0,6—3 $\mu$. *Alle roode,* gekorrelde (vooral eindstandig duidelijk) staafjes. | *Z.-N.:* 0,6—2 $\mu$: bijna alle roode gekorrelde staafjes. |
| | | *„Z.-N.": 2 uur:* Vele flets, maar geen blauw. | *„Z.-N." 2 uur:* ½ is flets. |
| | | *F.:* Duidelijk fijn gekorrelde, roode staafjes. Een enkele blauwe lange draad (als in 2 w. 45°). | *F.:* Over het algemeen geen mooie korreling. Bijna alles rood. Donkerpaarse met aan 1 eind toegespitste staven. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| | *G.:* Vrijwel geen korreling en geen rood.<br>*M.:* Korreling onduidelijk, behalve enkele eindstandige. | *G.:* Als *a.* Enkele dikke staven.<br>*M.:* Duidelijker gekorreld dan F. Vele dunne staafjes. |
| 23 d.: | Als 1 week geleden; hierna tot het oorspronkelijke vol bijgevuld: | |
| 30 d.: | *Z.-N.:* Goed gekorrelde, *roode* staafjes tot 3 $\mu$.<br>*„Z.-N." 6 uur:* Veel flets, maar toch rood.<br>*F.:* Alle rood, fijn gekorreld. 10 % blauw: myceliumachtig, draden met enkele vertakkingen tot 8 $\mu$. | *Z.-N.:* Vele staafjes met 1 eindstandige korrel. Tot 3 $\mu$. *Rood.*<br>*„Z.-N." 6 uur:* Als *a.*<br>*F.:* Alles rood. Ook hier mycelia. |
| 7½ w.: | Behalve vertakkingen zijn staafjes niet meer dan hoogstens 5 $\mu$. Ook losse korrels komen voor. | |

*Samenvatting (B. cheloneï):*

De aanduiding *„Mycobacterie der koudbloedige dieren"* is op deze microbe, ook wat groei betreft, toepasselijk. Nml. bij *22°* wordt de dikste huid gevormd en de *zuuralcoholvastheid* is daar *het grootst:* zoowel in den alkalischen van de 2de week af, als in den zuren glycerol-bouillon van de 1ste week af, zijn bijna 100 % der vormen zuuralcoholvast, terwijl vóór dien tijd zelfs geen zuurvastheid bestond. Ik kan hierdoor het door Saenz gevonden feit bevestigen, dat de niet-zuurvaste vormen des te talrijker zijn, naarmate de cultuur jonger is. Dit geldt ook voor alkalischen bouillon bij 37° na bijvullen van het verdampte water tot het oorspronkelijke volumen (vloeistof was ingedroogd door het lange staan); eerst is hier geen sprake van zuuralcoholvastheid. Echter bij 45° komt deze eigenschap, ook na het bijvullen, niet tevoorschijn, noch bij z noch bij a.

De lengte neemt geen groote afmetingen aan: 3 $\mu$ is al lang. Een uitzondering hierop, behalve de culturen van a en z bij 22° aan het eind van de reeks, vormt de alkalische glyc. bouillon bij 45°.

Na 2 weken ontstaan hierin ineens zoowel *Z.-N.*- als *Gram-negatieve draden,* die als kurketrekkers gewonden zijn: deze hebben een lengte van minstens 12 $\mu$; 1 week later zijn deze grootendeels uiteengevallen tot Gram-positieve staafjes. In hetzelfde praeparaat kan men ook staven met onregelmatig gekleurden inhoud aantreffen. Wat korreling betreft, is deze in de Z.-N.-praeparaten dikwijls nog het beste; op eenige uitzonderingen na valt vooral bij 45° en 37° over die in F o n t è s- en M u c h-pp. niet te roemen.

G r a m-kleuring geeft geen of een zeer onduidelijke korreling, evenals bij de reeds beschreven organismen.

---

**Slangbacterie.**

| | | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|---|
| 37° | 18 u.: | *Z.-N.:* 0,5—4 $\mu$. *20 % rood* en fijn gekorreld: de langste. Blauw dikwijls //.<br>*F.:* 20 % vrij flets rood en gekorreld, blauw niet. | *Z.-N.:* 0,6—4 $\mu$ *roode,* meestal duidelijk gekorrelde staafjes.<br>*F.:* Alles rood. Vrij goede korreling, maar Z.-N. is mooier. |
| | 3 d.: | *Z.-N.:* Meeste 0,8—2 $\mu$, een enkele 5 $\mu$. Rood: mooi gekorreld; dikwijls uitpuilende korrels. 20 % rood. Blauw nu iets gekorreld.<br>*F.:* Als na 1 dag.<br>*G.:* Donker, geen korreling.<br>5 min. in alc. zonder beitsen: Zeer korrelige, maar roode massa. | *Z.-N.:* 0,6—5 $\mu$. Weinig en vrij onduidelijk gekorreld. 70% rood. |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* 0,6—4 $\mu$. 30—40 % gekorreld rood (korrels soms uitpuilend). | *Z.-N.:* 0,8—4,5 $\mu$ mooi duidelijk gekorreld. Alles rood. Vertakkingen. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 37° | 1 w.: | *F.:* Het rose is zeer flets. Mooi donker gekorreld. | *F.:* Duidelijk rood en gekorreld. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* Nu slechts *5 % rood.* 0,7—2 $\mu$ (meeste ong. 1 $\mu$). Rood en blauw zeer korrelig. | *Z.-N.:* 0,6—2,6 $\mu$. *70—80 % rood.* Rood en blauw duidelijk gekorreld.<br>*F.:* Het rood is zeer onduidelijk. Zeer gekorreld pp. |
| | 4 w.: | | *Z.-N.:* 80 % gekorreld rood: 1—3 $\mu$. Gekorreld blauw: 0,7 $\mu$. |
| 22° | 3 d.: | *Z.-N.:* *60 % blauw,* gekorreld: ong. 1 $\mu$. Rood gekorreld tot 4 $\mu$.<br>*F.:* % rood hetzelfde, maar zoowel dit als blauw flets. | *Z.-N.:* 0,4—1,6 $\mu$: *alleen* gekorreld *rood.* |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* 0,3—4 $\mu$ duidelijk gekorreld rood. Vele coccoïden. Alles rood.<br>*F.:* Fijne korreling. Het rose is een beetje flets.<br>*G.:* Alles +. | *Z.-N.:* 0,3 — bijna 4 $\mu$. Alles rood, vooral eindstandig duidelijk gekorreld.<br>*F.:* Ook hier zijn vooral de lange wat flets. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* Tot 5 $\mu$; gemiddeld 2 $\mu$. Zeer onduidelijke korreling. *Alleen rood.* | *Z.-N.:* Tot 5 $\mu$. Minder gekorreld dan 1 week geleden. Dikwijls 1 uitpuilende korrel in 't midden en 2 kleintjes aan uiteinden. |
| | | *F.:* Duidelijke korreling, maar 't rose is onduidelijk. | *F.:* Ook vrij flets rose. |
| | | *G.:* Zoo goed als geen korreling. | *G.:* Als *a.* |

Zelfs na 2 min. in alc. zonder beitsen beide nog duidelijk paars.

*Samenvatting (S l a n g b a c t e r i e):*

Lengten bij kweektemp. van 22° en 37° schelen weinig en komen overeen met die van *B. cheloneï.* Echter is de *zuuralcoholvastheid*

van de slangbacterie bij 37° gekweekt *grooter* dan die van de schildpadbacterie.

Bij 37° en 22° zijn de huiden van eerstgenoemde dikker en gaan minder gemakkelijk stuk. Ook hier, evenals bij *B. cheloneï*, levert de zure bouillon meer zuuralcoholvaste elementen dan de alkalische en is 22° beter geschikt om de bacteriën zuuralcoholvast te doen worden dan 37°; dit geldt vooral voor alkalischen bouillon. Dus ook deze stam verdient daarom toch nog den naam van *koudbloedig type der tuberkelbacteriën.*

Aronson verkreeg echter geen groei bij 37°, op welken voedingsbodem ook, wel bij 25°.

De polymorphie beperkt zich ook hier tot losse korrels, coccoïden, korte en iets langere staafjes. De korreling is in de Z.-N.-praeparaten dikwijls nog de beste.

De praeparaten uit zuren bouillon, zonder glycerol, (37°) heb ik niet beschreven: de lengte is wat kleiner en de vormen zijn minder gekorreld. Er bestaat dezelfde zuuralcoholvastheid als in den bouillon met glycerol; er wordt op den laatsten een veel dikkere huid gevormd.

---

Van de twee volgende organismen maakte ik bij 37°, behalve van de huid, praeparaten van het sediment en wel van de eerst door filtreerpapier afgefiltreerde en daarna gecentrifugeerde cultuur. Het sediment suspendeerde ik in water en centrifugeerde nogmaals.

### B. Pellegrini.

Bij 45° groeit deze bacterie de eerste 2—3 dagen troebel, waarna de vloeistof helder wordt; een week hierna geënt in nieuwen bouillon en gekweekt bij 37° levert geen cultuur meer op.

*Huidje.*

| | | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|---|
| 37° | 1 d.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Gekorrelde, dikke roode en blauwe (50 %) staven (lengte: 1,5—8 $\mu$; dikte 0,5 $\mu$); het protoplasma is onregelmatig gekleurd (gestippeld) evenals van de *paarsachtige, groote granula* (*bollen;* middellijn: 0,8—1,7 $\mu$). Behalve los ook bollen aan het eind of in het midden van een staaf; Enkele staven vertakt. Pp. maakt myceliumachtigen indruk. | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Als *a*, maar staven (waarvan 40 % blauw) slechts 1,5—4 $\mu$ lang en dunner. Bollen hebben slechts middellijn van 0,7 $\mu$. Pp. maakt een halssnoerachtigen indruk. Ook hier echte vertakkingen: bij bol ontspringend. Staven aan het eind verdikt. |
| | | *F.:* Alles blauw en blauwpaars. Bollen zijn hier egaal, maar staven onregelmatig gekleurd. Korreling vrij onduidelijk. | *F.:* Ook hier alles blauw en blauwpaars. |
| | | *G.:* Heel enkele staven zijn dun en rood, hebben allerlei verdikkingen, maar zijn overigens weinig gedifferentieerd. | *G.:* Als *a*. |
| | | *M.:* Vrij duidelijk gekorrelde staven. Dikke bollen zijn egaal. | *M.:* Meer roodachtig en minder gekorreld dan *a*. |
| | 2 d.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Aantal bollen sterk verminderd; middellijn nu meest 0,5 $\mu$: daardoor *net een verzameling blauwe coccen.* 40 % roode staven: deze tot 4 $\mu$ lang; vertakte blauwe tot 7 $\mu$. Middellijn der korrels 0,3 $\mu$. | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* 6 $\mu$ lang komt veel voor; zelfs draden tot 12 $\mu$. Ook hier bollen bijna verdwenen en 3 of 4 coccoïden bij elkaar. |
| | | *„Z.-N." 2 min. 1 % $H_2SO_4$:* Weinig verschil met vorig pp.. Korte staven zonder korrels zijn rood. | *„Z.-N." 5 min. 1 % $H_2SO_4$:* Vrijwel alles blauw. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| | *„Z.-N." ½ min. 3 % HCl:* Alles blauw.<br>*M.:* Staven zijn donker gekorreld, bollen egaal gekleurd. Verder reeksen „kraaltjes": korrels in staven, waarin de omtrek vervaagd is. | |
| 3 d.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Blauwe kralensnoeren. Forsche staven: 0,5 $\mu$ breed en 6 $\mu$ lang; staafjes 0,1—0,2 $\mu$ breed en tot 2 $\mu$ lang. Percentage rood als na 1 en 2 dagen.<br>*F.:* Alles blauw: blauwe staven met blauwe korrels. Enkele dikke, onregelmatig gekleurde staven. Voor 90 % kralensnoeren.<br>*M.:* Korrels zijn blauw, ½ der staven roodachtig (korreling er in onduidelijk). | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* 10—20 % roode staven van 10 $\mu$. Rest van 1—7 $\mu$ is vrij flets.<br>*F.:* Alles donkerblauw. Kleine losse korrels. Vele eindstandig gekorrelde korte staafjes: 0,8—2 $\mu$.<br>*M.:* Meest heel kleine roode staafjes; slechts enkele tot 5 $\mu$. Korreling onduidelijk. |
| 5 d.: | Als boven. | Als *a*. |
| 9 d.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Tot staafjes uitgroeiende korrels te zien. Gekorrelde blauwe staafjes van 1 $\mu$, niet-gekorrelde van 3 $\mu$. 10—20 % roode staven van 3—4 $\mu$; enkele lange draden van 10 $\mu$. | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Over het algemeen duidelijker gekleurd dan a. 20 % flets blauw, 10 % rood. Meeste tot 3 $\mu$; een enkele tot 10 $\mu$.<br>*M.:* Mooier gekorreld dan 4 dagen geleden. |
| 12 d.: | Lange draden gesegmenteerd of uiteengevallen: nu talrijke kleine staafjes. Verder als na 9 dagen. | Enkele vertakkingen, verder als boven. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 37° | 26 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Weer vrij lange draden (tot 8 $\mu$) met donkere korrels. Staafjes ook duidelijk en donker gekorreld; vooral vele kleine met 1 dikke, eindstandige korrel. ½ rood.<br>*M.:* Behalve de coccoïde vormen, duidelijke korreling der elementen (na 2 kleine 1 groote korrel; als in lange draden van *B. Boquet* en *B. Milch Moeller*). | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Ook als in *a* uitloopende korrels en vrij lange draden. Duidelijke korreling. Geen vertakkingen meer. Alles blauw.<br>*M.:* 20 % rose gekorreld. Vele dikke donkere in puntvorm eindigende staven. |
| | | *Sediment na filtreeren en centrifugeeren.* | |
| | 1 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Er zijn slechts *10% roode* staafjes; deze zijn fijn gekorreld en 2—3 $\mu$. Kleinere met 1 eindstandige korrel: paarsachtig. Donkerblauwe, losse korrels van 0,3 $\mu$.<br>*3 min. 1 % $H_2SO_4$:* Alles blauw.<br>*M.:* Hierin zijn korrels duidelijker te zien dan in „Z.-N."; ze zijn soms langwerpig. | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Beeld veel overeenkomend met dat van *a*, maar duidelijker gekleurd. Citroenvormen en geknikte staven met een vrij groote korrel in het midden.<br>*3 min. 1 % $H_2SO_4$:* Ook alles blauw. Van de korrels is alleen de omtrek gekleurd.<br>*M.:* Als *a*. Enkele vrij groote staven hebben dikke korrels. |
| | 3 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 % $H_2SO_4$:* Ook hierin 10 % rood (staven van 3—5 $\mu$). Blauw zijn meest de kleine elementen: coccoïden (0,6—1 $\mu$), citroenvormen en kleine, gekorrelde staafjes. 5 % kleurlooze staafjes met donkere korrels. | |

| | | a | z |
|---|---|---|---|
| | | *M.:* Roodachtige, maar ook dikwijls kleurlooze staafjes. Vele uitgroeiende korrels. Korreling onduidelijk. | |
| | 9 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 %* $H_2SO_4$*:* Alle vormen blauw tot paars; de meeste 0,6—2 $\mu$; enkele tot 4 $\mu$. De langste en dikste van 1 week geleden zijn verdwenen. Staafjes van 1 $\mu$ of zijn zeer fijn gekorreld. | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 %* $H_2SO_4$*:* Paar % zeer flets rose. Meeste vormen tot 3 $\mu$. Langste soms duidelijk gekorreld. |
| | | *M.:* Vele diplococvormen. Slechts de grootste staafjes zijn mooi gekorreld. | *M.:* Meeste staafjes met 2 onduidelijke korrels. |
| | | *Oppervlaktehuidje.* | |
| 22° | 3 d.: | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 %* $H_2SO_4$*:* ½ *roodpaars,* ½ blauw; duidelijk gekorreld. 0,8—13 $\mu$, meeste elementen slechts tot 3 $\mu$. Vooral de blauwe vormen hebben vertakkingen; de roodpaarse zijn forsch. | „*Z.-N.*" ½ *min. 1 %* $H_2SO_4$*:* *Vrijwel alles rood.* Sterk vertakte draden tot 20 $\mu$; een tak van 2 $\mu$ vertoont soms een vertakking. Veel meer en veel sterker vertakt dan *a.* Ook streptobacteriën komen voor. „*Z.-N.*" ½ *min. 3 % HCl:* Veel flauwer, maar toch nog rood. *2 min. 1 %* $H_2SO_4$*:* Het rose is duidelijker dan boven. |
| | | *F.:* Alles paars; eenige, onregelmatige kleuring te onderkennen. Enkele, kleine staafjes met 1 eindstandige korrel is het eenige, wat men van de korreling ziet. | *F.:* Alles paars, op een enkele, dunne, flets blauwe gekorrelde staaf na. Anders, evenals in *a,* zoo goed als geen korreling. |
| | | *M.:* Behalve de allerkleinste en een enkele zeer lange draad is alles fijn gekorreld. | *M.:* Mooi gekorreld: zeer fijne en enkele, grootere korrels in 1 staaf (om de 3 kleine 1 groote; zie huid van 26 d. 37° *a*). Ook eenige staafjes, waarvan omtrek niet te zien is. Maar zelfs de kleinste vormen zijn duidelijk gekorreld: eindstandig. |

| | *a* | *z* |
|---|---|---|
| 22° 1 w.: | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Over het algemeen nu klein en weinig gekorreld: 0,4—3 $\mu$. Duidelijk tot korrels uiteengevallen draden: als reeksen coccen. 10—20 % rood. Nog enkele vertakkingen. *„Z.-N." 3 min. 1 % $H_2SO_4$:* Nog slechts zeer enkele rood. *M.:* Zeer fijn gekorreld. | *„Z.-N." ½ min. 1 % $H_2SO_4$:* Ook hier uiteenvalling. Blauwe staven met *rood* uiteinde (een korrel?). 60 % rood, meest korter dan blauw. Vrij duidelijke korreling. Nog enkele vertakkingen; deze tot 6 $\mu$. *„Z.-N." 3 min. 1 % $H_2SO_4$:* 40 % rood. Het duidelijkst rood zijn de staven met duidelijk eindstandige korrels. *M.:* Goed gekorreld, maar iets grover dan in *a;* het meest 1 eindstandige korrel. |
| 3½ w.: | Als boven. | |

*Samenvatting (B. Pellegrini):*

De beelden, welke de praeparaten van deze bacterie geven, zijn geheel verschillend van die der vorige bacteriën. De staven e.d. zijn bij *B. Pellegrini* meestal veel forscher, de inhoud is eigenaardig gekorreld, waardoor de onregelmatige kleuring tot stand komt en de korrels hebben na 1 dag bij 37° in den alkalischen bouillon wel een buitensporige afmeting aangenomen: middellijn tot 1,7 $\mu$ (meestal bedraagt deze voor „gewone" korrels hoogstens 0,4 $\mu$). Deze korrels liggen in de cultuurvloeistof duidelijk los en vertoonen beter dan elders het overgaan tot het coccoïde stadium. Overigens heb ik alle vormen tot lange vertakte draden toe gezien, zoowel bij 37° als bij 22°. Bij 45° gaat dit organisme dood.

Vertakking gaat ook hier van de korrel uit.

De huid is bij 37° dikker en steviger dan bij 22°.

Het algemeene beeld in a en z verschilt weinig van elkaar: bij 37° is alles echter in a forscher en meer uitgesproken dan in z.

De *geringe zuurvastheid* komt bij beide overeen uit: ongeveer 50 % is na 2 minuten met 1 % $H_2SO_4$ ontkleurd.

Bij 22° komen in den zuren bouillon veel meer zuurvaste elementen voor dan in alkalischen: na 1 dag in z 100 % rood, in a 50 % roodpaars; na 1 week 60 % rood, tegen 10 à 20 % roodpaars.

Vooral in z hebben de vormen een grootere lengte bij 22° dan 37° (20 tegen 12 $\mu$) en bezitten meer vertakkingen.

Bij 22° is alles in z veel forscher dan in a: juist het omgekeerde van hetgeen bij 37° valt waar te nemen.

De M u c h-praeparaten leveren over het algemeen goede korreling op, in tegenstelling tot die van F o n t è s; minder, maar toch nog vrij duidelijk, zijn die volgens de gewijzigde Z.-N.-kleuring.

In de praeparaten der **sedimenten** (na affiltreeren en centrifugeeren) komen vooral de eerste dagen kleinere vormen voor, hetgeen een veel *minder polymorph* beeld geeft dan de praeparaten van de huid: i.p.v. 8 $\mu$ is de grootste slechts 3 $\mu$. Later verminderen de verschillen, maar lange draden en vertakkingen vindt men niet. Een verder in het oog loopend verschil is het *minder zuurvast zijn;* na 1 dag: 50 % der microben van de huid, tegen 10 % van het sediment; na 9 dagen: 10 à 20 % tegen 0 % (a) resp. 2 % (z).

---

### B. Milch Moeller.

Ook hiervan maakte ik slechts praeparaten na filtratie en centrifugeeren van de bij 37° gegroeide culturen.

*Huidje.*

| | *a = alk. glyc. bouillon* | *z = zure glyc. bouillon* |
|---|---|---|
| 45° 1 d.: | *Z.-N.:* 0,7—4 $\mu$ (gemiddeld 1 à 2 $\mu$) *rood* en gekorreld.<br>*F.:* Weinig gekorrelde staafjes. Alles rood.<br>*G.:* Zoo goed als geheel +; geen korreling. | *Z.-N.:* Als *a.*<br>*F.:* Duidelijker korreling dan in *a.*<br>*G.:* Als *a.* |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 45° | 1 d.: | *M.:* Weinig gekorreld. | *M.:* Als *a.* |
| | 4 d.: | *Z.-N.:* Na het eerst overwegende coccoïde nu het *myceliumachtige* stadium; geleede draden tot 17 $\mu$; nog enkele coccoïden, als diplococvormen. Vertakkingen. Vrij goede korreling. Ook nu alles rood. | *Z.-N.:* Als *a.* Bij kleine staafjes veel uitpuilende korrels. |
| | | *F.:* Zeer mooi gekorreld. Korrels nogal ongelijk van grootte, ook langwerpig. | *F.:* Als *a.* |
| | | *G.:* 5 % rose: eenige lange vormen. Van de draden is hier en daar de omtrek vervaagd. Fijne korreling af en toe. Ook verdikkingen in de draden, door de granula, te zien. | *G.:* Als *a.* Korrels zitten dikwijls tegen de draden aan, waarvan de omtrek geheel of gedeeltelijk verdwenen is. |
| | | *M.:* Vrijwel alle gekorreld; ook hier is van vele lange staven en draden de omtrek verdwenen. | *M.:* Als *a.* |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* Draden zijn bezig uiteen te vallen. Gemiddelde lengte nu 5 $\mu$; er is echter zelfs nog een draad van 25 $\mu$. Onder deze lange is een enkele blauw. Duidelijke korreling. Nog spaarzame vertakkingen. | *Z.-N.:* Ook hier draden uiteengevallen; meeste nu 0,6—3 $\mu$ (de kleinste overwegen); nog 1 oude draad van 35 $\mu$. Alles rood en bijna niet gekorreld. |
| | | *F.:* Van de helft der lange staven is de omtrek onzichtbaar. Zeer mooi gekorreld. | *F.:* Meest eindstandige korrels. Ligging in handvorm als bij diphtherie veel voorkomend. |
| | | *G.:* Bacteriën hebben rafelig uiterlijk. Vele langwerpige korrels in draadvormige bacteriën, waarvan omtrek vrijwel vervaagd is. Vrij onduidelijk gekorreld. | *G.:* Geen korreling. |
| | | *M.:* Bij de meeste vormen onduidelijk gekorreld. | *M.:* Indien gekorreld: zeer fijn en onduidelijk. |

| | | a | z |
|---|---|---|---|
| | 2 w.: | *Z.-N.:* 0,5—3 $\mu$ roode, onduidelijk gekorrelde staafjes. Er zijn er zelfs tot 8 $\mu$, maar 5 $\mu$ is al heel lang. Nog steeds enkele vertakkingen. Verschillende diplococvormen.<br>Voor andere kleurmethoden: zie 1 week. | *Z.-N.:* Als 1 week geleden. |
| 37° | 17 u.: | *Z.-N.:* 0,7—4 $\mu$ *rood* en vrij duidelijk gekorreld, vooral 1 eindstandige korrel. Zeer vele korrels | *Z.-N.:* Minder gekorreld, maar verder als *a.* |
| | | *„Z.-N." 24 uur:* Nog flets rood. | *„Z.-N." 24 uur:* Als *a.* |
| | | *F.:* Helft is zeer mooi gekorreld (korrels zijn vrij dik: 0,3 $\mu$; de fijne zijn slechts 0,1 $\mu$). Staafjes duidelijk rood. | *F.:* Meeste staafjes duidelijk gekorreld; soms donkerpaars van de korrels; staafjes zelf rood. |
| | | *G.:* Donkerpaars; absoluut geen granulatie. | *G.:* Behalve enkele rose staafjes als *a.* |
| | | *M.:* Bijna alle staafjes fijn gekorreld. Beeld als F., maar iets onduidelijker. | *M.:* Als *a.* |
| | 4 d.: | *Z.-N.:* Gemiddeld 3 $\mu$, maar nu eenige draden tot 10 $\mu$. Alles rood. Slechts eindstandig vrij duidelijke korreling. Vertakkingen. Losse korrels verdwenen. | *Z.-N.:* Weinig verschil met *a*, alleen iets korter. |
| | | *„Z.-N." 7 uur:* Nog vrij duidelijk rood. | *„Z.-N." 7 uur:* Als *a.* |
| | | *F.:* Goed gekorrelde, roode staven. Dikwijls kleurlooze draden met groote aanhangende of met zeer kleine korrels er in. | *F.:* Mooi gekorrelde, duidelijk roode vormen (om de 3 kleine 1 groote korrel; ook bij *B. Boquet* en *B. Pellegrini* voorkomend). Ook hier schijnbaar of werkelijk aanhangende korrels. |
| | | *G.:* Draden soms fijn gekorreld. | *G.:* Slechts iets gekorreld. |

| | | *a* | *z* |
|---|---|---|---|
| 37° | 4 d.: | *M.:* Vooral eindstandig duidelijk gekorreld. Soms uitpuilende korrels. | *M.:* Meest zeer fijne granulatie; mooier gekorreld dan F.. |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* Onregelmatig gekleurde draden tot 15 $\mu$ (kleurlooze stukken er tusschen), welke fijn en grof gekorreld zijn. Zeer weinig beneden 3 $\mu$. Gemiddeld 8 $\mu$. Aan het eind dikwijls verdikt. Draden veelal vertakt. Alles rood. | *Z.-N.:* Meest staafjes van 0,6 tot 3 $\mu$, maar enkele tot 6 $\mu$, dus ongeveer net zoo als na 4 dagen. Weinig gekorreld. |
| | | *F.:* Zeer mooi en veelvuldig gekorreld: sommige staven en draden donkerpaars van de uitpuilende korrels (zie ook *z* 17 u.). Doorsnede korrels tot 0,6 $\mu$. Omtrek der draden soms kleurloos. | *F.:* Langste staven vrij duidelijk gegranuleerd, de andere zoo goed als niet. |
| | | *G.:* Zeer onduidelijke korreling: meest egaal donkerblauw. Enkele dunne, vrij lange, rose vormen. | *G.:* Als *a*. |
| | | *M.:* Fijner gekorreld dan F. Hierin dikwijls bijna leege draden met slechts enkele, kleine korrels. | *M.:* Weinig gekorreld en meestal slechts eindstandig. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* Draden nu tot 20 $\mu$; de kortste staven zijn 5 $\mu$. Helft is mooi gekorreld, ook van de kleinste. Korrels schijnbaar of inderdaad tegen staven en draden aan. | *Z.-N.:* Ook hier draden tot 20 $\mu$ (deze vrij zeldzaam), maar gemiddelde lengte is minder dan bij *a*, omdat er nog vrij veel coccoïde vormen voorkomen. |
| | | *„Z.-N." 24 uur:* Nog steeds als na 17 uur bij 37° flets rose. | *„Z.-N." 24 uur:* Als *a*. |
| | | *F.:* Meeste staven fijn gekorreld. Losse korrels van 0,3 $\mu$. | *F.:* Ook zeer fijn gekorreld. |

| | a | z |
|---|---|---|
| | *G.:* Iets gekorreld. Spaarzaam rose vormen. Draden en lange staven onregelmatig gekleurd: net of de inhoud zich op bepaalde plaatsen teruggetrokken heeft. | *G.:* Als *a.* |
| | *M.:* Fijn gekorreld. Vrij veel lange, oogenschijnlijk leege draden. De lange, gekorrelde zijn vertakt. | *M.:* Geen duidelijke korreling. |
| | *Sedimenten van het filtraat.* | |
| 37° 17 u.: | *Z.-N.:* 0,4—1,5 $\mu$; een heel enkele staaf 4 $\mu$. *Alles rood.* Vele korrels. Staafjes duidelijker gekorreld dan die in de huid, ook middenstandig. | *Z.-N.:* Als *a.* Hier slechts duidelijk eindstandige korrels, waarvan 1 veel dikker dan de andere is. |
| | *„Z.-N." 7 uur:* Slechts 20—30% rood; deze zijn grooter dan de blauwe staafjes. | *„Z.-N." 7 uur:* 80 % rood. |
| | *F.: Nu slechts 40 % roode staafjes;* heel fijn gekorreld. Vooral bij de blauwe valt de evenwijdige ligging in het oog. | *F.:* Als *a.* Over het algemeen iets kleiner dan *a.* |
| | *G.:* Helft is negatief. Bijna geen korreling. | *G.:* Alles donkerpaars, dus positief. |
| | *M.:* Vooral kleine staafjes mooi gekorreld: korrels dikwijls uitpuilend. Grootste meest niet gekorreld. | *M.:* Slechts 10 % zonder korrels; rest is mooi fijn gekorreld. |
| 5 d.: | *Z.-N.:* Meeste ongeveer 1 $\mu$, maar enkele nog iets grooter dan 4 $\mu$. Fijner en duidelijker gekorreld dan *z.* Alles rood. | *Z.-N.:* Meeste 1—3 $\mu$; nog steeds zijn coccoïden in de meerderheid. // en $\vee$ vorm. Korrels: vrij groot. |
| | *„Z.-N." 7 uur:* Alle zeer flets rose. | *„Z.-N." 7 uur:* Als *a.* |
| | *F.:* Betrekkelijk weinig gekorreld. 20 % blauw: de kleinste. | *F.:* Weinig gekorreld; ook verder als *a.* Het rose bij beide is vrij flets. |

| | | a | z |
|---|---|---|---|
| 37° | 5 d.: | *G.:* Op een paar staafjes na alles +. Zoo goed als geen korreling.<br>*M.:* 60 % zeer fijn gekorreld. | *G.:* Geen korreling. 20 % rose.<br>*M.:* Vooral de lange staafjes duidelijk gekorreld, maar het rose is dikwijls wazig. |
| | 2 w.: | *Z.-N.:* Nu enkele korte vertakkingen van 5 $\mu$. Vrij dunne evenwijdige rose staafjes.<br>*„Z.-N." 7 uur:* Alles flets rose.<br>*F.:* Mooi gekorreld. Van 10 % geen omtrek. Geen blauw, maar het rose is onduidelijk.<br>*G.:* Behalve enkele lange rose draden alles +. Geen korreling.<br>*M.:* Mooi fijn gekorreld. | *Z.-N.:* 1—5 $\mu$; langste met langwerpige korrels. Enkele zelfs tot 8 $\mu$.<br>*„Z.-N." 7 uur:* Als *a.*<br>*F.:* Rose nog flets. Niet zoo mooi gekorreld als de huid. Van ½ geen omtrek. Rose onduid..<br>*G.:* 20 % rood. Bijna geen korreling. Losse korrels?<br>*M.:* Slechts iets duidelijker korreling dan in G. |
| | | *Huidje.* | |
| 22° | 3 d.: | *Z.-N.:* 0,6—3 $\mu$ vrij duidelijk gekorrelde staafjes. 30 % flets, maar alles *rood.*<br>*F.:* Fijner gekorreld dan Z.-N., *30—40 % blauw.*<br>*G.:* ¼ is roodachtig: deze iets rood gekorreld.<br>*M.:* Zeer fijn gekorreld: kleinste het duidelijkst. | *Z.-N.:* Als *a.* Gemiddeld 2 $\mu$.<br>*F.:* Als *a.*<br>*G.:* Geen korreling. Verder als *a.*<br>*M.:* Als *a.* |
| | 1 w.: | *Z.-N.:* Tot 6 $\mu$. Bijna de helft is flets rose: vooral de kleinste. Iets gekorreld, vooral de rose. Vele staven aan het deelen.<br>*F.:* Zeer gekorreld. *Zeer fletse, roodpaarse staafjes.* Onregelmatig gekleurd soms.<br>*G.:* Bijna alles paars.<br>*M.:* Niet veel duidelijker gekorreld dan in G. Vele vormen onregelmatig gekleurd. | *Z.-N.:* Tot 3 $\mu$. 20 % flets: deze evenwijdig of achter elkaar. Vooral eindstandig duidelijk gekorreld.<br>*F.:* Als *a*, maar lang niet zoo gekorreld.<br>*G.:* Als *a.*<br>*M.:* Vrijwel alle staafjes fijn gekorreld; weinig uitpuilende korrels. |

| | | a | z |
|---|---|---|---|
| 22° | 2 w.: | *Z.-N.:* Zuuralcoholvastheid en lengte (enkele lange draden tot 10 $\mu$) als na 5 dagen. Slechts 10 à 20 % gekorreld. Sporadisch eenige vertakkingen.<br>*F.:* Mooi gekorreld. Ook hier als na 1 week bijna geen rood te zien.<br>*G.:* Als *z*.<br>*M.:* Als *z;* 40 % niet gekorreld. | *Z.-N.:* Eigenlijk geen korreling. 90 % duidelijk rood. Ook vertakkingen. 1 draad van 12 $\mu$; deze en kleinere onregelmatig gekleurd.<br>*F.:* Fijne duidelijke korreling. Vrijwel geen roode omtrek meer.<br>*G.:* Bijna alle positief.<br>*M.:* Fijn duidelijk gekorreld. |

*Samenvatting (B. Milch Moeller):*

Met *B. Boquet* vertoont dit organisme, zoowel in alkalischen, als in zuren glycerol-bouillon vele overeenkomsten, niet slechts in *rijkdom aan vormen,* maar ook wat zuuralcoholvastheid en onderling gedrag bij de verschillende temperaturen betreft. Ook hier bestaat slechts een quantitatief verschil bij 45° en 37° (bij eerstgenoemde treft men spoediger langere vormen aan). Bij kweeken op *22°* is, evenals bij *B. Boquet,* de *zuuralcoholvastheid* belangrijk *verminderd,* hetgeen vooral in de Fontès-praeparaten te merken is: de omtrekken zijn hierin zoo zwak gekleurd, dat ik ze nauwelijks meer rose kan noemen. De polymorphie treedt bij 22° wat minder op den voorgrond dan bij 37° en 45°.

Bij 22° gaat het huidje gemakkelijk stuk (van z is het steviger dan van a).

Ook hier kan ik, op eenige uitzonderingen na, van een goede kleurbaarheid volgens Gram spreken. Hoewel, vooral in lange draden, eenige korreling kan voorkomen, wordt deze na de extra ontkleuring met aceton (dus in Much-praeparaten) pas goed zichtbaar. Overigens geven Z.-N.-, F.- en M.-praeparaten elkaar in korreling weinig toe. Uitpuilende of schijnbaar er aan hangende korrels treft men vooral in het huidje aan.

Tenslotte valt van het huidje nog te vermelden, dat in z kleinere

vormen voorkomen en, voor zoover er lange aanwezig zijn, deze eerder uiteenvallen.

Evenals in de sedimenten van het filtraat van *B. Pellegrini* overwegen ook in die van *B. Milch Moeller* de korte vormen (grootste lengte 5 $\mu$), welke vooral in het begin minder zuuralcoholvast zijn. Vertakkingen (op plaatsen der korrels) en draden zijn hier zeer zelden te vinden.

*B. Milch Moeller* is zuuralcoholvast over het algemeen.

---

## SLOTBESCHOUWINGEN.

Er zijn twee algemeene kenmerken: de *kleurbaarheid* volgens Gram en verder de nagenoeg nimmer ontbrekende *korrels*.

Bij *B. Boquet, B. Milch Moeller* en *B. Pellegrini* heb ik een ontwikkeling kunnen vaststellen, waaraan de korrels deelnemen, nml. korrel-ovoïde-staafje-staaf-draad.

In de als kurketrekkers gewonden draden (deze zijn Gram-negatief) van *B. cheloneï* kon ik geen korrels vaststellen.

Het is bij *B. Boquet* en *B. Milch Moeller*, alsof in oude staven en draden de inhoud zich op bepaalde plaatsen terugtrekt tot korrels en deze reeds uit het inmiddels verdwijnend omhulsel uitgroeien, zoodat — als ze vrijkomen — ze reeds den coccoïden vorm aangenomen hebben.

Dikwijls is te zien, dat er één groote korrel op eenige, meestal 3, kleine korrels voorkomt. Volgens Gróh [1]) zou zoo'n groote korrel aanleiding geven tot verlenging van de staaf, aan wier uiteinden dan weder korrels ontstaan.

Bij *B. Pellegrini* waren de korrels geheel los en zuiver rond; bij de andere twee genoemde bacteriën zou, daar ik slechts coccoïden vond, in andere omstandigheden de zuivere granulavorm zeker te vinden zijn.

Toen ik pas met dit onderzoek bezig was, merkte ik na 20 uur broeden bij 37°, in een Z.-N.-praeparaat van een overgeënte Loewenstein-cultuur van *B. Karlinski*, tusschen roode staaf-

---

[1]) E. Gróh, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 128, 353 (1933).

jes, een groepje kleine, blauwe ronde (voorzoover ik dit door de kleine afmetingen kon vaststellen) vormen van nog geen $\mu$ doorsnede op als diplo- en tetracoccen gerangschikt; denkende aan een verontreiniging, maakte ik na een week (bij kamertemp. gestaan) weer een praeparaat, waarin ik nu uitsluitend roode staafjes vond. In ieder geval vormt dit een bewijs voor het feit, dat jonge vormen minder zuur(alcohol)vast zijn (zie ook volgend hoofdstuk); de korrels in de staafjes zijn minder zuuralcoholvast dan de staafjes zelf: zie vooral de F o n t è s-praeparaten van *B. Boquet* en *B. Milch Moeller.*

In M u c h-praeparaten valt op te merken, dat de korrels sterker Gram-positief zijn dan de staafjes.

Tegenover mijn meening, dat korrels wel degelijk iets met de levenscyclus te maken kunnen hebben, staat die van L a n g e [1]). Ongeveer 1 jaar, nadat B r o e k [2]) voor de aviaire *tuberkelbacteriën* met ééncelculturen den kringloop: staafjes, korrels, staafjes vastgesteld heeft, sprak L a n g e, vermoedelijk zonder op de publicatie van B r o e k lettende, als zijn, op geen enkelen experimenteelen grond steunende, opvatting uit:

„Für die Annahme des Vorkommens isolierter entwicklungsfähiger Granula ist aber bisher von *niemandem* ein Beweis geliefert worden."

In 1936 viel echter H u [3]), eveneens met aviaire (ook met humane) *tuberkelbacteriën* werkende, B r o e k bij. Volgens hem bestaan er twee soorten granula:

1. De amorphe, stofachtige korrel, welke door degeneratie der bacteriën ontstaat en
2. de een bepaalden vorm bezittende, sterk lichtbrekende, welke bij goeden groei der bacterie ontstaat en van de bacterie onafhankelijk komt te liggen.

---

[1]) B. L a n g e, Beitr. Klin. Tub. 81, 235 (1932).

[2]) J. C. H. B r o e k, Diss. Utrecht. 1931 en Proc. Akad. Wetenschappen Amsterdam 34, 186 (1931).

[3]) K. H u, Japanese J. exper. Medicine 14, 29 (1936).

Van deze laatste soort nam hij de ontwikkeling tot staafjes waar. Echter gelukte het hem, evenmin als B r o e k, korrels tot groei te brengen, welke hij uit het bacterielichaam gesneden had.

Volgens H u kan de ontwikkeling van staafjes op de volgende wijzen plaats hebben:

1. Deeling en daarop volgend uitkiemen van zijtakken.
2. Kieming van een nieuw staafje uit een aan het eind gelegen korrel.
3. Deeling door zijtakvorming uit een zijwand (daar ter plaatse was volgens hem geen korrel): de zgn. dichotomie en bij uitzondering:
4. Eenvoudige deeling of fragmentatie.

Van den voedingsbodem hing het af welke manier op den voorgrond trad: op agar nam hij alle vier waar, op extract van milt van een konijn bijna uitsluitend dichotomie, terwijl dit laatste geheel niet optrad in glycerol-bouillon.

In tegenstelling met H u merkte ik in de laatste vloeistof zijtakken ter plaatse van de korrel op.

Het ontstaan en het voorkomen van korrels schijnt reeds vroegtijdig in het bacterielichaam op te treden. In de praeparaten, van de cultuurvloeistoffen gemaakt, waren losse korrels immers reeds na één dag te vinden. In het oppervlaktehuidje werden de granula veelal eenige dagen later duidelijk zichtbaar.

Zoowel op grond van hetgeen de opeenvolgende praeparaten te zien geven, maar vooral langs den weg der ééncelcultuur (zie hoofdstuk VIII), kunnen we tot de morphologische waarde van het granulum besluiten, waaruit zich immers de staaf- en uit dezen weder de draadvorm ontwikkelt.

## HOOFDSTUK VII.

### Opvattingen over zuur- en zuuralcoholvastheid.

LITERATUUROVERZICHT:

In een artikel van Pfannenstiel[1]) komt o.a. het volgende voor:

Volgens Koch, Courmont en Potet, Fontès, Uhlenhuth en Jötten, Calmette en eenige anderen is de zuurvastheid aan de aanwezigheid van lipoïde stoffen, resp. een washuid, te danken.

Om te weten of deze eigenschap kunstmatig verworven kan worden zetten Gottstein, Bienstock, Spina en Weber hun proeven met niet-zuurvaste organismen op vetrijke voedingsbodems in. Hierover schreef ik reeds in hoofdstuk IV.

Tegenover de opvatting van de laatsten, die inboeting der zuurvastheid op vetvrije voedingsbodems vaststelden, staat die, dat genoemde eigenschap pas te loor gaat als het bacterielichaam vernietigd wordt, b.v. door langdurige inwerking van:

melk- resp. zoutzuur (Grimme),

azijnzuur (Aronson),

alcoholische kaliloog (Hammerschlag, Aronson),

neurine (Much; door Loewenstein en Aronson bestreden),

na mechanische verbrijzeling onder toevoeging van trichloraethyleen (Aronson),

na 14 dagen maceratie bij 40—50° door keukenzoutoplossing (Much).

Daar het zonder beschadiging van het bacterielichaam, echter niet zonder bedenking, gelukt was, om de zuurvastheid op te heffen, zagen een reeks onderzoekers in andere bestanddeelen van het protoplasma de primaire oorzaak van den weerstand tegen ver-

---

[1]) W. Pfannenstiel, Z. Hyg. 95, 87 (1922). Zie hierin ook de literatuur bij de te noemen onderzoekers.

schillende ontkleuringsmiddelen en achtten de aanwezigheid van lipoïde stoffen secundair. Zoo weten Ruppel, Helbing, Wells en Stoeltzner het aan chitien, Gasis aan een niet nader gedefinieerde nucleïneverbinding van het cytoplasma.

Nog verder gingen enkele anderen, die de physische eigenschappen verantwoordelijk stelden, o.a. Hammerschlag, Fischer, Auclair en Paris, Klein, Sherman en Schlossberger.

Pfannenstiel zelf was door proefnemingen van meening, dat het zonder verbreking der structuur, zooals koken, mechanische bewerking, inwerking van zuren of basen, niet gelukt zelfs door dagenlange extractie met vet oplossende middelen (chloroform, xyleen, aceton-aether) de zuurvastheid geheel tot verdwijnen te brengen; de aldus verkregen extracten van humane en bovine *tuberkelbacteriën* waren geheel zuurvast, evenals die van *gras-* en *schildpadbacteriën;* die van *B. Rabinowitsch* en *B. Korn* iets minder zuurvast.

Het achterblijvende van humane, bovine en aviaire tuberkelbacteriën was nauwelijks minder zuurvast dan de organismen vóór de extractie; de andere onderzochte microben hadden iets van deze eigenschap ingeboet.

Omdat het gehalte aan extraheerbare stoffen niet evenwijdig liep aan het verlies van zuurvastheid na de extractie, gaf Pfannenstiel als zijn meening te kennen, dat genoemde eigenschap niet geheel op het lipoïde omhulsel kan berusten, maar dat ook de verdeeling der lipoïde stoffen in de bacteriecel beslissend is.

Korff-Petersen[1]) vond voor het gehalte aan lipoïden in zuurvaste 13 % en in niet-zuurvaste 20 % (vgl. ook de waarden opgegeven door Pfannenstiel; ook die door Long en Campbell aan den eenen en Chargaff, Pangborn en Anderson aan den anderen kant vermeld, allen geciteerd door Eichbaum[2])). De aetherextracten van beide waren goed zuurvast; ook volgens Korff-Petersen is de lipoïdverdeeling hoofdzaak. De samenstelling van den voedingsbodem is niet doorslaggevend, want van 2 stammen van *B. phleï,* op geheel dezelfde

[1]) A. Korff-Petersen, Z. Hyg. 98, 273 (1923).

[2]) F. Eichbaum, Ergebn. Hyg. 14, 84 (1933).

wijze gekweekt, was de eene zuurvast en de andere niet. Ook vond ze nooit toeneming van zuurvastheid op verschillend samengestelde voedingsbodems. Wel kon zij zuurvaste bacteriën, welke door het kweeken op gewone voedingsbodems hun zuurvastheid ingeboet hadden, weer zuurvast maken door ze intraperitoneaal in te spuiten bij een cavia. Dit feit werd ook waargenomen door Mironescu, Nakamura, Sweany en G. Seiffert; B. Lange daarentegen vond juist vermindering (zie bij Eichbaum).

Korff-Petersen vermoedde, dat het zuurvast-worden in het dier van een invloed van de witte bloedlichaampjes uitgaat. In 1927 heeft zij het onderzoek met Liese[1]) uitgebreid. Zij namen waar, dat met vet-oplossende middelen de zuurvastheid niet en door chemisch ingrijpende middelen nimmer voor 100 % te ontnemen is.

Extractie van vet en was had geen invloed op kleuringen volgens Ziehl-Neelsen en Gram; door toevoeging van 10 % zuur aan het extractiemiddel was *B. phleï* nog wel Gram-positief, maar kleurde niet meer volgens Z.-N.; met 25 % alcoholisch zoutzuur i.p.v. 10 % zuur was ook de Gram-kleurbaarheid verdwenen.

Volgens Eichbaum is de zuurvastheid niet te danken aan lipoïden. De genoemde eigenschap is volgens hem in hooge mate afhankelijk van den voedingsbodem (op Loeffler's serum en Hohn's milieu meer zuurvast dan op agar en bouillon); nooit gelukte het hem door passage, over welken voedingsbodem ook, de zuurvastheid geheel op te heffen[2]).

In een vorige publicatie[3]) vermeldde hij echter, dat, althans voor de zuurvaste *waterbacteriën,* van een duidelijke afhankelijkheid van zuurvastheid van voedingsbodems niets te merken was, maar dat toch die organismen de ontkleurende werking het best konden weerstaan, indien zij gekweekt waren op Loeffler's serum en in bouillon!

Darzine[4]) verkreeg bij *B. Grassberger* de minste hoeveel-

---

[1]) A. Korff-Petersen en W. Liese, Z. Imm. forsch. 51, 87 (1927).
[2]) F. Eichbaum, Ergebn. Hyg. 14, 84 t/m 86 (1933).
[3]) Z. Imm. forsch. 74, 31 (1932).
[4]) E. Darzine, Ann. inst. Pasteur 49, 743 (1932).

heid, in chloroform oplosbare stoffen; bij *tuberkelbacteriën* de meeste. Het geëxtraheerde van een bacterie van Moeller was moeilijk te ontkleuren (na 24 uur nog niet), dat van *B. Grassberger* in enkele minuten. Uit de smeltpunten en de Zeiss-Wollny graden besloot hij, dat *B. Grassberger* meer onverzadigde verbindingen moet bevatten.

Daar hij vond, dat hoe hooger de temperatuur, waarbij gefixeerd en met fuchsine gekleurd werd, hoe sneller de ontkleuring plaatshad, voegde hij aan de reeds 100 variaties der zuurvastheidskleuringen er nog één toe:

3 minuten bij 60° fixeeren, 3 min. kleuren met carbolfuchsine en ontkleuren in 2 % natriumsulfiet.

Zijn uitkomsten, hiermede verkregen, voor *B. Moeller* en *Grassberger,* deelde ik reeds mede. Palmitine- en stearinezuur, op dezelfde wijze behandeld, vertoonden zelfs na 7 dagen nog geen ontkleuring, terwijl oliezuur gemakkelijk ontkleurde.

Fontès[1]) uitte reeds eerder het vermoeden, dat *tuberkelbacteriën* palmitinezuur bevatten.

v. Riemsdijk[2]) en Dorsey Bruner[3]) staan op het standpunt, dat er door een armen voedingsbodem meer zuurnegatieve bacteriën verschijnen. Volgens hen, die met 8 verschillende zuurvaste stammen werkten, kan door een te geringe hoeveelheid koolstofhoudende verbindingen een hongertoestand intreden, waardoor de cultuur zelfs volledig uit niet-zuurvaste vormen kan bestaan; deze eigenschap zou echter in de eerste generatie op glycerolhoudende voedingsbodems weer verloren gaan, dus is het niet mogelijk, om uit een zuurvaste bacterie een constante, niet-zuurvaste variant te kweeken.

Lijnrecht tegenover deze meening staat die van Kirchner, Malkani en Milochevitch[4]):

---

1) A. Fontès, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 49, 317 (1909).

2) M. v. Riemsdijk, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 118, 218 (1930).

3) W. Dorsey Bruner, J. inf. Dis. 55, 26 (1934).

4) O. Kirchner, M. Malkani en S. Milochevitch, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 118, 167 (1930).

Noch door voortgezet kweeken van *B. phleï* in voedselarme omgeving (peptonwater, aardappelwater, gelatine, mineralen agar), noch door passage over voedingsbodems met saponien (0,2 % aan glycerol-bouillon) of zeep (0,01 % aan aardappelwater) gelukte het een verlies aan zuurvastheid te verkrijgen.

Andere onderzoekers daarentegen, o.a. Dostal (zie bij Eichbaum, blz. 86) namen verlies van zuurvastheid waar na groei op saponienhoudende voedingsbodems. In het algemeen worden versch gekweekte culturen meer zuurvast bevonden dan subculturen (Mezinesku en Moeller; zie bij Eichbaum).

Eenstemmigheid bestaat niet t.o.z. van den invloed van den ouderdom van een cultuur. Volgens G. Seiffert en B. Lange is de zuurvastheid in jonge culturen zeer gering, terwijl Czaplewski en Vierling in oude culturen een vermindering waarnamen.

Uit het voorgaande kan men zien, dat er geen meening verkondigd kan worden of ook de tegengestelde wordt evenzeer verdedigd. Daarom was het noodig om zelf, omtrent deze belangrijke eigenschap, eenige proeven uit te voeren.

EIGEN PROEVEN:

Eerst ging ik na of *coli-*, *paratyphus-* en *dysenteriebacteriën*, na een zeer geringe ontkleuring, nog rood konden blijven, maar noch een agarcultuur van 1 dag, noch een van 3 weken, kon zelfs na 5 seconden ontkleuren met ½ % zwavelzuur de fuchsinekleur vasthouden. De gevonden geringe zuurvastheid der door mij onderzochte Mycobacteriën is dus werkelijkheid en berust niet op een foutieve kleurmethode.

Om te weten of *chitien* de oorzaak der zuurvastheid kon zijn, maakte ik praeparaten van fijn gewreven garnalenschalen, vleugels en pantsers van vliegen en bovendien van Lytta vesicatoria (Spaansche vliegen). Het poeder bracht ik in een eiwit-oplossing, om alles aan het voorwerpglas te doen kleven, en streek dan dun uit. Tevoren had ik vastgesteld, dat de eiwitoplossing bij de kleuring niet hinderlijk was. De Ziehl-Neelsen kleuring (10 minuten ontkleuren in 5 % zoutzuren alcohol) leverde tot

resultaat, dat de betreffende deelen blauw of kleurloos waren; rood zag ik op deze manier nooit. Had ik echter een garnalenschaal in haar geheel genomen, dan kon zoo'n dik voorwerp wel eens plaatselijk rood zijn. Het heeft echter geen zin om een gevolgtrekking te maken uit iets, dat ongeveer 1000 maal dikker dan een bacterie is.

Dat ook *keratine* niet verantwoordelijk voor de zuurvastheid kan zijn bewees ik door Z.-N. praeparaten te maken van de schacht van een veer.

Wel kan ik mij vereenigen met de meeningen, dat versch gekweekte stammen zuurvaster zijn dan de latere overentingen en ook dat jonge organismen minder zuurvast zijn dan oude.

Eenige jaren geleden maakte ik een Z.-N. praeparaat van een Loewenstein-cultuur van *B. Bruynoghe,* welke 2 dagen bij 37° bebroed was en daarna 1½ maand bij kamertemp. gestaan had; hierin was 30 % rood. Eenzelfde cultuur, eveneens 2 dagen bij 37° bebroed, maar daarna 3 dagen aan kamertemp. blootgesteld, leverde slechts 10 % zuurvaste elementen. Hieruit besluit ik: Hoe jonger, hoe minder zuurvast; een feit, dat Saenz (zie literatuur bij het vorige hoofdstuk) ook bij *B. cheloneï* opmerkte [1]).

Toen ik echter, bijna twee jaar later, Z.-N. praeparaten maakte van Loewenstein-culturen, welke resp. 1, 3 en 6 maanden oud waren, vond ik nergens iets roods; ook niet na slechts 2 minuten ontkleuren met 1 % zwavelzuur. (De agarculturen werden op de laatste manier eveneens totaal ontkleurd). Dit geeft steun aan de bewering, dat bij het ouder worden in cultuur de zuurvastheid vermindert.

Toch is het jongzijn op zichzelf niet voldoende om het verschil in zuuralcoholvastheid te verklaren; van evenveel belang is de *temperatuur* (waarop niemand in de literatuur wees), waarop het organisme bebroed werd. De invloed van de temp. kwam in het vorige hoofdstuk voldoende tot uiting. Toch wil ik voor *B. cheloneï* nog een voorbeeld geven:

Een agarcultuur 2 dagen bij 37° bebroed en daarna 2 weken bij

---

[1]) Een ander voorbeeld van minder zuurvast-zijn van een jonge cultuur, zie volgend hoofdstuk.

kamertemp. volgens Z.-N. gekleurd: 5 à 10 % rood. Hetzelfde maar 2 dagen bij 30° bebroed en verder als boven: alles rood.

Nu het punt: *voedingsbodems.*

Toen *B. Bruynoghe* op Loewenstein nog gedeeltelijke zuuralcoholvastheid bezat, kon ik deze eigenschap niet meer op alkalischen bouillon-agar (ook niet op dien met glycerol!) aantoonen; zelfs zure ontkleuring bleek nog te sterk. Hieruit zou volgen, dat een goede voedingsbodem gunstig is voor het behoud der zuurvastheid [1]). Maar *B. Thomoff* vertoonde juist het omgekeerde: Op den allerschraalsten voedingsbodem, nml. dien uit slechts anorganische zouten bestaande, was zelfs na 10 minuten in 5 % zoutzuren alcohol geen één staafje ontkleurd; dit nam ik, zoowel onlangs, als 2½ jaar geleden waar. Dit feit is te merkwaardiger, daar kortgeleden een praeparaat van een Loewenstein-cultuur van 1 dag bij 37° en daarna 6 weken bewaren bij kamertemp. na 2 minuten ontkleuring met 5 % zwavelzuur, nog een paar % rood, een praeparaat van een overeenkomende *agar*cultuur totaal geen rood opleverde.

*B. Bruynoghe* en *B. Grassberger* (van de laatste heb ik nooit zuurvastheid waargenomen) bleken op den anorganischen voedingsbodem in het geheel niet zuurvast te zijn. Echter de zuuralcoholvaste bacteriën, welke ik aan het eind zal noemen, behielden hierop, ook na 5 passages, deze eigenschap.

Dat o.a. ook voor *B. cheloneï* en de *slangbacterie* grootendeels de temperatuur beslissend is, volgt uit het onderstaande lijstje:

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *B. cheloneï* | 3 d. | bij | 37° | op | anorg. | voed.bod., | Z.-N.: | blauw. |
| „ | 6 „ | „ | 22° | „ | „ | „ | „ | : de helft rood. |
| *Slangbacterie* | 3 „ | „ | 45° | „ | „ | „ | „ | : blauw. |
| „ | 3 „ | „ | 37° | „ | „ | „ | „ | : 30-40% rood. |
| „ | 6 „ | „ | 22° | „ | „ | „ | „ | : geheel rood. |

Als vergelijking geef ik nog de resultaten in een goeden voedingsbodem, nml. Sauton-oplossing, en wel na 2 weken bij 37°:

---

[1]) Zie ook volgend hoofdstuk.

*B. cheloneï* (Z.-N.): paar % rood.
„Z.-N." 2 min. 1 % zwavelzuur:
*B. Bruynoghe* en *B. Grassberger:* geheel blauw;
*B. Thomoff:* 5—10 % rood.

*B. Pellegrini, Ninni oranje, cheloneï, Bruynoghe* en *Thomoff* waren op bloedagar meer zuurvast en zuuralcoholvast (*cheloneï*), dan op den veel beteren voedingsbodem: Loeffler's serum. Volgens Eichbaum [1]) schenen zijn *waterbacteriën* op dit serum de zuurvastheid juist het beste te bewaren.

Verder wil ik in dit verband nog iets van het vorige hoofdstuk in herinnering brengen, nml. het minder zuur- of zuuralcoholvastzijn der bacteriën in *centrifugaten* na filtratie. Beïnvloedt ook de zuurstofspanning de zuurvastheid?

Uit het voorgaande ziet men, hoe ingewikkeld het vraagstuk is en hoe weinig men van het wezen begrijpt. Eigenlijk moet ieder geval afzonderlijk beschouwd worden en is een simplistische opvatting hier vermoedelijk niet op haar plaats.

Tot slot wil ik nog de resultaten van een *variatie* van de *Z.-N. kleuring* en bovendien die der alcoholvastheid mededeelen.

Volgens Lange [2]) zou men, door met jodiumtinctuur na te kleuren i.p.v. met methyleenblauw, een onderscheid kunnen maken tusschen *tuberkel-* en *smegmabacteriën,* d.w.z. tusschen zuurvaste en niet-zuurvaste. Mijn ervaring met deze methode is, dat ik aan die volgens Z.-N. verreweg de voorkeur geef, daar de niet-zuurvaste vormen door de nakleuring met jodiumtinctuur zoo goed als kleurloos werden, zoodat bij aanwezigheid van beide de verhouding van zuurvaste en niet-zuurvaste zeer moeilijk te bepalen is en indien slechts de laatste aanwezig zijn, vooral in een weefsel, de bacteriën gemakkelijk over het hoofd gezien kunnen worden.

**Alcoholvastheid:**

Na 3 minuten kleuren met carbolfuchsine tot juist dampvor-

---

[1]) F. Eichbaum, Z. Imm. forsch. 74, 31 (1932).

[2]) K. H. Lange, Die mediz. Welt no. 41 (1937). Gerefereerd in Süddeutsche Apoth. Z. 78, 90 (1938).

ming, ½ minuut ontkleuren met alcohol van 96 % en 1 minuut nakleuren met methyleenblauw verkreeg ik blauwpaarse praeparaten van de stammen *Bruynoghe, Pellegrino, Ninni oranje* en *Thomoff,* terwijl die van *Grassberger* meer blauw waren. Nergens was een spoor rood. Ook paste ik de methode toe op *B. cheloneï:* de blauwe staafjes in het gewone Z.-N. praeparaat werden hier paarsachtig.

*Volledig zuuralcoholvast* (daardoor *niet* van *tuberkelbacteriën* te onderscheiden) na bebroeding bij *37°* zijn:

B. Boquet, B. phleï, B. graminis, B. stercusis, B. Milch Moeller, B. berolinensis (R a b i n o w i t s c h), B. friburgensis (K o r n), B. Karlinski, B. Kedrowski, B. Darier, B. Marpmann, B. Mayeranne, B. Ninni wit, B. Valtis en van Deinse wit.

*Gedeeltelijke zuuralcoholvastheid* na kweeking bij 37° bezitten:

Slangbacterie, B. cheloneï en B. Valtis en van Deinse rood.

De eerste 2 verkrijgen vollediger zuuralcoholvastheid bij 22°, terwijl ontkleuring voor bovengenoemde groep zich sterker doet gelden.

Een *zeer geringe zuur-, echter geen zuuralcoholvastheid* bezitten:

B. Bruynoghe, B. Pellegrini, B. Ninni oranje en B. Thomoff.

Voor de uitzondering bij *B. Thomoff* zie blz. 97.

B. Grassberger is noch zuuralcohol-, noch zuurvast.

## HOOFDSTUK VIII.

### Het isoleeren.

LITERATUUROVERZICHT:

Daar in het „Handbuch der pathogenen Mikroorganismen" van Kolle, Kraus en Uhlenhuth $V_2$, 634 (1928) en X, 331 (1930) meer dan 100 ophoopings- en kweekmethoden opgesomd zijn, mag daarnaar worden verwezen; ik zal hier slechts enkele noemen.

Ook in het artikel van Haag[1]) staat een dergelijk overzicht.

Rabinowitsch[2]) en Korn[3]) verkregen hun bacteriën door zuurvaste staafjes bevattende boter bij een cavia in te spuiten.

Hoewel niet door mij toegepast, wil ik hier nog even de *koolwaterstoffenmethode* naar voren brengen, daar Söhngen[4]) er *Mycobacteriën* uit aarde en grachtwater mede verkreeg; hij gebruikte als koolstofbron petroleum of paraffine (zie ook hoofdstuk V).

Deze werkwijze werd in vele gevallen gebezigd, o.a. door Vierling[5]), die evenwel met petroleum slechte resultaten verkreeg,

door Büttner[6]), die vermeldde dat de methode slechts goed bij groote hoeveelheden Mycobacteriën, maar niet selectief is, daar ook andere paraffinen-oxydeerende organismen er op kunnen groeien en

door Folpmers[7]), die den vasten voedingsbodem veranderde in goed uitgewasschen agar met 0,02 % $K_2HPO_4$ en 0,02 % $KNO_3$ en als koolstofbron petroleum en benzine gebruikte.

Voor het kweeken van zuurvaste bacteriën uit waterleidingen

---

1) F. E. Haag, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 71, 1 (1927).
2) L. Rabinowitsch, Z. Hyg. 26, 90 (1897).
3) O. Korn, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 25, 532 (1899).
4) N. L. Söhngen, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 37, 598 (1913).
5) K. Vierling, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 52, 193 (1920).
6) H. Büttner, Arch. Hyg. 97, 12 (1926).
7) T. Folpmers, Ant. v. Leeuwenh. 1, 169, (1934).

paste ik de *zwavelzuurmethode* van Loewenstein en zijn leerlingen Sumiyoshi, Ashimura en Nakamura[1]) toe, waarvan ik de volledige werkwijze in het gedeelte „eigen proeven" zal vermelden.

Boven de elegante methode van Dold[2]), met een bij 37° verzadigde ureumoplossing, heeft Loewenstein's vinding het voordeel, dat ook de sporen gedood worden, hetgeen echter eveneens met de oude antiformine-methode het geval is.

Volgens de ontdekkers van deze laatste, nml. Uhenhuth en Xylander[3]) lossen de ongewenschte begeleiders van de *tuberkelbacteriën* daarin „als suiker in water" op.

Het voordeel van Dold's methode is, dat tuberkel- en aanverwante bacteriën veel minder beschadigd worden dan door de zwavelzuur- of antiforminemethode[4]).

Hoewel Loewenstein's methode, volgens sommigen, niet deugt voor het doel, waarvoor ze gegeven werd, nml. om tuberkelbacteriën uit bloed te kweeken, is ze zeer geschikt ter isoleering van zuurvaste staafjes in het algemeen. Zie Abel[5]) en bij Eichbaum (blz. 119).

Ook v. Oyen, Bosgra en v. Endt[6]) hadden evenmin resultaat met tuberculeuze koeien, daarentegen wel met dieren geïnfecteerd door op Loewenstein's voedingsbodem gegroeide tuberkelbacteriën.

---

[1]) Deutsche med. Wschr. 56 **I**, 1010 (1930) en
Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **120**, 127 (1931).

[2]) H. Dold, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **91**, 268 (1924).

[3]) Uhlenhuth en Xylander, Arb. kaiserl. Gesundh. amt **32**, 158 (1909).

[4]) Zie: R. Stodtmeister, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **118**, 218 (1930) en
W. Berthold, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **132**, 458 (1934).

[5]) Geciteerd door L. Lange, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **127**, 10* (1933).

[6]) C. F. van Oyen, O. Bosgra en P. J. van Endt, Ned. tijdschr. hyg **8**, 142 (1934) en
Ann. fondation de Jong-Stichting 1934.

Volgens velen is de zwavelzuurmethode bruikbaarder dan de dierproef (zie bij Hohn[1]) en wel door den korteren duur en door het feit, dat er tuberkelbacteriën kunnen voorkomen, welke wel pathogeen voor den mensch, maar niet voor de cavia zijn. Toch mag men, volgens Knorr en Friedrich[2]), de zuurgevoeligheid der *tuberkelbacteriën* niet onderschatten.

Uyeda, Nishikawa en Okubo[3]) hebben den invloed van verschillende zwavelzuurconcentraties nog eens nauwkeurig nagegaan. Volgens hen is 5 vol. % de concentratie, waarbij de afneming der begeleidende bacteriën het meest uitgesproken is. Als eihoudende voedingsbodems [hiermee heeft men het voordeel, dat het sediment niet uitgewasschen behoeft te worden: vinding van Hohn[1])] voldeden het beste die van Loewenstein en Petragnani. Op dien van Petroff groeiden de *tuberkelbacteriën* iets langzamer, op dien van Hohn gaven ze wel een overvloedigen groei, maar ontwikkelden ze zich niet zoo snel, terwijl de begeleidende bacteriën hierop minder geremd werden.

Tenslotte vermeld ik nog de methode van Aronson[4]), die longen en levers van tuberculeuze slangen 1 uur bij 37° met 2 % natronloog en het sediment hiervan met 6 % zoutzuur behandelde. Na uitstrijken op de eihoudende voedingsbodems van Dorset en Petroff verkreeg hij in 1 geval bij 25° binnen 3 dagen en in andere gevallen na 3 weken kolonies op het eerstgenoemde milieu. Deze op glycerol-agar ($p_H$ 6,6—7,8) overgeënt, gaven een goeden groei.

Volgens Lockemann en Heicken[5]) blijven humane *tuberkelbacteriën* op eiwitvrije voedingsbodems gekweekt, na een 24-urige inwerking bij kamertemperatuur van 1 N zoutzuur,

---

1) J. Hohn, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 13, 366 (1929) en Münch. med. Wschr. 76, 1120 (1929).

2) M. Knorr en H. Friedrich, Münch. med. Wschr. 77, 173 (1930).

3) S. Uyeda, J. Nishikawa en K. Okubo, Centr. Bakt. Parasitenk I. Abt. Orig. 125, 83 (1932).

4) J. D. Aronson, J. inf. Dis. 44, 214 (1929).

5) G. Lockemann en K. Heicken, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 139, 500 (1937).

maar sterven, in 5 N gebracht, binnen 5 minuten. 8 N natronloog schijnt zelfs na 24 uur nog niet doodend te werken, maar de organismen zijn dan zoo verzwakt, dat op een eihoudenden voedingsbodem eerst na 16 weken een spaarzame groei optreedt. Indien tegelijkertijd bij zoutzuur of natronloog rhodaanionen aanwezig zijn, is de uitwerking onvergelijkelijk veel sterker.

Een geheel ander soort isoleeren is dat van Schouten[1]), nml. met den *micromanipulator*. De resultaten zal ik in het gedeelte „eigen proeven" mededeelen, ofschoon het isoleeren door de hand van Schouten zelf is uitgevoerd.

EIGEN PROEVEN:

Voordat ik de zwavelzuurmethode ter isolatie toepaste, probeerde ik eerst de uitwerking ervan op eenige stammen. Van de zuivere, alkalische bouillon-agarculturen van *B. phleï* en *B. Kedrowski* nam ik een oogje, bracht dit in een dikwandig kolfje met kralen, voegde 1 cm³ 7 vol. % zwavelzuur toe, schudde flink en hierna nog 9 cm³ zwavelzuur. Na nog eens schudden, centrifugeerde ik 10—15 minuten, goot de bovenstaande, heldere vloeistof af, streek het ongewasschen sediment op den voedingsbodem van Loewenstein uit en plaatste de buizen in een broedstoof van 25°. De geheele bewerking van de eerste zwavelzuurtoevoeging af tot het uitstrijken van het sediment duurde ¾ uur. Na 5 dagen kon ik duidelijk groei waarnemen; er verschenen nml. witte korrelige kolonietjes.

Hierna nam ik de isolatie van zuurvaste bacteriën uit slijmproppen, welke aan waterkranen hingen, ter hand. Na in twee lokalen, met een steriel mes dergelijke massa's afgeschraapt en in twee dikwandige kolfjes overgebracht te hebben, maakte ik eerst van ieder een Ziehl-Neelsen praeparaat.

Dat van het eene lokaal bleek microscopisch geen zuuralcoholvaste staafjes te bevatten; in dat van het andere lokaal waren er een drietal zichtbaar.

---

[1]) S. L. Schouten, Z. wissensch. Mikrosk. 51, 421 (1934) en Ant. v. Leeuwenh. 2, 199 (1935).

Beide gevallen behandelde ik als boven, behalve, dat ik de buizen met Loewenstein's eivoedingsbodem in duplo bij 22° plaatste. Na 3 weken verschenen zeer kleine, vettige, gele kolonietjes, nog niet ter grootte van een speldeknop, in de buizen geënt met het materiaal, waarin ik de zuuralcoholvaste staafjes had waargenomen. In de andere buizen waren slechts schimmels gegroeid.

Het microscopisch beeld van die kolonietjes leverde uitsluitend zuuralcoholvaste, fijn gekorrelde, evenwijdig liggende staafjes van ongeveer 1 $\mu$ op. Bij het overenten op Loewenstein kwamen steeds de hinderlijke schimmels mede op; afenting op glycerolagar gelukte niet.

Ondertusschen zette ik de proeven met zwavelzuur nog met eenige stammen voort:

*B. Rabinowitsch, B. Ninni wit* (duur der bewerking: 2½ uur), *B. Mayeranne* en *B. Milch Moeller* (1 uur), *B. Bruynoghe, B. Thomoff, B. Grassberger, B. Pellegrini* en *B. N. oranje* (½ uur). Na 3 dagen bij 37° waren alleen de derde en vierde iets gegroeid (in de Z.-N. praeparaten was na de behandeling geen structuur meer te zien). Na ruim een week kwamen afzonderlijke, kleine kolonies bij de twee eerstgenoemde stammen op: de groei bleef echter steeds schraal en er trad ook geen vergroeiing der kolonies op. Na 3 weken waren de overblijvende, weinig zuurvaste bacteriën niet gegroeid. Daarom herhaalde ik de bewerking met 1 % zwavelzuur (½ uur). Zelfs deze concentratie bleek voor de laatste twee te groot; het sediment op gewonen agar daarentegen gaf wel een cultuur; voor de andere organismen duurde het 6 dagen vóór ik ontwikkeling kon waarnemen.

Terugkeerend tot de geïsoleerde *kraanbacterie:*

Om de hinderlijke verontreiniging van schimmels tegen te gaan besloot ik over te gaan tot behandeling met een sodaoplossing. Ook in dit geval voerde ik eerst voorproefjes uit:

2 Loewenstein-culturen van *B. Grassberger* en *B. phleï,* beide onopzettelijk met schimmel verontreinigd, schudde ik met 1 en 5 % sodaoplossing, centrifugeerde en streek het ongewaschen sediment in duplo op alkalischen bouillonagar en op Loewenstein. De eene helft plaatste ik in de broedstoof bij 25°

en de andere bij 37°. De geheele bewerking duurde 1½ uur.

In tegenstelling met de zwavelzuurbehandeling kon ik microscopisch geen degeneratie waarnemen, noch bij *B. Grassberger*, noch bij *B. phleï.*

Na 1 dag stelde ik reeds groei op agar bij 37° vast, na 4 dagen op die bij 25°; op Loewenstein bij beide temperaturen eveneens na 4 dagen. Toen na 2 weken staan bij kamertemperatuur nog nergens schimmel opgetreden was, behandelde ik de *kraanbacterie* 1 uur met 5 % sodaoplossing: het waren Loewenstein-culturen, welke 5 en 8 maanden oud waren. Ik streek de sedimenten uit op glycerol-agar en Loewenstein. Eindelijk na 1 maand bij 22° verkreeg ik groei op den eersten voedingsbodem, maar een week later was deze weer beschimmeld. Kort daarna nam ik ook schimmels waar op de agar- en Loewenstein-culturen van *B. Grassberger;* de cultuur van *B. phleï* op agar bleef rein.

Ik moest toen mijn toevlucht nemen tot sterkere middelen. Met 4 N natronloog (16 %) behandelde ik 1¼ uur beschimmelde agarculturen van *B. Grassberger, slang- en kraanbacterie.* Na 1½ week had op Loewenstein alleen de tweede zich ontwikkeld. Daarom stelde ik de laatste aan de inwerking van 8 % natronloog bloot (¾ uur). Het ongewasschen sediment gaf eerst na 17 dagen bij 22° aanleiding tot een cultuur. Nu, maanden daarna, is deze nog zuiver.

Als aanvulling op het hoofdstuk over zuurvastheid geef ik hier nog eenige resultaten van de *kraanbacterie:*

In een 4 dagen oude agarcultuur, bij 22° bebroed, waren slechts een paar % zuuralcoholvaste staafjes, in een van 3 maanden: 4 %; een Loewenstein-cultuur van 2 dagen bij 22° bebroed was geheel zuuralcoholvast.

Tot slot volgen nog eenige cultuur-eigenschappen:

Na ruim een jaar is het mij niet gelukt om deze bacterie boven 25° te kweeken.

Zij vervloeit gelatine, waarop ze zich zonder glycerol zeer schraal ontwikkelt, niet.

Op vloeibare voedingsbodems nam ik een troebelen groei waar.

De $p_H$ van peptonwater was na 2 weken bij 22° van 6,8 tot 7,8 gestegen; na 23 dagen tot 8,6.

De $p_H$ van Voges-Proskauer's voedingsoplossing had na 2 weken bij 22° een waarde van 7,6 bereikt. Voor vergelijking zie tabel IV.

Schouten isoleerde, zooals ik reeds in het derde hoofdstuk schreef, uit een jonge cultuur van *B. Thomoff* 1 granulum en 2 werkelijke staafjes; de hieruit ontstane kolonies gaven dezelfde $p_H$ in Sauton-oplossing.

Bij deze gelegenheid konden wij duidelijk waarnemen, dat de korrels, in het 6de hoofdstuk beschreven, geen kunstproducten zijn ontstaan door de colloïdchemisch niet verantwoorde kleuring, maar in het levende lichaam voorkomen.

Tegelijkertijd was mooi het op gelatine uitgroeien tot mycelia en daarbij optredende vertakkingen te onderkennen. Fraaier konden we dit alles waarnemen bij *B. Pellegrini,* waar alle vormen, vooral in het beginstadium, forscher zijn.

De eigenaardige ronde lichamen, waarvan reeds eerder sprake was, (zie hoofdstuk VI) vertoonen levend dezelfde onregelmatige structuur als in de gekleurde praeparaten te zien komt.

Een groote korrel was na een dag op de gelatine uitgegroeid tot een vrij korte staaf; op den 2den dag wilde er iets van een zijtak tevoorschijn komen, maar daarna stond de groei stil en kon niet meer aangezet worden. Een tweede bol bracht het zelfs niet tot een zeer geringe ontwikkeling. Daarentegen gelukte het alle 6 keeren, dat de staafvorm zich tot volledige culturen ontwikkelde.

Schouten isoleerde op mijn verzoek eenige staafjes van *B. Boquet* en sneed ze door met het doel omhulsel en inhoud afzonderlijk te kunnen kleuren, teneinde uit te kunnen maken of een der beide deelen grootere zuuralcoholvastheid vertoonde dan het andere, maar er liep bij het doorsnijden totaal geen inhoud uit.

## HOOFDSTUK IX.

### Algemeene beschouwingen aangaande de onderlinge verwantschap der Mycobacteriën.

LITERATUUROVERZICHT:

Harms, de veearts van wien Johne en Frothingham[1]) het materiaal, waarin zij het Bacterium paratuberculosis zagen, toegestuurd kregen, dacht te maken te hebben met den aviairen vorm van de *tuberkelbacterie,* omdat het pathologisch-anatomisch beeld een opvallende armoede aan zgn. „reuzencellen" opleverde en een er mee ingespoten cavia bleef leven. Johne en Frothingham zelf spraken er evenwel geen oordeel over uit.

Boquet[2]) vermeldde over deze bacterie: „Par leur aspect et leur polymorphisme, ces germes rappellent davantage le bacille de la fléole que le bacille de Koch." (Met fléole wordt *B. phleï* bedoeld). En verder: „Il représente l'avant-dernier anneau de cette longue chaîne de bacilles acido-résistants qui commence avec les bacilles paratuberculeux des végétaux, se continue par les bacilles paratuberculeux du beurre, du lait, des matières grasses en général, puis aborde le parasitisme avec les bacilles paratuberculeux des animaux à sang froid, en parcourt toute la gamme avec les différents types de bacilles tuberculeux et s'achève par le bacille de la lèpre dont la culture autentique n'a pu être obtenue jusqu'ici." Bij dit laatste moet men bedenken, dat het in 1928 geschreven werd; zie ook het eind van hoofdstuk V.

Moeller[3]) kweekte *B. stercusis*-houdend materiaal in melk, om te zien of deze bacterie identiek was met die van Rabinowitsch, welke goed in melk groeide. Doch melk was, volgens hem, geen geschikte voedingsbodem voor zijn bacterie, daar de er

---

[1]) Johne en Frothingham, Deutsche Z. Thiermed. 21, 438 (1895).
[2]) A. Boquet, Ann. inst. Pasteur 42 I, 495 (1928).
[3]) A. Moeller, Berl. thierärztl. Wschr. 100 (1898).

in geënte organismen in het geheel niet meer terug te vinden waren. In een later verschenen artikel[1]) schreef hij, dat hij *B. stercusis* slechts met moeite in melk kon terugvinden. Ook gaf hij hier als zijn meening te kennen, dat *B. berolinensis* Rabinowitsch (uit Berlijnsche boter afgezonderd) onmogelijk identiek met zijn bacterie kon zijn, want deze laatste maakte bouillon troebel, vormde hierin geen indool en geen amineachtigen geur, zooals *B. Rabinowitsch,* en verschilde hiervan geheel in uiterlijk op glycerol-agar. *B. phleï*[2]) verschilde van *B. Rabinowitsch* eveneens door een ander beeld van den groei op diverse voedingsbodems. Laatstgenoemde bacterie ontwikkelde zich op glycerol-agar rimpelig en grijs-wit, miste de chamoiskleur. Wat pathogeniteit betrof, waren beide echter gelijkwaardig. Ook na eenige passages door cavia's bleven echter de genoemde verschillen.

Hierna volgde nog een artikel van Moeller[3]), waarin hij vermeldde, dat ook *B. friburgensis* Korn (in boter afkomstig uit Freiburg) niet identiek was met *B. berolinensis* Rabinowitsch. Ook Korn[4]) zelf achtte deze twee niet hetzelfde. Moeller had verder uit melk een organisme gekweekt, hetwelk niet van *B. graminis*[5]) te onderscheiden was; hij vond trouwens bij alle uit melk en dergelijke producten afgezonderde bacteriën groote overeenkomsten met zijn grasbacterie. Hij nam zijn mestbacterie *(B. stercusis)* als variëteit van de grasbacteriën aan.

Zooals ik reeds in hoofdstuk VI aanhaalde, schreef Moeller als samenvatting, dat zijn gras-, mest-, melk- en boterbacteriën morphologisch hetzelfde waren, echter ook wat de kleurbaarheid betrof.

De uit neusslijm afgezonderde bacterie vertoonde, volgens Karlinski[6]), groote overeenkomsten met *Korn's friburgensis,* welke laatste echter vertakkingen en kratervormige kolonies ver-

---

[1]) A. Moeller, Therap. Monatsh. 12, 607 (1898).

[2]) In de literatuur ook **timothee- of grasbacil** genaamd.

[3]) A. Moeller, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 30, 513 (1901).

[4]) O. Korn, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 25, 532 (1899).

[5]) Vooral in oude literatuur: grasbacil II.

[6]) J. Karlinski, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 29, 521 (1901).

toonde en niet bij kamertemperatuur groeide. *Rabinowitsch' bacterie* leek er het meeste op; deze vertoonde echter droge schollen en kolfvormige aanzwellingen, terwijl Karlinski de zijne roomachtig en moeilijk van een vasten voedingsbodem afneembaar vond; wel was de zuurvastheid hetzelfde nml. zeer groot, soms grooter dan van de echte *tuberkelbacteriën*. Verder nam Karlinski nooit huidvorming waar.

Volgens Haag[1]) zijn alle verschillen in troebeling, pigmentvorming, polymorphie, overvloedigheid en vochtigheid der culturen aan toevalligheden te danken. Hij deelt de saprophytische *Mycobacteriën* als volgt in (ook Lehmann en Neumann[2]) volgen dit schema):

1. *Mycobact. lacticola* (onder de 4 modificaties moeten o.a. gerekend worden:
   B. graminis, B. Milch Moeller, B. Korn, B. Karlinski en B. Rabinowitsch).
2. *Mycobact. phleï* (hiertoe zouden o.a. behooren:
   B. stercusis, B. phleï en B. Marpmann).
3. *Mycobact. eos* en
4. *Mycobact. luteum.*

*B. Grassberger* kon hij in zijn systeem nergens plaatsen.

Volgens Ninni[3]) behoort *B. Darier* tot het type der boterbacteriën.

*B. Ninni* is afkomstig van een aviaire stam van de tuberkelbacterie; het filtraat spoot hij intraganglionnair in bij een cavia, die aan de gevolgen bezweek.

Grassberger[4]) nam morphologische en culturieele verwantschap van zijn *boter-* met Moeller's *gras-* en *mestbacterie*

---

[1]) F. E. Haag, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 71, 1 (1927).

[2]) K. B. Lehmann en R. O. Neumann, Bakteriologische Diagnostik deel 2, 762 (1927).

[3]) C. Ninni, Compt. rend. soc. biol. 107, 615 (1931).

[4]) R. Grassberger, Münch. med. Wschr. 46, 341 (1899).

(dus *B. graminis* en *stercusis*) waar. Wel merkte hij op, dat de zijne nooit dezelfde zuurvastheid had als de *tuberkelbacterie*, hetgeen bij de eerder beschreven microben uit boter wel het geval was. Toch vond hij het door de belangrijke overeenkomsten in groei, op kunstmatige voedingsbodems, niet uitgesloten, dat het door hem geïsoleerde organisme met de zuurvasten in één groep thuis behoorde.

Van de bacterie van Bruynoghe en Adant[1]), afgezonderd uit etter van een kind, dat met colloïdaal rhodiumhydroxyde ingespoten was, heb ik reeds meermalen de meening der ontdekkers naar voren gebracht, dat deze slechts van *B. luteum Söhngen* verschillen zou door het verschil in zuuralcoholvastheid.

De eigenschappen van *B. luteum* door Söhngen[2]) opgegeven zijn als volgt:

Geen amylase, trypsinase, cellulase, lipase en tyrosinase; wel katalase.

Een goede koolstofbron: mannitol; een tamelijk goede: asparagine (goede stikstofbron); een slechte: glycerol. Volgens bovengenoemden is echter, b.v. voor een reincultuur op agar, beslist glycerol noodig.

Ook vonden Bruynoghe en Adant verwantschap met een bacterie door Tiedemann[3]) gekweekt uit bloed van iemand lijdende aan netvliesontsteking. Deze stam kon echter op gewonen agar groeien en in jeugdigen toestand waren er eenige niet-zuurvaste elementen onder op te merken.

Maar ook de uit bloed en gezwellen van lepralijders door Ota en Sato[4]) afgezonderde *B. aurantiacum* vertoonde groote overeenkomsten er mee. Ota's stam kon echter op gewonen agar groeien en was pathogeen voor witte muis, die van Bruynoghe

---

[1]) R. Bruynoghe en M. Adant, Compt. rend. soc. biol. **111**, 1051 (1932).

[2]) N. L. Söhngen, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. **37**, 595 (1913).

[3]) H. J. Tiedemann, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **122**, 483 (1931).

[4]) M. Ota en S. Sato, Compt. rend. soc. biol. **107**, 1062 (1931).

daarentegen had geen schadelijke gevolgen voor cavia, konijn, witte muis en duif.

Saenz[1]) deelde van *B. cheloneï* (schildpadbacterie van Friedmann) mede, dat deze zich in vitro en vivo bij de complementbindingsreactie gedroeg als *B. phleï* e.d.. Curatieve eigenschappen bestonden niet en het „tuberculine" was ontbloot van alle toxiciteit.

Friedmann[2]) zelf daarentegen prees het uit zijn bacterie bereide vaccin aan als middel tegen tuberculose vanwege goeden groei bij 37° en hetzelfde uiterlijk als een cultuur der *tuberkelbacterie.* Zooals hij zelf berichtte en nog wel dik gedrukt:

„Schon durch die Tatsache des guten Fortkommens bei 37° — der Körpertemperatur des Menschen — sowie das höchst charakterische tusschen der Kulturen wie es von allen bisher bekannten Bacillen aus der Gruppe des Tuberkelbacillus nur dem Bacillus der menschlichen Tuberkulose und dem Perlsuchtbacillus zukommt, unterscheidet sich der Bacillus der Schildkrötentuberkulose erheblich insbesondere von sämtlichen bisher aus dem Kaltblüterkörper gezüchteten Tuberkelbacillen dem Fischtuberkelbacillus (Bataillon, Dubard, Terre), dem durch Blindschleichenpassage modifizierten Tuberkelbacillus (Moeller), dem durch Froschpassage modifizierten Tuberkelbacillus (Bataillon, Lubarsch, Dieudonné)."

Deze opvatting is krachtig weersproken, behalve door Saenz (zie boven), o.a. door L. Lange[3]). Volgens hem zou Friedmann's bacterie alleen in enorme doses toxisch werken en het vermogen om echte tuberkels te vormen tot alle zuurvasten uitgestrekt zijn, hoewel voor verschillende stammen in zeer verschillenden graad. Zijn conclusie: Friedmann's bacterie nadert tot de saprophyten vanwege het groote culturieele onderscheid t.o.z. van de parasieten en omdat pathogeniteit slechts onder zeer bepaalde omstandigheden mogelijk is.

---

[1]) A. Saenz, Ann. inst. Pasteur 47, 4 (1931).

[2]) F. F. Friedmann, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 34, 647 (1903).

[3]) L. Lange, Z. Imm. forsch. Orig. 32, 229 (1921).

Bovendien gaf Friedmann zelf op, dat zijn culturen niet zuiver waren (verontreinigd door luchtkiemen van saprophytischen aard).

B. Lange[1]) gaf als zijn meening te kennen, dat de benaming zuurvasten van het koudbloedige type (waaronder zuurvaste bacteriën uit aarde, water, kikvorschen, schildpadden, hazelwormen, e.d.) eigenlijk misleidend is. Voor den vorm der kolonies gelukte het niet, om ook maar één enkel constant kenmerk te vinden op grond, waarvan deze staafjes van andere onderscheiden moeten worden; de vorm en aard worden immers beïnvloed door ouderdom der cultuur, samenstelling en vochtigheid van den voedingsbodem en door de kweektemperatuur.

Ter gelegenheid van de 5de „Tagung der Deutschen Tuberkulose-Gesellschaft" in Mei 1932[2]) zeide hij in het slotwoord van zijn voordracht als antwoord aan Rabinowitsch, die de Mycobacteriën der koudbloedigen als afzonderlijke groep gehandhaafd wilde zien, dat er door deze groep wel eenige pathogene veranderingen in koudbloedige dieren ontstaan, welke wel overeenkomst met die door tuberkelbacteriën in warmbloedige vertoonen, maar ook menige afwijking bestaat. Tegen de opstelling als een afzonderlijkheid was hij vooral gekant, omdat ze geen pathogeniteit voor koudbloedige dieren bezitten.

Ook Haag[3]) was van oordeel, dat er geen scherpe grens te trekken viel tusschen de zgn. koudbloedige en de zuiver saprophytische bacteriën.

Braun en mw.[4]) stonden op het standpunt, dat het wel degelijk zin had om het zgn. koudbloedige type in een afzonderlijke groep te plaatsen, daar dit kieskeuriger was dan de saprophyten; de laatsten namen nml. met de broedstooflucht als eenige koolstofbron genoegen. Bij de onderzoekingen bleek ook, dat de boterbacteriën van Rabinowitsch en Korn geen principieele verschillen vertoonden met Moeller's *B. phleï.*

---

[1]) B. Lange, Veröff. R. Koch Stift. band II, deel 3, 134 (1921).

[2]) B. Lange, Beitr. Klin. Tub. 81, 235 (1932).

[3]) F. E. Haag, Centr. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 71, 1 (1927).

[4]) Biochem. Z. 146, 575 (1924).

In andere deelen van het bacterierijk kan men zijn toevlucht nemen tot agglutinatie en complementbinding ter nadere onderscheiding, maar bij de zuurvasten, in de ruimste beteekenis, schieten de genoemde methoden tekort en bovendien worden de onderzoekingen nog bemoeilijkt, doordat de hoeveelheden — zoowel der agglutininen als der complementbindende lichamen — te gering zijn. Zoo kunnen bovine en humane *tuberkelbacteriën* serologisch niet van elkaar onderscheiden worden; het is daarom ook niet te verwonderen, dat men dikwijls het koudbloedige type niet van het saprophytische kon onderscheiden: zoo o.a. Furth[1]).

Daarentegen maakte Aronson[2]) door agglutinatieproeven uit, dat het antigeen der bacteriën uit verschillende slangen hetzelfde was, maar dat dit verschilde van die uit andere koudbloedige dieren, zooals *B. cheloneï*, *B. ranae* (uit kikvorsch), *B. piscium* (uit visch), *B. marinum* een bacterie van Rabinowitsch uit een Boa constrictor. Deze laatsten vormden geen pigment (Aronson's bacterie was zalmkleurig) behalve *B. marinum*, maar deze groeide diffuus in bouillon en de kolonies hadden een droger uiterlijk. Bovendien waren de kleurstoffen in de *slangbacterie* oplosbaar in xyleen, maar niet in alcohol en aether; bij *B. marinum* juist omgekeerd.

Marpmann[3]) isoleerde zijn organisme bij het onderzoeken van straatvuil op tuberkelbacteriën en dacht ook hiermede te maken te hebben.

Kedrowski[4]) hield de zijne in 1901 afgezonderd voor den verwekker van de lepra. Het is de vraag of hij wel reinculturen in handen heeft gehad, daar de jonge bacteriën van agar of bloedserum zich snel bewogen. Behalve Söhngen vond ik in de literatuur slechts Tobler[5]) en Moeller, die de meening van bewegelijkheid deelden.

---

[1]) J. Furth, J. Imm. 12, 273 (1926).

[2]) J. D. Aronson, J. inf. Dis. 44, 214 (1929).

[3]) Marpmann, Centr. Bakt. Parasitenk. 14, 229 (1893).

[4]) W. J. Kedrowski, Z. Hyg. 37, 52 (1901).

[5]) J. Valtis, G. Paisseau en F. van Deinse, Compt. rend. soc. biol. 111, 300 (1932).

Over de in 1925 (eveneens uit een lepralijder) geïsoleerde bacterie kon ik geen opgave vinden.

Over de stammen van Valtis en van Deinse[3]) vond ik het volgende:

Sputum van een kind brachten bovengenoemden en Paisseau na behandeling met 10 % $H_2SO_4$ op den voedingsbodem van Loewenstein, waarop na enkele dagen een rood-oranje kolonie verscheen, welke witte uitgroeiingen vertoonde. De onderzoekers bevonden het witte deel geheel en het vettige, roode niet geheel zuuralcoholvast. Beide groeiden gemakkelijk (ofschoon het witte type moeilijker) op glycerol-aardappel, glycerol-bouillon en ei met asparagine. Bij 38° wilden beide soorten zich niet in het minst ontwikkelen, wel bij kamertemp., maar ook hier bleven gewone agar en bouillon steriel.

De bacteriën schenen geheel avirulent voor konijn (5 mg intraveneus) en cavia (5—10 mg subcutaan) te zijn, maar intraperitoneaal geënte cavia's reageerden zwak op onzuivere tuberculine, echter niet op het overeenkomende zgn. paratuberculine (onderhuidsche inspuiting); wel op het laatste, indien het tuberculeuze cavia's waren. Intraveneus ingespoten konijnen reageerden niet op de intraveneuze injectie van het paratuberculine, wel op het onzuivere tuberculine.

Daarentegen: Door onderhuidsche inspuiting van het witte in cavia's geënt met het roode type ziet men niet het phenomeen van Koch optreden.

De schrijvers besloten uit deze proeven, dat de geïsoleerde bacteriën twee typen van volgens hun benaming *Paratuberkelbacteriën* (dus saprophytische *Mycobacteriën*) zijn, welke zich vooral onderscheiden in de vorming van verschillende pigmenten.

Pellegrino zag ik slechts vermeld bij Haag (blz. 31): Hij hield zijn stam Tobler[1]) IV B voor een pseudodiphtherie-, dus een *Corynebacterie*. Het scheen een overgangsvorm naar de *Mycobacteriën* te zijn: de kolonies Mycobacterieachtig, organismen

---

[1]) Zie: M. Tobler, Z. Hyg. 36, 120 (1901).

sterk Gram-positief, plomp en slechts weinig zuurvast. Volgens Haag zou men met de paraffinemethode de *Myco-* van de *Corynebacterie* kunnen scheiden.

Ook zijn er *Corynebacteriën,* welke vertakte draden kunnen vormen; deze hebben een nauwe verwantschap tot de Actinomyceten. Karakteristiek voor de laatstgenoemde organismen is hun harde, lederachtige groei op de oppervlakte; kolonies zitten vast in den voedingsbodem en zijn hiervan niet af te nemen zonder iets er van mede te sleepen. Sommigen echter vormen een vettig beslag, hetwelk gemakkelijk zonder beschadiging van den voedingsbodem te verwijderen is en daardoor een overgang tot de *Mycobacteriën* vormend. Ze zijn echter in het bezit van sporen, welke een grooteren weerstand tegen hooge temperaturen bieden dan de *Mycobacteriën.*

EIGEN BESCHOUWING OP GROND VAN DE WAARNEMINGEN:

Volgens mij zijn zoo niet identiek, dan toch *zéér na verwant* de volgende *saprophytische Mycobacteriën:*

B. phleï, B. graminis, B. stercusis, B. Milch Moeller, B. berolinensis Rabinowitsch, B. friburgensis Korn, B. Karlinski, B. Mayeranne, B. Marpmann, B. Darier, B. Kedrowski.

Dit grond ik op gelijke culturieele eigenschappen, zuuralcoholvastheid en het gedrag t.o.z. van $H_2SO_4$.

Of *B. Boquet* in deze groep der saprophyten thuisbehoort, kan ik zonder dierproeven niet uitmaken. Culturieel gedraagt het organisme zich geheel als de genoemde bacteriën.

De *bacterie* van Kedrowski zal wel een saprophyt van de huid zijn; een zoo moeilijk kweekbaar organisme als de *leprabacterie* is het in geen geval.

Het is onjuist om in het algemeen van *boterbacteriën* te spreken, daar ik zoowel *B. Grassberger* als *B. Thomoff,* noch wat zuurvastheid, noch wat $p_H$ veranderingen in verschillende voedingsbodems betreft, onmogelijk tot de genoemde groep kan rekenen. Onderling zijn ze evenmin gelijk; de eerste bezit in het geheel geen zuurvastheid meer, groeit goed zoowel bij 22°, als bij 45°, terwijl de

tweede meestal een geringe zuurvastheid bezit en zich bij 45° moeilijk ontwikkelt, daarentegen wel bij 22°.

Ook *B. Bruynoghe* staat, om verschillende redenen, afzonderlijk, want deze groeit juist moeilijk bij 22°, maar goed bij 45°. Eenige, maar niet alle eigenschappen komen overeen met *B. luteum* (*B. Bruynoghe* bezit tyrosinase; glycerol is een goede C-bron), maar door het in den loop van den tijd zonder glycerol te kunnen stellen, is dat verschil met de bacterie van Ota en Sato aan den eenen en met die van Tiedemann aan den anderen kant weggevallen. In ieder geval echter had de pas geïsoleerde stam andere eigenschappen dan degene, welke ik nu in handen heb.

Het heeft op het oogenblik wel degelijk zin om de *Mycobacteriën* der koudbloedige dieren als afzonderlijke groep te handhaven, want de zuuralcoholvastheid bij 45° bestaat niet, terwijl die bij 37° minder is dan die bij 22°. Verder nam ik eenige malen waar, dat een agarcultuur van *B. cheloneï* bij 37° niet groeide, wel bij 25°; een feit, dat ook Saenz opgemerkt heeft.

Biochemisch behooren de *slangbacterie* en *B. cheloneï* bij de groep der saprophytische *Mycobacteriën* thuis; het grootste verschil zit in de zuuralcoholvastheid. Zoowel het koudbloedige, als het saprophytische type kunnen, volgens mij, de broedstooflucht als koolstofbron gebruiken; daarom aanvaard ik niet de scheiding door Braun en medewerkers gemaakt.

*B. cheloneï* en de *slangbacterie* zijn door de grootere zuuralcoholvastheid der laatste evenmin identiek. De bewijsvoering der niet-identiteit van beide met het verschil in pigment als grondslag, zooals Aronson beschreef, houdt volgens mij geen steek. Toen ik de culturen eenige jaren geleden kreeg, waren ze beide wit met een iets grijsachtige tint. Ruim een jaar later begonnen zich plotseling op de Loewenstein-cultuur van *B. cheloneï* roodachtige puntjes af te teekenen; de daarop volgende overenting gaf een geheel roodachtige cultuur. Ook de agarcultuur verkreeg dit pigment. Een maand later verkleurde de *slangbacterie* op den voedingsbodem van Loewenstein tot geelbruin, welke kleur na overenting eveneens rose-achtig werd.

In tegenstelling met Aronson is het pigment van de laatste

niet oplosbaar in xyleen, wel in alcohol en aether, eveneens dat van *B. cheloneï.*

Het feit, dat ik *B. Ninni wit* tot dusver niet bij 45° kon kweeken en agarculturen soms beter bij 25° dan 37° groeien, zou voor verwantschap met de *slangbacterie* en *B. cheloneï* pleiten, maar de afsplitsing van de oranje variëteit, welke zeer veel overeenkomsten vertoont met *B. Pellegrini,* maant tot voorzichtigheid en eveneens het feit, dat de zuuralcoholvastheid bij 22° kleiner is dan bij 37°.

*B. Valtis en van Deinse wit en rood* ontwikkelen zich zeer langzaam en moeilijk. Van hun biochemisch gedrag kan ik weinig mededeelen, daar het enten op vloeibare voedingsbodems moeilijkheden oplevert, vooral van het slijmachtige, roode type. Volgens Spanier en Tschertkowa[1]) maakte ik gebruik van een mengsel van vaseline en vloeibare paraffine om de stukjes op de oppervlakte te doen drijven, maar hiermede had ik geen succes.

T.o.z. van de Sauton oplossing vertoonen de 2 variëteiten verschillen: na 2 weken bij 37° is de $p_H$ voor rood onveranderd, in de cultuur van wit is deze echter gedaald van 7,2 tot 6,4; na 2 weken bij 22° daarentegen had de $p_H$ voor rood een waarde van 8,0 (na 3 weken was deze zelfs 8,6), terwijl bij die in wit een daling tot 6,8 plaats gehad had.

De proeven nog voortzettende, vond ik door de roode variëteit de $p_H$ na 4 weken gedaald tot 8,2; de witte, opnieuw geënt en beter dan den eersten keer (nu eenigszins troebel) groeiend, verhoogde eveneens de $p_H$ en wel na 10 dagen tot 7,6.

Bij 22° nam ik ook een stijging door *B. Ninni wit* waar: na 10 dagen was de $p_H$ 7,6. Bij 37° was, voor zoover ik heb nagegaan, *B. Thomoff* de eenige, welke in Sauton's oplossing eerst de stikstof- en daarna de koolstofbron scheen aan te tasten (zie hoofdstuk III).

Verder nam ik, evenals in de literatuur, ontwikkeling van de 2 bacteriën van Valtis en v. Deinse waar op glycerol-bouillon

---

[1]) P. Spanier en E. Tschertkowa, Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. 125, 361 (1932).

en glycerol-aardappel. Daar ze aan de oppervlakte van den gelatinesteek groeien, kunnen het geen *tuberkelbacteriën* der warmbloedige dieren zijn, waaraan ze overigens zeer veel doen denken. Bij 45° kon ik ze niet tot ontwikkeling brengen.

Evenals de onderzoekers nam ik een tragere ontwikkeling bij het witte type waar. In tegenstelling met de literatuur echter kon ik, het duidelijkst bij wit, eenigen groei op glycerolagar en Loewenstein bij 37° bespeuren. Het laatste jaar ontwikkelde de roode variant zich ook op agar en bouillon zonder glycerol (bij 22°).

Over het algemeen levert de witte variëteit slankere en langere vormen dan de roode en is de eerste bij 37° en 22° geheel en de laatste bij beide temperaturen slechts voor ongeveer de helft zuuralcoholvast.

Daar ik de witte, korrelige kolonies éénmaal in roode, gladde zag overgaan (zie hoofdstuk I), kunnen deze twee bacteriën als modificaties worden beschouwd.

Onder mijn serie is er geen één, welke tot de *Actinomyceten* gerekend zou moeten worden; alle zijn gemakkelijk van een vasten voedingsbodem af te nemen.

## SAMENVATTING.

**Hfdst. II:** Geen der stammen bracht gelatine tot vervloeiing, noch L o e f f l e r's serum en bloedagar. Indien een aminozuur, als eenige C- en N-bron moest dienen, kon slechts d-alanine hieraan goed voldoen; daarentegen nam ik een uiterst schralen groei en geen $p_H$ verandering waar met resp. l-tryptophan, l-tyrosine en glycine; indien tevens lactaat aanwezig was, een beteren groei en $p_H$ stijging.

Uit l-tryptophan werd na één maand (zelfs met lactaat) geen indool gevormd door: *B. Pellegrini, B. Ninni oranje, B. Thomoff, B. Rabinowitsch, B. graminis* en *B. Milch Moeller*. In de laatste 3 was de reactie even zwak, in *B. Thomoff* zwakker en in de 2 eerstgenoemden bacteriën zelfs veel zwakker dan in de blancoproef.

Indolylpropionzuur bleek niet aanwezig, wel β-indolylazijnzuur, indien aan de tryptophanoplossing lactaat was toegevoegd; in de culturen van *B. Thomoff* minder, in die van *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* veel minder dan in de 3 andere, maar merkbaar sterker dan in de blancoproef.

Zonder lactaattoevoeging kon geen β-indolylazijnzuur worden aangetoond.

De voedingsoplossing met l-tyrosine en lactaat leverde het volgende resultaat:

Geen phenolvorming door *B. graminis, B. Rabinowitsch, slangbacterie, B. Grassberger, B. Thomoff, B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje;* evenals in tryptophan gaven de laatste 3 zwakkere kleuren dan de blancoproef.

In alle gevallen had, in goede overeenstemming met l-tryptophan, oxydatie tot p-oxyphenylazijnzuur plaats gehad; door de 3 laatstgenoemde bacteriën (ook *B. Grassberger,* echter wederom in mindere mate dan door de rest).

Uit d-alanine had uitsluitend *B. graminis* eenig azijnzuur gevormd (microchemisch nagegaan); daarentegen kon ik geen ken-

merkende kristallen waarnemen bij *B. Mayeranne, B. Rabinowitsch* en *B. Thomoff.*

Alle stammen verhoogden, ongeveer tot gelijke hoogte, de $p_H$ van een voedingsoplossing, waarin d-glutaminezuur, als eenige C-bron, aanwezig was, uitgezonderd *B. Ninni wit,* waar de $p_H$ iets, en *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* waar de $p_H$ hier ver beneden die grens bleef.

Het voor het gebruikte indicatorenmengsel neutrale punt in centrifugemelk bereikten zelfs na één maand niet: *B. Grassberger, B. Bruynoghe* en *B. Ninni wit.* De 2 eerstgenoemden, *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje,* verhoogden het formaldehydegetal; de anderen liet dit onveranderd. Opmerkelijk was het sterke terugloopen der kleur bij *B. Thomoff.*

**Hfdst. III:** Anorganische zoutoplossingen met maranta- of aardappelzetmeel bij 110° gesteriliseerd gaven, in vergelijking met de blancoproef, na enting en bebroeding, met jodium een iets meer paarsachtige tint.

Het geënte peptonwater met amylum solubile, eveneens bij 110° gesteriliseerd, gaf na 2 weken met jodiumoplossing slechts *B. Thomoff* en *B. Grassberger* een blauwachtige kleur; alle andere culturen ontkleurden. Ook nam ik ontkleuring der jodiumoplossing in peptonwater alleen waar.

In een peptonwateroplossing met glucose resp. lactose steeg de $p_H$; in een anorg. zoutoplossing met lactose bleef de $p_H$ zoo goed als onveranderd; met glucose en eveneens Sauton's oplossing daarentegen daalde deze en behalve door *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* eveneens in Sauton's oplossing. De $p_H$ had na 2 weken in den voedingsbodem van Voges-Proskauer ongeveer de oorspronkelijke waarde (7,6); door *B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* was een kleine daling bewerkstelligd.

Flinke groei trad op in Koser's urinezuurvoedingsbodem (door de glycerol!) en een zeer schralen in dien met citraat.

Goede voedingsbodems waren peptonwater met fructose, resp. mannitol; minder die met saccharose, maltose, galactose. In het geheel was geen groei in peptonwater met aesculien waar te nemen.

**Hfdst. IV:** Bij de weinig of niet-zuurvaste organismen viel op vethoudende voedingsbodems een geringe exogene en nauwelijks een dito zuuralcoholvastheid op te merken.

Lipasen waren nergens vast te stellen, ook niet volgens de methode van Söhngen.

Op cacao- en cocosvet, aan Söhngen's agar toegevoegd, bleek groei mogelijk, nauwelijks indien bijenwas en wolvet gebruikt werden; ontwikkeling bleef geheel uit in dien met lijnolie, levertraan en cetaceum.

Levertraan alleen oefende op de gebezigde bacteriën geen doodende werking uit: *B. Boquet,* na 4 maanden op alkalischen bouillon-agar overgeënt, leverde nog een cultuur op; het microscopische beeld vertoonde vóór de overenting op agar nog duidelijke staafjes.

In overeenstemming met Lansberg verhoogden alle onderzochte bacteriën (*B. Boquet, B. Bruynoghe, B. Thomoff, B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje*) de refractie en verlaagden het joodadditiegetal.

**Hfdst. V:** Söhngen's agar met paraffine liquidum bleek een slechte voedingsbodem; toch verkreeg ik groei, behalve met *B. Valtis en v. Deinse wit en rood.* Toevoeging van een weinig $NH_4Cl$ bracht hier een duidelijke verbetering tot stand. Het aldus gewijzigde milieu met petroleum, als eenige C bron, leverde dan ook een goede vermeerdering en een mooie pigmentvorming op, behalve in de genoemde uitzonderingsgevallen.

Ook waren de bacteriën nog, hoewel zeer schraal, op een geheel anorganische voedingsoplossing tot ontwikkeling te brengen.

Gistextract voldeed goed als voedingsmilieu; toevoeging van lecithine gaf nauwelijks eenig verschil; cholesterol hield den groei tegen. Op lecithine met cholesterol konden de organismen zich niet ontwikkelen.

Het filtraat van een 8 weken oude cultuur van *B. graminis,* op alkalischen glycerol-bouillon, was nog niet uitgeput voor: *B. phleï, B. Milch Moeller, B. Boquet, B. Kedrowski, B. Thomoff*

en *B. Ninni wit;* wel voor: *B. Bruynoghe, B. cheloneï, slangbacterie* en *B. Grassberger.*

**Hfdst. VI:** Op culturen in alkalischen en zuren glycerol-bouillon werd vergelijkender wijze de kleuring volgens Z i e h l-N e e l s e n, F o n t è s, G r a m en M u c h toegepast.

Bijna steeds zijn de vormen van G r a m-positief en is in deze praeparaten geen korreling waar te nemen; in de volgens de andere methoden gekleurde praeparaten is dit wel het geval. Het mooiste komt de korreling echter in de zuuralcoholvaste bacteriën uit.

*B. Boquet* en *B. Milch Moeller* (praeparaten van het huidje):

Groote polymorphie; goed zuuralcoholvast na kweeken bij 45° en 37°; bij 22° veel minder, hier tevens kortere vormen.

*B. Bruynoghe* en *B. Thomoff:*

Zoo goed als niet zuurvast; eerstgenoemde bij 45° goed en 22° slecht groeiend, laatstgenoemde juist omgekeerd. Beide geringe polymorphie vertoonend: geen draden, geen vertakkingen. Duidelijkste korreling werd hier in M u c h-praeparaten opgemerkt.

*B. cheloneï* (schildpadbacterie) en *slangbacterie:*

Beide bij 45° geen zuurvastheid; bij 37° en 22° gedeeltelijke zuuralcoholvastheid; beide bezitten bij 22° de grootste zuuralcoholvastheid; de *slangbacterie* is zuuralcoholvaster dan *B. cheloneï.* Behalve in *B. cheloneï,* waar, in alkalischen bouillon bij 45° na 2 weken, lange, als kurketrekkers gewonden draden (deze Gram-negatief!) voorkomen, is bij beide de polymorphie gering.

*B. Ninni wit:*

Zeer weinig polymorph; bij 37° zuuralcoholvast, bij 22° minder. Duidelijke korreling. Grootste lengte 2 $\mu$.

*B. Pellegrini:*

Vooral na 1 dag bij 37°, veel forscher vormen dan bij alle voorgaande organismen; daarna overgaand in een coccoïd stadium. Sterke polymorphie. Vertakkingen, evenals bij *B. Boquet* en *B. Milch Moeller,* uit den korrel ontspringend.

Zuurvastheid, bij 22° en 37°, gering; bij 45° eerst troebel groeiend, daarna dood.

De praeparaten gemaakt uit sedimenten na filtratie der culturen (37°) deden, zoowel bij *B. Pellegrini,* als bij *B. Milch Moeller,* een veel minder uitgesproken polymorphie zien en zij bevatten minder tegen ontkleuring bestand zijnde elementen dan die van de huid, bovendien meer korrelvormen.

**Hfdst. VII:** Proeven in verband met het vraagstuk der zuurvastheid:

Chitien en keratine, tenminste zooals deze stoffen voorkomen in garnalen, resp. veeren, kunnen niet de dragers der zuurvastheid zijn.

Behalve misschien de physisch-chemische verdeeling der lipoïde stoffen, blijft ook het gehalte aan verzadigde vetzuren mogelijk aansprakelijk voor het al of niet bezitten van deze eigenschap, maar in mijn proeven trad bovendien de invloed van de kweektemp. sterk op den voorgrond (zie ook vorig hfdst.). Merkwaardig en nog onverklaarbaar is de beschreven achteruitgang der zuuralcoholvastheid van *B. Bruynoghe* tot bijna geen zuurvastheid, tevens het zuuralcoholvastzijn van de slechts weinig zuurvaste *B. Thomoff,* na kweeking op de anorganische oplossing, terwijl de overige, eveneens weinig zuurvaste bacteriën, hiervan niets te zien gaven.

Voor de *slangbacterie* en *B. cheloneï* werd de volgende invloed van de temp. opgemerkt: hoe langer deze was hoe sterker de zuuralcoholvastheid.

*B. Bruynoghe, B. Thomoff, B. Pellegrini* en *B. Ninni oranje* (weinig) en *B. Grassberger* (niet-zuurvast) vertoonen nagenoeg geen alcoholvastheid.

**Hfdst. VIII:** Een kraanbacterie bleek ook, na ruim een jaar, niet boven 25° kweekbaar. In dezen tijd was dit organisme op den voedingsbodem van Loewenstein geheel zuuralcoholvast, echter niet op de andere voedingsbodems. Deze bacterie vervloeide gelatine niet en verhoogde de $p_H$ van peptonwater.

Culturen van *B. Bruynoghe, B. Grassberger* en *B. Thomoff* waren niet bestand tegen ½ uur inwerking van 7 %, wel tegen die van 1 % $H_2SO_4$. De Loewenstein- en agar-culturen van *B.*

*Pellegrini* en *B. Ninni oranje* met het laatste behandeld gaven merkwaardigerwijze geen culturen op Loewenstein, wel op gewonen, alkalischen bouillon-agar.

De zuuralcoholvaste bacteriën konden alle de inwerking van 7 % $H_2SO_4$ verdragen, zelfs 2½ uur lang. Ook merkte ik verschil in alkalivastheid op.

Slechts één groote korrel, uit *B. Pellegrini* geïsoleerd, ontwikkelde zich tot een staaf; er ontstond echter geen volgroeide cultuur, wel daarentegen herhaalde malen uit één enkele staaf. Het doorsnijden van *B. Boquet* om inhoud en omhulsel afzonderlijk te kunnen kleuren had geen resultaat.

**Hfdst. IX:** Gelijkwaardig of althans zeer naverwant zijn: *B. phleï, B. graminis, B. stercusis, B. Milch Moeller, B. berolinensis Rabinowitsch, B. friburgensis Korn, B. Mayeranne, B. Marpmann, B. Darier, B. Karlinski* en *B. Kedrowski.* De plaats van *B. Boquet* blijft zonder dierproeven nog eenigszins twijfelachtig.

Biochemisch nadert *B. Ninni wit* tot deze groep. *B. Ninni oranje* daarentegen komt meer met *B. Pellegrini* overeen.

*B. Grassberger, B. Bruynoghe* en *B. Thomoff* staan ieder op zichzelf, ofschoon een zekere verwantschap tusschen de 2 eerstgenoemden niet te ontkennen valt.

Voor handhaving van de *slangbacterie* en *B. cheloneï* als afzonderlijke groep, nml. tuberkelbacteriën der koudbloedige dieren, bestaat m.i. alle recht.

De 2 variëteiten der stammen van Valtis en v. Deinse naderen tot de *tuberkelbacteriën* voornamelijk door hun moeilijken groei op de gebruikelijke voedingsbodems.

---

l 1779

# LIJST VAN PERSOONSNAMEN.


Abel, R., zie Lange, L., 128 [1]).
Adant, M., zie Bruynoghe, R..
Alvarez en Tavel, 3.
Anderson, R. J., zie Chargaff, E..
Aronson, H., 91.
Aronson, J. D., 6, 50, 102, 113, 116.
Ashimura, zie Loewenstein, E..
Auclair, J. en Paris, L., 92.
Avery, O. T., zie Tjøtta, T..

Bataillon, 111.
Beitzke, H., 3.
Bergey, D. H., 1, 2.
Berthold, W., 101.
Bienstock, B., 30, 91.
Boissevain, Ch. H. en Spillane, J. H., 39.
Boquet, A., 4, 9, 23, 42, 49, 107.
Borrel, A., Boez, L. en Coulon, A. de, 40.
Bosgra, O., zie Oyen, C. F. van.
Bottema, J. K., 43.
Braun, H. A, 10, 22, 32, 37, 38, 49, 112.
Brem, W. V., 3.
Broek, J. C. H., 89.
Brun, C., zie Vaudremer, A..
Bruner, W. Dorsey, 94.
Bruynoghe, R. en Adant, M., 4, 9, 22, 50, 109.
Büttner, H., 100.

Calmette, A., 91.
Campbell, L. K., zie Long, E. R..
Carrez, 21.
Chargraff, E., 7.
Chargraff, E., Pangborn, M. C. en Anderson, R. J., 92.
Chester, D., 1.
Ciocalteu, V., zie Folin, O..
Courmont, P. en Potet, M., 91.
Czaplewski, E., 95.

Damon, S. R., 38.
Darzine, E., 93.
Davis, 39.
Deinse, F. van, zie Valtis, J..
Dieudonné, 111.
Dold, H., 101.
Dostel, H., 95.
Dubard, 111.

Edwards, J. T., zie Fadyean, J. Mc..
Ehrlich, 11.
Eichbaum, F., 9, 10, 31, 32, 92, 93, 98.
Endt, P. J., zie Oyen, C. F. van.

Fadyean, J. Mc., Sheater, A. L. en Edwards, J. F., 4.
Fischer, A., 92.
Folin, O. en Ciocalteu, V., 15.
Folpmers, T., 17, 100.
Fontès, A., 51, 91, 94.
Friedmann, F. F., 5, 49, 111.
Friedrich, H., zie Knorr, M..
Frothingham, zie Johne.
Furth, J., 113.

Gasis, D., 92.
Gottstein, A., 30, 91.
Graaff, W. C. de, 11, 19.


---

[1]) De cijfers verwijzen naar de bladzijden.

Graham, W. R., zie Kay, H. D..
Gram, H. W., 51, 52.
Grassberger, R., 5, 9, 22, 30, 109.
Grimme, A., 91.
Gróh, E., 88.
Grolier, A. de, 23.

Haag, F. E., 6, 37, 109, 112, 115.
Hammerschlag, A., 91, 92.
Hansen, 43.
Heicken, K., zie Lockemann, G..
Helbing, C., 92.
Hohn, J., 102.
Holman, 31.
Hu, K., 89, 90.

Ingram, G. L. IJ., zie Twort, F. W..

Jacobitz en Kayser, 3.
Johne en Frothingham 2, 41, 49, 107.
Jötten, K. W., zie Uhlenhuth, P..

Karlinski, J., 5, 9, 22, 30, 108.
Kaufmann, H. P., 34.
Kay, H. D. en Graham, W. R., 15.
Kayser, zie Jacobitz.
Kedrowski, W. J., 5, 113.
Kirchner, O., Malkani, M. en Milochewitch, S., 94.
Klein, E., 92.
Kligler, I. J., 39.
Knorr, M. en Friedrich, H., 102.
Koch, R., 1, 91.
Kolle, W., 100.
Korff-Petersen, A., 92.
Korff-Petersen, A. en Liese, W., 93.
Korn, D., 6, 8, 9, 22, 100, 108.
Koser, S. A., 26, 27.
Kraus, R., zie Kolle, W..
Krüger, D. en Tschirch, E., 14.

Lange, B., 2, 89, 93, 95, 112.
Lange, K. H., 98.
Lange, L., 25, 101, 111.
Lange, L. en Pescatore, H., 42.
Lansberg, L. M., 32, 34.
Lehmann, K. B. en Neumann, R. O., 1, 109.
Leitner, S. J., 39.
Liese, W., zie Korff-Petersen, A..
Lockemann, G., 39.
Lockemann, G. en Heicken, K., 102.
Long, E. R., 39.
Long, E. R. en Campbell, L. K., 92.
Loewenstein, E., 10, 32, 91.
Loewenstein, E., Sumiyoshi, Ashimura en Nakamura, 101.
Lubarsch, O., 111.

Malkani, M., zie Kirchner, O..
Marpmann, 6, 113.
Mezinesku, D., 95.
Milochevitch, S., zie Kirchner, O..
Mironescu, Th., 93.
Moeller, A., 3, 5, 7, 8, 22, 48, 95, 107, 108, 111, 113.
Much, H., 52, 91.

Nakamura, K., 93.
Neelsen, zie Ziehl.
Nencki, 12.
Neumann, R. O., zie Lehmann, K. B..
Ninni, C., 5, 109.
Nishikawa, J., zie Uyeda, S..

Okubo, K., zie Uyeda, S..
Olmsted, W. H., 14.
Ota, M. en Sato, S., 4, 110, 116.
Oyen, C. F. van, Bosgra, O. en Endt, P. J. van, 101.

Paisseau, G., zie Valtis, J..
Pangborn, M. C., zie Chargaff, E..

Paris, L., zie Auclair, J..
Pescatore, H., zie Lange, L..
Petri, R. J., 3, 8.
Pfannenstiel, W., 91, 92.
Potet, M., zie Courmont, M..
Proskauer, zie Voges.

Rabinowitsch, L., 3, 8, 9, 22, 30, 94, 100.
Riemsdijk, M. van, 94.
Ritter-Kristelli, H., 7.
Ruppel, W. G., 92.

Sabouraud, R., 23.
Saenz, A., 5, 9, 23, 48, 96, 111, 116.
Salkowski, E., 12.
Sato, S., zie Ota, M..
Sauton, 23.
Schlossberger, H., 92.
Schmidt, H., 40.
Schoorl, N., 14.
Schouten, S. L., 103, 106.
Schubert, J., 23, 25.
Seiffert, G., 93, 95.
Sheather, A. L., zie Fadyean, J. Mc..
Sherman, H., 92.
Sibley, W. K., 6, 50.
Söhngen, N. L., 3, 4, 22, 37, 46, 100, 110, 113.
Spanier, P. en Tschertkowa, E., 117.
Spillane, J. H., 47.
Spina, 91.
Stoeltzner, W., 92.
Stodtmeister, R., 101.
Sumioyshi, zie Loewenstein, E..
Sweany, H. C., 93.

Tavel, zie Avarez.
Terre, 111.
Thjøtta, T. en Avery, O. T., 39, 42.
Tiedemann, H. J., 4, 110, 116.
Tobler, M., 114.
Tschirch, E., zie Krüger, D..
Tuenter, J. P. A., 20.
Twort, F. W. en Ingram, G. L. IJ., 4, 41, 42, 43.

Uhlenhuth, P., zie Kolle, W..
Uhlenhuth, P. en Jötten, K. W., 91.
Uhlenhuth, P. en Xylander, 101.
Uyeda, S., Nishikawa, J. en Okubo, K., 102.
Uyei, N., 39, 40.

Valtis, J., Paisseau, G. en Deinse, F. van, 4, 113.
Vaudremer, A. en Brun, C., 43.
Vierling, K., 95, 100.
Voges en Proskauer, 26.

Wangliang, 41.
Weber, A., 30, 91.
Wells, H. G., 92.
Wildiers, E., 40.
Wolff, H., 23, 24.

Xylander, zie Uhlenhuth, P..

Ziehl en Neelsen, 51.

## STELLINGEN.

### I.

De invloed van de temperatuur op de zuur(alcohol)vastheid is duidelijk merkbaar.

### II.

E. Müller meent ten onrechte, dat door het aannemen van een oxydehuidje de passiviteit van chroom niet verklaard kan worden.

E. Müller, Z. physik. Chem. A **181**, 89 (1937).
W. J. Müller, Z. physik. Chem. A **181**, 469 (1938).

### III.

Tegen de wijze van activeering van kool door King zijn bezwaren in te brengen.

A. King, J. Chem. Soc. 1489 (1937).
H. H. Chambers en A. King, J. Chem. Soc. 688 (1938).

### IV.

Een mutase, zooals Green en mw. zich die voorstellen, bestaat niet.

D. E. Green en J. G. Dewan, Biochem. J. **31**, 1069 en 1074 (1937).
D. E. Green, D. M. Needham en J. G. Dewan, Biochem. J. **31**, 2327 (1937).
E. Adler, H. v. Euler en W. Hughes, Z. physiol. Chem. **252**, 1 (1938).
E. Adler en W. L. Hughes, Z. physiol. Chem. **253**, 71 (1938).

V.

Het verdient aanbeveling het artikel 2, 2a van het Melkbesluit aldus te wijzigen, dat vastgesteld worden het percentage, waaronder het vetgehalte niet mag dalen en een dergelijk percentage voor de vetvrije droge stof.

J. W. de Waal, Ant. v. Leeuwenh. 4, 261 (1937).

VI.

Bij de quantitatieve analyse van fructosevrije suikers kan met voordeel gebruik gemaakt worden van een biochemische methode.

F. Th. van Voorst, Chem. Weekblad **35**, 338 (1938).

VII.

De R en S varianten der tuberkelbacteriën hebben dezelfde pathogeniteit.

B. Besta, Z. Hyg. 117, 403 (1936).

VIII.

Het systeem van Bergey verdient nog steeds de voorkeur boven latere zoogenaamd natuurlijke indeelingen.

IX.

Voor de bepaling van het kiemgetal in gepasteuriseerde melk kan men met de directe telling volstaan.

A. R. Ward en Ch. E. Myers, Am. J. Publ. Health 27, 899 (1937).