Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Biochemische eigenschappen van de diphterie- en van de pseudodiphteriebacterie

https://hdl.handle.net/1874/288745

A. gen. 192, 1927.

Biochemische Eigenschappen van de Diphtherie- en van de Pseudo-Diphtheriebacterie

H. H. DE WOLFF.

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE DIPHTHERIE- EN VAN DE PSEUDO-DIPHTHERIEBACTERIE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 3464

Druk van Fa. P. A. HAPPEL - Rotterdam

Diss. Utrecht 1927

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE DIPHTHERIE- EN VAN DE PSEUDO-DIPHTHERIEBACTERIE

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. A. NOORDTZIJ, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP DEN 30STEN MEI VAN HET JAAR 1927 DES NAMIDDAGS TE 3 UUR DOOR

HENRIËTTE HELENA DE WOLFF
APOTHEKER VAN HET ZIEKENHUIS AAN DEN COOLSINGEL TE ROTTERDAM
GEBOREN TE BREDA

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS.

Bij het voleindigen van dit proefschrift is het mij een aangename plicht, U, Hooggeleerde de Graaff, Hooggeachte Promotor, mijn hartelijken dank te betuigen voor de medewerking, die ik van U mocht ondervinden.

Daar ik dit werk moest voltooien, terwijl ik steeds een ambtelijke betrekking had te vervullen, was het voor mij een buitengewoon voorrecht en een groote geruststelling verzekerd te zijn van Uwen voortdurenden vriendschappelijken steun.

Door Uw bijzondere belangstelling hebt Gij mij mijn voornemen helpen volbrengen.

U, Hooggeleerde van Italllie ben ik zeer erkentelijk voor de chemisch-pharmaceutische vorming, die mede de basis legde voor mijn verdere wetenschappelijke ontwikkeling.

Het jaar, dat ik het voorrecht had, onder Uwe leiding te mogen werken, Hooggeleerde Schoorl, wordt door mij nog steeds zeer gewaardeerd.

Ook U, Hooggeleerde Goester, ben ik dank verschuldigd; de tijd, gedurende welken ik als assistent met U mocht samenwerken, zal mij steeds in aangename herinnering bijblijven.

Met dankbaarheid herdenk ik ook wijlen Professor D. J. de Jong, op wiens laboratorium ik gastvrijheid genoot en waar ik de eerste onderzoekingen verrichtte en van wien ik daarbij tevens steeds groote belangstelling mocht ondervinden.

INHOUD.

Inleiding 1
De diphtheriebacterie 13
De pseudo-diphtheriebacterie 27
Kort overzicht van de overige stammen, waarmede het onderzoek werd verricht 41
Eenige biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie, de bacterie v. Hofmann Wellenhof A en B en van eenige andere diphtheroïden 54
a. gedestilleerd water 54
b. ureum 58
c. nitraat 61
d. melk 63
e. koolhydraten en meerwaardige alcoholen 93
f. pepton, tryptophaan, tyrosine en alanine 119
Slotbeschouwingen 149

INLEIDING.

De ziekte, welke wij diphtherie of ook wel diphtheritis noemen — Bretonneau heeft vermoedelijk in 1855 't woord diphtherie in de litteratuur ingevoerd — is aan Hippocrates en zijne leerlingen, evenmin als aan hunne latere volgelingen bekend geweest, want zij hebben wel allerlei keelziekten beschreven, maar geen, welke eenige overeenkomst vertoont met het ziektebeeld, dat de diphtherie ons te aanschouwen geeft.

Anders was het in Egypte, Syrië en Palestina gesteld, in welke landen, in tegenstelling met Griekenland, de diphtherie reeds in de vroegste tijden, als een zeer bepaalde keelziekte bekend stond. Aretaeus, aan het einde der 5e eeuw, beschouwde dan ook de gevreesde ziekte als uit Syrië en Egypte geïmporteerd.

In de Middeleeuwen en later, hebben herhaaldelijk zware epidemieën Europa geteisterd — Duitschland, Nederland, Spanje, Italië en Frankrijk worden in dit verband met name genoemd, terwijl ook in Amerika van 1771—1772 een uitgebreide en ernstige epidemie schijnt gewoed te hebben.

Beschouwde men aanvankelijk de ziekte ontstaan door een infectie van de lucht uitgaande, Bretonneau kwam, naar aanleiding van ziektegevallen te Tours, La Ferrière en Chenusson, tot de meening, dat deze infectie slechts plaats vond als gevolg van een **enting** op het verwonde slijmvlies.

In 1883 deelde Klebs op „Der Kongresz für innere Medizin" te Wiesbaden mede, dat hij aan de peripherie van de diphtherie-membranen, die hij met methyleenblauw had gekleurd, staafjes gevonden had, die geleken op de tuber-

kelbacterie, met dit verschil echter, dat ze sporen aan de uiteinden hadden.

Het was K l e b s intusschen niet gelukt deze staafjes in reincultuur te brengen.

Aan L o e f f l e r, 1884, komt de eer toe, de diphtheriebacterie 't eerst geïsoleerd te hebben. Hij gebruikte daarvoor een voedingsbodem, bestaande uit 25 % bouillonbloedserum, 1 % pepton, 1 % glucose en 0,5 % natriumchloride, waarop de diphtheriebacterie in geelwitte kolonies te voorschijn kwam.

L o e f f l e r beschouwde dat, in 1883 reeds door K l e b s waargenomen en beschreven, organisme als de oorzaak der diphtherie. Hij beschreef de bacteriën als onbeweeglijke, zich snel met methyleenblauw kleurende, deels rechte, deels eenigszins gebogen staafjes, die even lang waren als de tuberkelbacterie, maar tweemaal zoo dik.

Aan de uiteinden van het staafje nam hij korrels waar, die de kleurstof intensiever hadden opgenomen, dan de rest; soms nam hij in plaats van twee, drie, ja zelfs wel vier van dergelijke lichaampjes in één bacterie waar.

Hoewel hijzelf beweert, dat deze korrels de eigenschappen van sporen missen, houdt hij ze aanvankelijk, evenals K l e b s, toch voor sporen.

Vervolgens beschrijft L o e f f l e r een aantal dierexperimenten, nadat deze met een reincultuur van diphtheriebacteriën waren ingespoten. Bij de sectie bleken de inwendige organen — hart, milt, nieren — steeds volkomen vrij te zijn van bacteriën, zoodat de dood niet was ingetreden tengevolge van de verspreiding van de bacteriën door het lichaam, maar door een van de entingsplaats uitgaande werking dezer microben.

Hij nam aan, dat er op de plaats van enting giftige stoffen, de diphtherietoxinen, geproduceerd werden, die in den bloedstroom opgenomen werden.

De proefdieren, caviae, die tengevolge van een inspuiting met een reincultuur van diphtheriebacteriën gestorven waren, vertoonden het typische diphtheriebeeld, n.l. op de injectieplaats een oedemateuze zwelling, een grauwwit pseudomembraan, haemorrhagisch vocht in borst- en buikholte, en als het meest karakteristiek een zwelling en een hyperaemie van de bijnieren.

Bacteriën werden soms teruggevonden op de plaats van enting, maar nooit in de organen van het proefdier, hetgeen al spoedig bevestigd werd door Roux en Yersin, d'Espine, de Marignac, terwijl Roedelius in zeer ernstige gevallen een enkele uitzondering op dezen regel vond.

April 1887 deelde Loeffler mede, dat er naast de typische virulente bacterie, een niet virulente voorkwam in de keelholte, die morphologisch zeer geleek op de diphtheriebacterie.

Hoewel, volgens Loeffler, deze bacterie in tegenstelling met de diphtheriebacterie een weelderiger groei op agar vertoonde, iets kleiner was en de kolonies witter waren, deelde hij toen reeds mede, dat 't dierexperiment noodzakelijk was om uit te maken, of men al of niet met een virulenten stam had te doen.

Uit de litteratuur blijkt intusschen wel, dat hij deze bacterie als een geheel op zich zelf staand individu beschouwt, dat niets met de diphtheriebacterie heeft te maken.

Die mededeeling trok in hooge mate de aandacht van v. Hofmann Wellenhof, Babès, d'Espine,

Sörensen, Roux en Yersin, Spronck e.a. Eerstgenoemde heeft in 1887 de waarnemingen van Loeffler bevestigd, door uit 't neuskeelsecreet een op de diphtheriebacterie gelijkend staafje te isoleeren, dat echter iets korter en dikker en regelmatiger van vorm en grootte was en avirulent bleek voor caviae. Dat was de pseudo-diphtheriebacterie, ook wel en beter, bacterie v. Hofmann Wellenhof genoemd, omdat v. Hofmann Wellenhof dit micro-organisme 't eerst heeft waargenomen en beschreven.

In 't zelfde jaar deelde Loeffler tevens 't belangrijke feit mede, dat twee caviae, die na enting met diphtheriebacteriën genezen waren, in staat bleken, meerdere inspuitingen met diphtheriebacteriën te doorstaan; een zeer belangrijke ontdekking, omdat daarop onze tegenwoordige serumtherapie berust.

Roux en Yersin ontdekten vervolgens het diphtherietoxine, van Behring en Kitasato in 1890 het diphtherie-antitoxine. Op die hoogst belangrijke ontdekking zal, als vallend buiten het terrein dezer onderzoekingen, niet verder worden ingegaan.

Een groot aantal onderzoekingen van Roux en Yersin hadden intusschen aan 't licht gebracht, dat niet alle diphtheriebacteriën virulent waren en zij maakten onderscheid tusschen virulente en avirulente diphtheriebacteriën en meenden, dat de pseudo-diphtheriebacterie een avirulent geworden diphtheriestaafje was.

De meeste onderzoekers beschouwden daarentegen de avirulente diphtheriebacterie en de pseudo-diphtheriebacterie als twee geheel afzonderlijke organismen, — een opvatting, die thans algemeen wordt gedeeld.

Het is natuurlijk van het grootste belang, om deze onschuldige pseudo-diphtheriebacteriën, die eveneens in de neus-keelholte gevonden worden en al of niet naast de diphtheriebacterie kunnen voorkomen, — en zooals de litteratuur opgeeft, zeer vaak voorkomen bij diphtheriereconvalescenten — van de typische diphtheriebacterie te onderkennen.

Het is echter gebleken, dat het niet mogelijk is door één enkele reactie aan te geven, of men met een diphtheriedan wel met een pseudo-diphtheriebacterie heeft te maken. Het dierexperiment, waarvoor men de bacteriën in reincultuur moet hebben, is ongetwijfeld het belangrijkste differentieel diagnosticum voor de identiteit van de virulente diphtheriebacterie. Echter moet men hier bedenken, dat deze proef beheerscht wordt door de meer of mindere vatbaarheid van het proefdier en door den virulentiegraad van den te onderzoeken stam. Zoo zal een zwakvirulente stam zich tegenover een resistente cavia kunnen gedragen als een pseudo-diphtheriebacterie, terwijl omgekeerd een pseudo-diphtheriebacterie, althans subcutaan ingespoten bij een hypergevoelige cavia den indruk zal kunnen geven van een zwak virulenten diphtheriestam.

Bovendien moet men bedenken, dat 't dierexperiment feitelijk slechts een scheiding maakt tusschen de virulente bacteriën eenerzijds en de avirulente bacteriën benevens de pseudo-diphtherische stammen anderzijds.

Om deze drie bacterietypen van elkander te onderscheiden, zal men dus niet uitsluitend of zelfs in de eerste plaats op de dierproef zijn aangewezen, maar zullen de morphologische resp. cultureele eigenschappen dienen te worden uitgebuit. Dan zal het blijken, dat de reincultures dezer

organismen de scheiding anders doen vinden; de virulente en avirulente diphtheriebacteriën vertoonen overeenkomstige eigenschappen, die van de pseudo-diphtheriebacterie daarentegen wijken daarvan af.

De biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie eenerzijds en die van de pseudo-diphtheriebacterie anderzijds veroorloven zonder moeite de genoemde organismen van elkaar te onderkennen. Om echter virulente en avirulente stammen, die te beschouwen zijn als verschillende toestanden van één organisme, te onderscheiden, zal voor de diagnose het dierexperiment slechts beslissend kunnen zijn.

Bij 't bestudeeren der litteratuur is gebleken, dat er op dit punt veel, ja men mag zelfs zeggen, zéér veel verwarring bestaat, ook al daarom, omdat het begrip „pseudo-diphtheriebacterie" niet scherp omschreven is en men blijkbaar verschillende organismen als zoodanig heeft beschouwd. Het gevolg daarvan is geweest, dat de eigenschappen, die aan dat organisme worden toegekend, uiteenloopend zijn beschreven.

Ook 't veelvuldig voorkomen van de pseudo-diphtheriebacterie bij diphtherie-reconvalescenten zal stellig wel tot die verwarring hebben bijgedragen.

Uit statistieken zou gebleken zijn, dat de bacterie van v. Hofmann Wellenhof meer voorkomt bij menschen, die met de diphtherie in aanraking zijn geweest, maar men doet verstandig, aan deze statistieken, juist waar er zoo weinig eensgezindheid bestaat omtrent het begrip „pseudo", niet te veel waarde te hechten.

Toch neemt Knowles, om die reden aan, dat er een soort symbiose bestaat tusschen de diphtherie- en de

pseudo-diphtheriebacterie, terwijl er ook onderzoekers zijn, die meenen, dat er geen enkel parallellisme bestaat tusschen 't voorkomen dezer beide organismen.

Sommige auteurs noemen pseudo-diphtheriebacterie alles wat morphologisch op de diphtheriebacterie gelijkt en enkele der cultureele eigenschappen met deze gemeen heeft; andere spreken alleen van „pseudo" als deze in **alle** opzichten op de diphtheriebacterie gelijkt en alleen het dierexperiment negatief uitvalt, zoodat zij haar gelijkstellen aan de avirulente diphtheriebacterie. Weer anderen spreken van „pseudo" als deze in een of ander opzicht op de diphtheriebacterie gelijkt en bovendien avirulent blijkt te zijn voor caviae.

Nog gecompliceerder wordt het, als Roux en Yersin mededeelen, dat 't hun gelukt is, onder bepaalde omstandigheden de virulente diphtheriebacterie om te zetten in een avirulent staafje, terwijl het aan Trumpp in 1896 gelukte om avirulente bacteriën om te zetten in virulente. Een deel van de onderzoekers beschouwt dan ook de pseudo-diphtheriebacterie als een verzwakte, weinig veranderde diphtheriebacterie, een avirulent, atoxisch geworden organisme. Zij worden de unicisten, — hoofdzakelijk uit de Fransche school — genoemd, tegenover de dualisten, die de pseudo-diphtheriebacterie als een zelfstandig organisme beschouwen, dat in geen enkel opzicht iets met de diphtheriebacterie heeft te maken en onder geen omstandigheden in deze kan worden omgezet.

Een bewijs tegen de meening der unicisten is stellig wel, dat entingen met anti-pseudo-diphtherieserum niet beschuttend werken tegen infectie van de diphtheriebacterie,

terwijl de avirulent geworden diphtheriebacterie wel antitoxinen kan maken, die beschuttend werken. (Escherich, Spronck, Neisser, v. Behring.)

Zoo houden Loeffler, v. Hofmann Wellenhof, Escherich, Neisser en anderen de avirulentie van de pseudo-diphtheriebacterie tegenover caviae voor karakteristiek, terwijl anderen van meening zijn, dat er sommige soorten van pseudo-diphtheriebacteriën een reactie kunnen vertoonen na subcutane injectie. Toen Spronck echter aantoonde, dat anti-diphtherieserum niet neutraliseerend werkte ten opzichte van pseudo-diphtheriebacteriën, die wel degelijk zekere symptonen te voorschijn roepen, liet men over 't algemeen de eenheidstheorie varen. Tot in 1926 Bitter, Gundel en Garcia Sancho wederom meenen, dat deze beide bacteriën verschillende toestanden zijn van één organisme, omdat zij slechts door regeling van de waterstofionenconcentratie in bepaalde voedingsbodems een pathogene diphtheriestam binnen 48 uur hebben kunnen omzetten in een apathogene en omgekeerd.

Neisser noemt een bacterie, een typische diphtheriebacterie, als deze zoowel morphologisch als in cultuur de bekende constante eigenschappen heeft. De virulentie behoort daar volgens hem **niet** toe, zoodat hij wil onderscheiden:

1e. typische virulente diphtheriebacteriën.

2e. typische avirulente diphtheriebacteriën.

Heeft een bacterie dus alle morphologische en biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie en doodt zij een cavia, dan is zij een typische virulente diphtheriebacterie.

Heeft een bacterie alle morphologische en biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie, maar is zij niet pathogeen tegenover caviae, dan heeft men met een typische avirulente diphtheriebacterie te doen.

Vertoont een bacterie bovendien een werkelijke afwijking bij het onderzoek, hetzij in vorm, groei, opnemen van kleurstoffen, zuurvorming, enz., dan heeft men met een atypische diphtheriebacterie te doen, die hij weer wil verdeelen in:

1a. atypische virulente diphtheriebacteriën.

2a. atypische avirulente diphtheriebacteriën.

Als laatste groep noemt hij ten slotte

3e. de diphtheroïden of diphtherieachtigen. Dit zijn avirulente bacteriën, die in meer dan één opzicht van de diphtheriebacterie afwijken en waartoe ook de pseudo-diphtheriebacterie, beter gezegd bacterie v. Hofmann Wellenhof, behoort.

Het moet opgemerkt worden, dat 1a. en 2a. gelukkig tot de zeldzaamheden behooren want men zal moeten toegeven, dat 't een buitengemeen moeilijk vraagstuk is de atypische avirulente diphtheriebacterie te onderkennen van de werkelijke bacterie v. Hofmann Wellenhof of in 't algemeen van de diphtheroïden; hoewel Scheller en Reichenbach zoowel als Kurth beweren, dat zij deze bacterie gevonden hebben.

Vele onderzoekingen zijn gedaan over de omzetting van virulente diphtheriebacteriën in pseudo-diphtheriebacteriën en omgekeerd.

Alleen Hewlett en Knight 1897, Salter 1899 en Paneth 1922 zou het gelukt zijn de pseudo-diphtheriebacterie door dierpassages om te zetten in de diph-

theriebacterie, doch dit is nooit bevestigd geworden door latere onderzoekers.

Bitter Gundel en Garcia Sancho zouden omzettingen verkregen hebben door regeling van de pH, maar Möhrke bestrijdt deze eenheidstheorie zeer terecht weer en zegt, dat de proeven, genomen door bovengenoemde onderzoekers, slechts bewijzen, dat het hun gelukt is om virulente diphtheriebacteriën zoodanig te veranderen, dat zij gelijken op pseudo-diphtheriebacteriën, echter niet identisch daarmee zijn.

Daar dus gebleken is, dat de virulentie geen constante eigenschap is van de diphtheriebacterie, vervalt hierdoor een typisch verschil tusschen de diphtheriebacterie eenerzijds en de pseudo-diphtheriebacterie anderzijds.

Door het opsommen der verschillende opvattingen en indeelingen van de vele onderzoekers, zou het overzicht niet duidelijker worden, te meer daar een aantal onder hen, hunne ideeën in den loop der tijden nog wel eens gewijzigd hebben. De indeeling volgens Neisser is ongetwijfeld de beste.

In dit proefschrift heb ik de biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie, van de pseudo-diphtheriebacterie en van nog enkele andere diphtheroïden nagegaan en ben daarbij tot de bevestiging gekomen, dat de diphtheriebacterie en de pseudo-diphtheriebacterie twee geheel verschillende soorten zijn.

Er zijn bepaalde kenmerkende biochemische eigenschappen aan te wijzen, waarin deze bacteriën zich duidelijk onderscheiden en wel haar verschillend gedrag o.a. ten opzichte van **eiwitten** en **suikers.**

Hieraan dient te worden toegevoegd, dat ik onder de

pseudo-diphtheriebacterie uitsluitend versta, de bacterie zooals v. Hofmann Wellenhof die beschreven heeft; de algemeen op het neusslijmvlies van gezonde individuen voorkomende bacterie.

Bovendien is mij gebleken, dat de pseudo-diphtheriebacteriën, beantwoordende aan de beschrijving van v. Hofmann Wellenhof te verdeelen zijn in 2 soorten:

a. bacteriën, die eiwit **niet** ontleden;

b. bacteriën, die eiwit **wel** ontleden

en die ik resp. zal noemen:

bacterie v. Hofmann Wellenhof A;

bacterie v. Hofmann Wellenhof B.

LITTERATUUR.

Bretonneau. Des inflammations spéciales du tissu muqueux et en particulier de la diphthérite ou inflammation pelliculaire connue sous le nom de croup, d'angine maligne, d'angine gangréneux etc. Paris **1826.**

Klebs. Verh. der Congr. für inn. med. Wiesbaden **139-1883.**

Loeffler. Mitth. a. d. kaiserl. Gesundh.amte **2-421-1884.**

Loeffler. C. f. Bact. **2-105-1887.**

Roux et Yersin. Ann. de l'Inst. Past. **2-629-1888.**

Roux et Yersin. Ann. de l'Inst. Past. **3-273-1889.**

Roux et Yersin. Ann. de l'Inst. Past. **4-385-1890.**

d'Espine et de Marignac. Rev. med. de la Suisse romande. **10-34-99-1890.**

Roedelius. Z. f. Hyg. u. Inf. **75-497-1913.**

v. Hofmann Wellenhof. Wien. med. Wochenschr. **38-65-108-1888.**

v. Behring und Kitasato. D. med. Wochenschr. **16-1113-1890.**

Neumann. Z. f. Hyg. u. Inf. **40-33-1902.**

Knowles. Indian J. M. Research **7-203-1919-1920.**

Trumpp. C. f. Bact. **20-721-1896.**

Escherich. Berl. Kl. Wochenschr. **30-492-520-549-1893.**

Spronck. La semaine medicale **16-17-317-353-1896.**

Spronck. D. med. Wochenschr. **22-571-1896.**

Bitter, Gundel, Garcia Sancho C. f. Bact. **97-132-1926.**

Scheller. C. f. Bact. **40-1-1906.**

Reichenbach. Z. f. Klin. Med. **38-486-1899.**

Kurth. Z. f. Hyg. u. Inf. **28-409-1898.**

Hewlett and Knight. C. f. Bact. **23-793-1898.**

Paneth. Z. f. Klin. Med. **94-370-1922.**

v. Möhrke. C. f. Bact. **100-145-1926.**

Kolle und Wasserman. Handb. der pathogene Micro-organismen. (Neisser u. Gins.)

Nutall and Graham Smith. The bacteriology of diphtheria.

DE DIPHTHERIEBACTERIE.

De bij dit onderzoek gebruikte stammen van diphtheriebacteriën werden op de bekende, gebruikelijke wijze geisoleerd, waarbij dus in de eerste plaats van de glycerineserumplaat werd gebruik gemaakt.

Na 18-24 uur geplaatst te zijn geweest in de broedstoof bij 34-36° C., hebben zich daarop ontwikkeld ronde, afzonderlijke, geelwitte kolonies; de kern dezer kolonies is iets donkerder dan de rand, de kolonies zijn eenigszins gewelfd en bezitten een vochtigen glans, dien zij bij ouder worden weer verliezen. Bij een enkelen stam werd na lang overenten de gele tot oranjegele kleur der kolonies waargenomen, zooals men die ook in de litteratuur beschreven vindt.

Voor het identificeeren en vaststellen van de zuiverheid der stammen, werden van een 24 uur oude glycerineserumcultuur praeparaatjes gemaakt en deze gekleurd volgens Neisser, Loeffler en Gram.

In 1897 hebben Ernst en Neisser de bekende dubbelkleuring aangegeven, waarbij die deeltjes van het bacterielichaam, die zich intens met azijnzuur-methyleenblauw gekleurd hebben, bismarckbruin niet meer opnemen; men ziet dan het bruingeel gekleurde protoplasma, waarin zich de blauwe intercellulaire korrels duidelijk afteekenen. Dit zijn de korrels van Ernst-Neisser, beter de lichaampjes van Babès geheeten, omdat hij ze in 1886 't eerst beschreven heeft.

Deze lichaampjes zouden volgens microchemische reacties van Arthur Meyer en Grimme bestaan uit volutine, welke dient als reservestof. De volutine zou

gevormd worden uit nucleoproteïden en zou volgens de onderzoekingen van Schumacher uit vrije nucleinezuren bestaan en niet, zooals men eerst meende, uit nucleïnezure verbindingen.

Het ligt dus voor de hand, dat deze korreltjes op een phosphorrijken en nucleïnezuren-bevattenden voedingsbodem gemakkelijker zullen gevormd worden en omgekeerd zou men na onttrekken van beide bestanddeelen, het afnemen van poolkorreltjes moeten kunnen constateeren, hetgeen o.a. bevestigd werd door v. Herwerden.

Het is intusschen nog geen uitgemaakte zaak of de volutine werkelijk de reservestof van de bacterie is, omdat bij goede ontwikkeling vaak geen of slechte volutinevorming plaats heeft. Von Pesch zegt dan ook, dat de vorming van poollichaampjes eerder omgekeerd evenredig is met de groei-intensiteit; eenzelfde stam vertoont bij sterken groei weinig, bij zwakken groei sterke neiging tot volutinevorming. Alleen de Loeffler-serumplaat maakt hierop voor de diphtheriebacterie een uitzondering. Daarom is deze plaat zoo buitengewoon geschikt, omdat de bacterie zich hierop goed ontwikkelt, den vorm goed te zien geeft en poolkorreling vertoont, wat voor de identificatie en bestudeering van dit organisme van veel belang is.

Deze dubbelkleuring n.l. is gebleken te zijn een differentieel-diagnostisch kenmerk voor de diphtherie-bacterie en treedt uitsluitend op bij serumculturen van tenminste 9—10 uur en ten hoogste 24 uur, bij een temperatuur van liefst niet hooger dan 36° C. Op de meeste andere voedingsmedia blijft deze dubbelkleuring uit; overgeënt op glycerineserum, treden dan de typische eindstandige, of bij aanwezigheid van meer dan twee, de gelijkelijk over 't

bacterielichaam verspreide korrels weer op. Natuurlijk heeft deze kleuring alleen waarde in verband met het klinische beeld, daar een aantal andere organismen, die metachromatische korreling eveneens vertoonen; absolute waarde heeft zij intusschen niet, omdat er virulente diphtheriebacteriën gevonden zijn, die de kleuring niet vertoonden.

Wat de beteekenis van deze korreltjes is, is nog niet met zekerheid bekend. Sommigen beschouwen ze als degeneratievormen. Ernst meende, dat het sporogene korreltjes waren, als 't ware een overgang naar de sporenvorming; Neisser deelde deze meening en dacht, dat 't endogene sporen waren, die zich te midden van de chromatische kern zouden vormen. Volgens Babès gaat aan de deeling van het individu, deeling dezer korrels vooraf. Ook schijnt een eventueele vertakking samen te hangen met deze korrels en van daaruit te beginnen.

Piorkowsky veronderstelt, dat er een betrekking bestaat tusschen de metachromatische korrels en de virulentie en wel zou aan een sterke kleuring een groote virulentie gepaard gaan; doch dat bleek niet steekhoudend, daar men bij bacteriën met geringe kleuring een groote virulentie heeft geconstateerd.

Een dergelijke opvatting hadden Marx en Woitke, die een theorie opstelden, dat de overgang van een apathogenen naar een pathogenen stam zich kenmerkte door een condensatie en localisatie van de euchromatische stof, die dient ter vorming van de lichaampjes van Babès.

Talrijke pogingen zijn aangewend door Falières, om andere vaste voedingsbodems samen te stellen, ten

einde 't ontstaan van deze korreltjes te bevorderen, maar het is hem niet gelukt Loeffler's voedingsbodem door een betere te vervangen. Het is wel merkwaardig, dat die in 1884 door Loeffler samengestelde voedingsbodem in den loop der tijden door geen betere is vervangen.

Terwijl na Neisser's kleuring de bacterie bruingeel gekleurd wordt, voorzien van blauwzwarte metachromatische lichaampjes, ziet men na Loeffler's kleuring lichtblauwe bacteriën met donkerblauwe korrels, terwijl de diphtheriebacteriën zich ten opzichte van Gram's kleuring positief gedragen.

Wat deze kleurbaarheid volgens Gram betreft is de diphtheriebacterie minder Gram vast dan de diphtheroïden. Engering heeft een aantal van beide organismen onderzocht en paste de kleuring toe, zooals Langer die heeft aangegeven. Hij kleurde, volgens onderstaand recept:

carbolgentiaanviolet	2 min.
Lugol's oplossing	5 min.
absolute alcohol	15 min.
fuchsine	1 min.

Dan blijken de bacteriën van Klebs-Loeffler Gram negatief te zijn; de meeste diphtheroïden Gram positief, enkele negatief.

Uit proeven is mij gebleken, dat de pseudo-diphtheriebacterie en de meeste andere diphtheroïden Gram-vaster zijn dan de diphtheriebacterie, zoodat men goed doet deze laatste niet te lang in alcohol te ontkleuren.

Toch zou ik dit verschil in adsorptievermogen niet

gaarne laten gelden als doorslaand bewijs bij vaststelling van de diagnose, zooals Martin en Loiseau, die groote waarde hechten aan dit verschillend gedrag ten opzichte van aniline-gentiaanviolet.

De methode van Gins, die hierin bestaat, dat tusschen Neisser's dubbelkleuring met Lugol's oplossing, waaraan 1 % melkzuur is toegevoegd, eene jodeering plaats heeft, of de modificatie van Coles, waarbij na de methyleenblauwkleuring eveneens eene jodeering plaats heeft, waardoor de vorm der staafjes duidelijker zou worden, werd door mij niet toegepast, omdat de kleuring van Neisser niet 't minste bezwaar opleverde en zij bovendien vlugger en steeds correct verliep.

De diphtheriebacteriën gekleurd volgens Neisser en Loeffler geven microscopisch 't volgende beeld.

Zij vertoonen zich als slanke, meestal ietwat gebogen staafjes van een gemiddelde lengte van 3 tot 5 μ en ongeveer 0.5 μ dik. Kleurt men volgens Gram, dan lijken de staafjes dikker, minder elegant, terwijl de lichtgebogen vorm minder op den voorgrond treedt. Vermoedelijk wordt bij deze kleuring door 't ectoplasma veel kleurstof geadsorbeerd, terwijl volgens Neisser alleen 't endoplasma gekleurd wordt. Dat is wel de meest voorkomende vorm, zooals ik die microscopisch heb waargenomen. Door 't beschrijven van de vormen, waarin deze bacterie zich **kan** voordoen, wordt haar beeld niet duidelijker. v. Hofmann Wellenhof zegt o. a. van die bacterie, dat hare buitengewone variabiliteit het meeste opvalt. De grootte en vorm vertoonen zulke verschillen, dat men soms aan de reincultuur zou twijfelen. Aard en vochtigheidstoestand van den voedingsbodem,

alsmede de temperatuur, waarbij men haar laat groeien, schijnen o.a. invloed op deze vormen te hebben.

Toch gedraagt zich de diphtheriebacterie bij een bepaalde cultuur, in tegenstelling met de pseudo-diphtheriebacterie als een polymorph organisme.

Wel wil ik even den vertakten vorm noemen, dien ik waargenomen heb bij oude agarculturen van virulente diphtheriestammen, die ik destijds isoleerde.

Deze stammen, aanvankelijk steeds op glycerineserum geënt, werden via glycerineagar op agar geënt. Na 24 uur bleek, dat deze agar bedekt was met kolonies, zoodat begrijpelijkerwijs gedacht werd aan een infectie met coccen, een verontreiniging, waarmee men bij 't isoleeren van de diphtheriebacterie 't meeste heeft te kampen. Dat bleek inmiddels niet 't geval te zijn.

Ook werd op de gebruikelijke wijze de virulentie van deze agarcultuur vastgesteld; na 4 dagen was het proefdier gestorven, terwijl het bij de sectie het typische diphtheriebeeld vertoonde.

Van deze agarcultuur werd na verloop van eenige dagen een microscopisch praeparaatje gemaakt. Geweldige zwellingen werden aan het bacterielichaam waargenomen, voornamelijk aan de uiteinden van de lange, dunne staven, terwijl er enkele vertakkingen te zien waren. Deze involutievormen, zooals men die in de litteratuur beschreven vindt, zijn typisch voor de diphtheriebacterie, maar werden nooit waargenomen bij de pseudo-diphtheriebacterie.

Het is niet onmogelijk, dat deze vertakkingen, die bij de diphtheriecultures bij later stadium van ontwikkeling worden waargenomen, osmotische effecten zijn, omdat

Hort 1920 en Scales 1921 aantoonden, dat bacteriën van verschillende soorten onder invloed van 't milieu van de voedingsbodems, vormen kunnen geven, die op takken gelijken.

Lehmann en Neumann gaven daarom in 1896 de diphtheriebacterie den naam van Corynebacterium diphtheriae en plaatsten haar in de groep der Hyphomyceten; volgens Abbott en Gildersleeve echter ten onrechte, omdat elke betrekking tusschen de vertakte cellen en myceliumformatie ontbreekt.

Dit wat betreft den bijzonderen vorm, die bij de diphtheriebacterie na overenten op agar kan optreden en welke ten eenenmale bij de bacterie v. Hofmann Wellenhof ontbreekt.

Zeer karakteristiek is de ligging der bacteriën in het microscopisch praeparaat. Deze is v-vormig of palissadenvormig, terwijl daarnaast talrijke afzonderlijke staafjes voorkomen.

De in de meeste boeken beschreven ligging, als uitgespreide vingers, heb ik eigenlijk zelden gezien. Bij geen der stammen werd eigenbeweging waargenomen, ketens werden evenmin als sporen of kapsels gevormd.

Wanneer men een diphtheriekolonie uitwrijft in een druppel gedestilleerd water op het voorwerpglas, dan krijgt men het beeld van positieve agglutinatie, terwijl de bacterie v. Hofmann Wellenhof steeds een homogene suspensie geeft, evenals de andere diphtheroïden. Deze opmerking is ook gemaakt door Kresling.

De diphtheriebacterie groeit zoowel aëroob als anaëroob; aëroob intusschen krachtiger.

De diphtheriebacterie, geënt op versch gedestilleerd

water en bij 37° C. gekweekt, heeft haar levensvatbaarheid binnen 24 uur verloren.

In bouillon groeit zij zeer goed; na 24 uur neemt men vlokken langs den wand van buis of kolf waar en een sediment op den bodem; in den regel is bovendien een oppervlaktehuidje gevormd, dat bij schudden breekt en naar den bodem zinkt. De typische bouillonreuk blijft ook na zeer langen tijd bewaard.

Roux en Yersin toonden 't eerst aan, dat de reactie in bouillon veranderde gedurende den groei van de bacteriën, terwijl Smith mededeelde, dat deze verandering uitbleef in suikervrijen bouillon.

Spronck heeft den groei in zwak alkalischen bouillon bestudeerd en onderscheidt 3 typen:

A. de bouillon wordt zuur, een neerslag verzamelt zich op den bodem, terwijl de bovenstaande vloeistof helder wordt (inactief serum);

B. de bouillon blijft alkalisch — een neerslag verzamelt zich op den bodem, terwijl de bouillon troebel blijft — dik oppervlaktevlies — vloeistof op den duur opklarend (actief serum);

C. de bouillon wordt eerst zuur, daarna alkalisch, dik oppervlaktevlies.

De duur van de zure phase zou afhankelijk zijn van het glucosegehalte van den bouillon. Is deze rijk aan glucose, dan krijgt men type A, bevat de bouillon weinig glucose, dan krijgt men 't meest voorkomende type C en wanneer glucose nagenoeg afwezig is, ontstaat type B.

Madsen onderscheidt alleen type A en C en heeft dus waarschijnlijk geen glucosevrijen bouillon gehad. De

zure reactie van bouillon is dus temporair bij kleine hoeveelheden suiker, permanent bij grootere hoeveelheden.

De diphtheriebacterie groeit in een milieu van pH 5.2 tot 8.9, optimum-groei heeft plaats bij pH 7 tot 7.5 (B u n k e r, A b t et L o i s e a u).

In glucosebouillon groeit zij als in bouillon; na 24 uur is de reactie zuur.

Minder overvloedig dan in bouillon, maar toch ook goed, groeit zij in peptonwater. Hoewel de litteratuur vaak opgeeft, dat indol gevormd wordt, is 't mij nimmer gelukt indol bij een mijner stammen aan te toonen, zelfs niet na 4-6 weken bij 37° C. De reactie werd aanvankelijk als volgt uitgevoerd: 10 cm³ cultuurvloeistof werden gemengd met 5 cm³ E h r l i c h 's reagens, *) waarbij bij aanwezigheid van indol een roode kleur optreedt. Een roode kleur trad nooit op, ook niet na toevoeging van eenige cm³ verzadigde kaliumpersulfaatoplossing en zachte verwarming, wat de reactie gevoeliger zou maken.

Op de vorming van indol wordt later uitvoerig teruggekomen.

Gelatine wordt niet tot vervloeiing gebracht, de diphtheriebacterie groeit hierop natuurlijk langzaam, omdat de optimumtemperatuur hooger dan 20° C. ligt. De levensvatbaarheid bleef minstens 6 maanden bewaard en zooals in de litteratuur vermeld wordt, zelfs jaren, indien men de cultuur voor uitdrogen beschut. De gelatinesteek vertoont hoofdzakelijk oppervlaktegroei met afnemenden groei, naarmate men dieper in den steek komt.

---

*) dimethylamidobenzaldehyde 4 g.
alcohol 380 cm³.
zoutzuur 80 cm³ s.g. 1.2

Op agar groeit de diphtheriebacterie aanvankelijk niet bijzonder goed, na enkele malen overenten wordt dat beter en ziet men witte of lichtgrauwwitte kolonies, waarvan 't centraal gelegen gedeelte weer iets donkerder gekleurd is dan de rand.

Van dezen voedingsbodem heb ik menigmaal gebruik gemaakt om de stammen op zuiverheid te controleeren. Trad na 24 uur een overvloedige groei op, dan kon ik in den regel met groote zekerheid een infectie (meestal coccen) verwachten. Ervaring heeft mij n.l. geleerd, dat het bij het bestudeeren van de eigenschappen van de diphtheriebacterie noodig is, deze zéér vaak op zuiverheid te onderzoeken, daar ze òf buitengewoon gemakkelijk geïnfecteerd worden, òf reeds geïnfecteerd zijn, welke infectie echter eerst na eenige keeren overenten tot uiting komt. Het is niet onmogelijk, dat de diphtheriebacterie in symbiose leeft met de later meer op den voorgrond tredende bacterie.

Dat dit inderdaad meermalen voorkomt, blijkt wel uit 't feit, dat ik van verschillende laboratoria reincultures van diphtheriebacteriën kreeg, die bij aankomst geïnfecteerd waren met coccen en waaruit 't mij zelfs niet mocht gelukken de diphtheriebacterie te isoleeren.

Oude agarculturen kunnen, zooals reeds meegedeeld werd, kolven en soms vertakkingen vertoonen.

Wat geschiktheid als voedingsmedium betreft, houdt glycerineagar 't midden tusschen glycerineserum en agar.

Glycerineserum en serum zijn bij uitstek geschikte voedingsbodems voor de diphtheriebacterie, en nemen als zoodanig een eerste plaats in.

Wat betreft den groei op melk kan worden meegedeeld,

dat zelfs na weken geen verschil kan worden waargenomen met de niet geënte contrôlebuis, hoewel de bacterie er wel degelijk op groeit.

Ook wordt na 4 weken of langer geen afwijkende reuk waargenomen. In verband met veranderingen, die de pseudo-diphtheriebacterie in melk veroorzaakt, kom ik hierop in een afzonderlijk hoofdstuk terug.

Eindelijk zijn deze organismen in staat glucose te ontleden onder zuurvorming; gas wordt niet gevormd. Lactose en saccharose worden zelfs na langen tijd niet aangetast.

Daar het gedrag der diphtheriebacteriën ten opzichte van enkele suikers een belangrijk diagnosticum blijkt te zijn voor deze organismen, tegenover de bacterie v. Hofmann Wellenhof en enkele andere diphtheroïden, zal ook de ontleding van de koolhydraten en enkele meerwaardige alcoholen in een afzonderlijk hoofdstuk worden behandeld.

Hoewel deze ontleding reeds menigmaal juist uit een diagnostisch oogpunt in studie is genomen, heerscht er in dit opzicht weinig eensgezindheid. Zonder twijfel zijn deze uiteenloopende resultaten toe te schrijven aan verschil in samenstelling van de voedingsbodems en in de tweede plaats is het de vraag of de in onderzoek genomen koolhydraten chemisch zuiver zijn geweest.

Ten slotte werd de virulentie van de door mij gebruikte diphtheriestammen vastgesteld, eensdeels door onderhuidsche inspuiting, anderdeels door enting in de cornea. *)

Men noemt een diphtheriestam virulent, als kleine hoe-

---

*) Dr. M. Bakker, die deze entingen voor mij verrichtte, betuig ik hiervoor nogmaals mijn welgemeenden dank.

veelheden van een 24 uur oude, suikervrije bouilloncultuur een cavia van ongeveer 250 gram subcutaan ingespoten, binnen 4 maal 24 uur doodt, of wanneer weinig diphtheriebacteriën, na intracorneale enting, een keratitis parenchymatosa veroorzaken.

Bij de sectie, na subcutane injectie, werden steeds de door de diphtheriebacteriën veroorzaakte afwijkingen in typischen vorm waargenomen, n.l. groote, necrotische plek op de plaats van inenting (onderkant van het borstbeen), liesklieren aan beide zijden gezwollen, 't weefsel om de lies en okselklieren bloederig doordrenkt. Bijnieren rood en gezwollen, haemorrhagisch vocht in borst- en buikholte; de overige organen zijn normaal.

Uitstrijkpraeparaten werden gemaakt van de plaats van inenting en gekleurd volgens Neisser, Loeffler en Gram. Er werden geen bacteriën teruggevonden; ook werden geen kolonies gevormd, wanneer een weinig materiaal van de necrotische plaats werd overgebracht op een glycerineserumplaat bij 37° C.

De vorming van toxinen is een specifieke eigenschap van de virulente diphtheriebacterie, terwijl de neutralisatie door het antitoxinen bevattende serum zich hierbij aansluit.

LITTERATUUR.

Neisser. Z. f. Hyg. und Inf. 24-443-1897.
Babès. Bull. soc. anat. de Paris 61-72-1886.
Babès. Z. f. Hyg. und Inf. 5-173-1889.
Meyer. Bot. Ztg. 1904.
Grimme. C. f. Bact. 32-1902.
Schumacher. C. f. Bact. 88-362-1922.
v. Herwerden. Folia Microbiologica 1917.
v. Pesch. C. f. Bact. 92-27-1924.
Babès. Z. f. Hyg. u. Inf. 20-412-1895.
Ernst. Z. f. Hyg. und Inf. 4-25-1888.
Piorkowski. C. F. Bact. 29-63-1901.
Markx und Woitke. C. f. Bact. 29-64-1901.
Falières. Thèse. Des granulations polaires du bacille diphthérique. Bordeaux 1901.
Engering. C. f. Bact. 89-120-1922.
Langer. D. med. Wochenschr. 54-943-1897.
Martin et Loiseau. Bulletin méd. Paris 35-253-1921.
Gins. D. med. Wochenschr. 39-502-1913.
Coles. British med. Journ. 1-1213-1899.
Hort. J. Hyg. 18-369-1919-1920.
Scales. J. Inf. Dis. 29-591-1921.
Abbott and Gildersleeve. C. f. Bact. 35-273-1904.
Kresling. Pharm. Z. f. Russland 1898.
Roux et Yersin. Annal. de l'Inst. Past. 2-629-1888.
Spronck. Annal. de l'Inst. Past. 9-758-1895.
Madsen. Z. f. Hyg. und Inf. 26-157-1897.
Bunker. Journ. of Bact. 4-379-1919.
Abt et Loiseau. Ann. de l'Inst. Past. 36-535-1922.
Abt et Loiseau. Ann. de l'Inst. Past. 39-1925.
Nutall and Graham Smith. Bacteriology of diphtheria.
Lehmann und Neumann. Bakteriologie und Bakt. Diagnostiek.

DE PSEUDO-DIPHTHERIEBACTERIE.

Zoo eenvoudig als de definitie van een diphtheriebacterie is — men verstaat hieronder de bacterie, die in staat is diphtherie te verwekken — zoo moeilijk is 't om mee te deelen wat men in de bacteriologie onder de pseudo-diphtheriebacterie verstaat.

Men verstaat hieronder een bacterie, die in vele opzichten op de diphtheriebacterie gelijkt en juist, omdat zij normaal naast deze in de neuskeelholte — hoewel bij voorkeur op 't neusslijmvlies — voorkomt, gemakkelijk voor een diphtheriebacterie kan worden gehouden.

Het is natuurlijk van belang, deze twee met groote zekerheid van elkaar te kunnen onderkennen. De medicus zal door isolatie der diphtheriebacteriën-dragende patiënten er voor moeten zorgen, dat de ziekte niet verspreid wordt, maar omgekeerd mogen er niet onnoodig menschen geïsoleerd worden, zoodat het de taak van den bacterioloog is te beslissen, of men al of niet met een virulenten diphtheriestam te doen heeft.

v. Hofmann Wellenhof heeft in 1888 een beschrijving gegeven van de pseudo-diphtheriebacterie, die hij uit de keelholte isoleerde. Hij zegt hiervan, dat de morphologische eigenschappen van het organisme en de cultureele eigenschappen van den stam overeenkomen met die van de bacterie van Loeffler, echter is het organisme avirulent voor caviae en staat in geen verband tot de diphtheriebacterie.

„Eine grosze Zahl von Impfversuchen, die ich später mit den verschiedensten Fällen herstammenden Kulturen meines „Pseudo-diphtherie-bacillus" anstellte, hatten im-

mer denselben vollständig negativen Erfolg und es ist somit festgestellt, dasz ich nicht Loeffler's Bacillus, sondern einen anderen, gewiss ganz unschuldigen gezüchtet hatte, dessen Kenntnis gleichwohl wegen der auffallenden Aehnlichkeit und dem Vorkommen an gleichen Ort von Wichtigkeit ist. Nachdem ich erst den echten Loefflerschen Bacillus wirklich kennen gelernt habe, war es auch nicht schwer, sichere morphologische Unterschiede zwischen beiden ähnlichen Arten auf zu finden."

De pseudo-diphtheriebacterie is over 't algemeen korter, dikker en regelmatig van vorm; culturen op bloedserum zijn witter dan die van de diphtheriebacterie. In agarsteekcultuur vindt men naast weinig groei langs den steek, een overvloedigen oppervlaktegroei, terwijl de bacterie zich op de agarplaat goed ontwikkelt in tegenstelling van de diphtheriebacterie.

Verder acht hij het niet onwaarschijnlijk, dat er 2 soorten voorkomen, die zich door geringe, maar constante verschillen kenmerken, en waardoor de eene zich gemakkelijker dan de andere van de bacterie van Loeffler laat herkennen.

Misschien, zegt hij, zijn er ook wel meer dan 2 soorten.

Hij vindt de diphtheriebacterie gemakkelijk te onderscheiden van de pseudo-diphtheriebacterie, maar vindt 't wel moeilijk haar er zuiver uit te kweeken; pogingen om tusschen de virulente en avirulente diphtheriebacteriën morphologische verschillen te vinden leden schipbreuk.

Zeer zeker gelijkt de pseudo-diphtheriebacterie of de bacterie v. Hofmann Wellenhof morphologisch op de diphtheriebacterie. Ook vertoont zij de eigenaardige ligging in het uitstrijkpraeparaat, maar de verschillen zijn

toch wel van dien aard, dat ze er niet mee behoeft verward te worden.

Marzinowsky zegt dan ook zeer terecht, dat de bacterie v. Hofmann Wellenhof ten onrechte den naam **pseudo**-diphtheriebacterie draagt, omdat zij weinig overeenkomst vertoont met de diphtheriebacterie en er moeilijk mee verwisseld kan worden.

Neisser stelde in 1897 reeds voor den naam pseudodiphtheriebacterie te veranderen in bacterie v. Hofmann Wellenhof.

Nadat ik de biochemische eigenschappen van deze beide organismen bestudeerd heb, zijn er mijns inziens bacteriën, die eerder dan de bacterie v. Hofmann Wellenhof aanspraak zouden kunnen maken op den naam „pseudodiphtheriebacteriën", o.a. Bacterium cutis communis. Dit is een organisme, dat, zooals de naam aanduidt, voorkomt op de huid. Door vriendelijke tusschenkomst van wijlen Professor de Jong kreeg ik dit organisme van het instituut Pasteur, waar het voor een pseudo-diphtheriebacterie werd gehouden. Daar dit binnen 24 uur na Neisser's kleuring de typische metachromatische korreltjes vertoonde en binnen dien tijd bovendien glucose ontleedde, twee eigenschappen, die het met de diphtheriebacterie gemeen heeft, ligt het meer voor de hand, het den naam pseudo-diphtheriebacterie te geven, dan de bacterie v. Hofmann Wellenhof, die binnen dien tijd noch Neisser's kleuring vertoont, noch glucose ontleedt.

De meening, dat de bacterie v. Hofmann Wellenhof een avirulent, atoxisch geworden diphtheriebacterie zou zijn en via de avirulente, daarin zou zijn overgegaan,

heeft men thans algemeen laten varen — immers even goed als de virulentie ten opzichte van caviae onder sommige omstandigheden kan verdwijnen, kan men zich voorstellen, dat er omstandigheden te vinden zijn, waarbij het omgekeerde zou kunnen worden bereikt en deze pogingen hebben tot nu toe schipbreuk geleden. Men is dus weer tot de opvatting van Loeffler en v. Hofmann Wellenhof teruggekeerd.

Wil men de in de neuskeelholte van den mensch voorkomende organismen indeelen, dan lijkt mij de volgende indeeling de eenvoudigste.

a. diphtheriebacteriën, { virulente diphth. bacteriën / avirulente diphth. bacteriën } verschill. toestanden van één organisme

b. diphtheroïden.

Hiertoe behooren alle bacteriën, die op de diphtheriebacterie gelijken en bij oppervlakkige beschouwing aanleiding zouden kunnen geven tot verwarring, maar die zich door enkele biochemische eigenschappen duidelijk differentieeren.

Hiertoe behoort de bacterie v. Hofmann Wellenhof, Bacterium cutis communis en een groot aantal andere bacteriën, die thans niet nader zullen worden aangeduid.

Ter vergelijking met de eigenschappen van de diphtheriebacterie, wil ik hier laten volgen de beschrijving van de morphologische en cultureele eigenschappen van twee pseudo-diphtheriestammen, die ik ter beschikking had en die ik gemakshalve bacterie v. Hofmann Wellenhof BI en BII zal noemen. Daarnaast gebruikte ik nog drie pseudo-diphtheriestammen v. Hofmann Wellen-

hof A, n.l. I_7 en I_8 en v. R. Deze 5 stammen waren afkomstig van het neusslijmvlies van gezonde menschen, en voldeden volkomen aan de beschrijving, die v. Hofmann Wellenhof in 1888 van de pseudo-diphtheriebacterie gegeven heeft. Het zal blijken, dat de eerste zich weer van de laatste differentieeren ten opzichte van enkele voedingsmedia, een mogelijkheid, waarop v. Hofmann Wellenhof zelf reeds in zijn oorspronkelijk stuk gewezen heeft.

BACTERIE v. HOFMANN WELLENHOF B.

Op glycerineserum groeiden deze bacteriën zeer overvloedig; er ontstond naast afzonderlijke witte kolonies, die vochtiger waren dan die der diphtheriebacteriën een aaneengegroeide massa van kolonies.

Uitgewreven in een druppel water op 't voorwerpglas, ontstond een volkomen homogene suspensie.

Gekleurd volgens Neisser, deed zich de pseudo-diphtheriebacterie voor als een staafje, in uiterlijk gelijkend op de diphtheriebacterie, ongeveer 2.4 μ lang, 0,5 tot 1 μ breed. Ze zijn recht, korter, doch forscher en constant van grootte en vorm, zoodat men microscopisch een monotoon beeld aanschouwt. Noch na kleuring volgens Neisser, noch na kleuring volgens Loeffler waren de metachromatische lichaampjes van Babès zichtbaar, hetgeen op zichzelf al een reden is, om deze bacterie niet met de diphtheriebacterie te verwisselen. In oudere culturen traden de donker gekleurde granula weer op. Het spreekt vanzelf, dat 't

in dit geval binnen 18 uur mogelijk was de identiteit van het organisme vast te stellen.

Hoewel in de litteratuur algemeen wordt aangenomen, dat dubbelkleuring ontbreekt bij de pseudo-diphtheriebacterie, is er ook hier weer geen regel zonder uitzondering. Slawijk en Manicatide en anderen maken melding van pseudo-diphtheriebacteriën, die na 1 maal 24 uur dubbelkleuring vertoonen, terwijl aan den anderen kant ook weer gesproken wordt van virulente diphtheriebacteriën, die na 1 maal 24 uur geen korreltjes vertoonden.

Ook Kurth, hoewel voorstander van Neisser's kleuring als differentiaal diagnosticum heeft drie gevallen beschreven, waar de dubbelkleuring bij pathogene diphtheriebacteriën uitbleef.

Aldus sluit de aanwezigheid van metachromatische lichaampjes geen virulentie in. Evenmin sluit de afwezigheid, virulentie uit, zelfs indien men zou vasthouden aan de eigenschap, dat diphtheriebacteriën in tegenstelling met die van v. Hofmann Wellenhof virulent voor caviae zijn.

Volgens von Pesch kunnen alle corynebacteriën onder bepaalde omstandigheden tot volutinevorming gebracht worden en is het verschil slechts quantitatief, niet qualitatief. Hij zegt, dat hij in reincultures met een negatieve kleuring volgens Neisser steeds korreltjes vindt en omgekeerd vindt hij in sterk positieve praeparaten altijd bacteriën, waarbij de metachromatische stof ontbreekt. Dit laatste is zonder eenigen twijfel juist en heb ik bij alle diphtheriestammen waargenomen. Men zou hiervoor de volgende verklaring kunnen geven. Indien deze volutine bij voorkeur gevormd wordt op phosphorverbindingen en

nucleïnezuren bevattende voedingsbodems en wel pas na 10 tot 24 uur, zullen er wel altijd jonge exemplaren bij zijn, waarvoor de tijd te kort was om de volutine op te bouwen. Het omgekeerde heb ik niet kunnen bevestigen; de beide stammen v. Hofmann Wellenhof B vertoonden na 24 uur geen enkele korreling; bovendien heb ik daaraan veel aandacht geschonken, omdat alleen dan de naam „pseudo"-diphtheriebacterie eenige beteekenis zou hebben.

Gelukkig behoort het uitblijven van korreling bij de diphtheriebacterie, hetgeen in de praktijk tot ernstige fouten aanleiding zou kunnen geven, tot een hooge uitzondering en kan men, zooals Golowkew, Jakowlew, Gabritschewsky, Schabad en anderen van meening zijn, de dubbelkleuring op één lijn stellen met 't dierexperiment.

De pseudo-diphtheriebacterie is eveneens Gram-positief en wel is zij Gram vaster dan de diphtheriebacterie. Ze vormt nooit ketens, sporen of kapsels; ook werd nooit eigenbeweging waargenomen. Ze vertoont dezelfde karakteristieke ligging als de diphtheriebacterie.

Deze pseudo-diphtheriebacterie groeit bij voorkeur aëroob, op de gebruikelijke voedingsmedia veel sneller en veel overvloediger dan de diphtheriebacterie.

Op versch gedestilleerd water blijft ze weken lang leven.

Bouillon is na 24 uur sterk getroebeld, terwijl zich een neerslag op den bodem van de buis heeft afgezet. De reactie van den zwak alkalischen bouillon wordt **nooit** zuur zooals Zarniko in 1889 ook reeds meedeelde, integendeel wordt de alkaliciteit vermeerderd.

Wanneer men over schuingestold glycerineserum een

weinig cultuur zig-zagsgewijze afstrijkt, is na één etmaal de oppervlakte gelijkmatig dik bezet en ziet men nagenoeg geen afzonderlijke kolonies. Vergelijkt men dit beeld met dat van de diphtheriebacterie onder dezelfde omstandigheden verkregen, dan ziet men daarbij 't volgende. Onderaan de zigzaglijn vertoonen zich over een kleinen afstand aaneengegroeide kolonies, hoogstens ter breedte van 1 tot 2 mM. Naar boven gaande eindigen deze weldra in afzonderlijke kolonies. In minder gunstige gevallen zijn hier en daar wat kolonies verrezen, wier aantal schaarscher wordt, naarmate men hooger in de buis komt.

Laat men beide cultures nu nog eenige dagen in de broedstoof staan, dan zijn de kolonies van de diphtheriebacterie iets grooter geworden, maar van aaneengroeiing is geen sprake, terwijl de pseudo-diphtheriebacterie een dik slijmerig beslag vertoont, waarvan men moeilijk een bepaalde hoeveelheid kan afenten, omdat het één slijmerige samenhangende massa vormt. Bekijkt men deze cultuur nu nog eens na 2 of 3 weken, na welken tijd de cultuur natuurlijk min of meer uitgedroogd is en daardoor aan slijmerigheid verloren heeft, dan ligt de bacteriënmassa er als een gegolfd huidje, dat men er in zijn geheel kan aflichten, bovenop.

De kleur van dezen voedingsbodem, zoowel als die van de bacteriënlaag, is inmiddels donkerder geworden. Van die kleursverandering is in de litteratuur melding gemaakt door E s c h e r i c h, die spreekt van een donkerbruine tint van de agar bij in donker bewaarde agarculturen, terwijl ook v. H o f m a n n W e l l e n h o f van een grijsbruine kleur van de agar spreekt, een teeken, dat zij die kleursverandering als afwijkend beschouwen. Die kleursveran-

dering zal wel een gevolg zijn van het eiwitsplitsend vermogen van deze bacterie. Falières zegt in zijn proefschrift, dat Gelpke gecoaguleerd eiwit prefereert als middel om de diphtheriebacterie van de bacterie v. Hofmann Wellenhof te onderscheiden, omdat bij de laatste een zalmkleur optreedt. Of hier ook gekleurde eiwitsplitsingsproducten gevormd worden ?

Ook Prochaska zegt van den agarsteekcultuur, waarbij hij voornamelijk oppervlaktegroei waarnam: „Dazu kommt in einigen Fällen die braunrote Verfärbung des Agars in alten Culturen."

Of hij dus ook 2 soorten bacteriën gehad heeft, die beide aan het type, beschreven door v. Hofmann Wellenhof, voldeden, maar waarvan één soort eiwit splitste?

Op de serumplaat ziet men dikke, witte, ronde kolonies, die bij ouder worden gekerfde randen vertoonen.

Op agar groeit zij goed, maar vertoont nooit kolfvorming of vertakkingen. Ook op glycerine-agar groeit zij uitstekend.

In peptonwater groeit zij best, na 24 uur is een sterke troebeling en een neerslag op den bodem ontstaan.

Indol heb ik zelfs na 6 weken met behulp van Ehrlich's reagens niet kunnen vinden, terwijl tusschentijds geregeld op de aanwezigheid ervan werd gereageerd. Wel werd na 6 weken een hooggele verkleuring waargenomen, maar van een roze of roode verkleuring was geen sprake.

De groei van de bacterie v. Hofmann Wellenhof B op melk is een heel bijzondere. Na 1 maal 24 uur is de geïnfecteerde melk uiterlijk niet te onderscheiden van de contrôlebuis, evenals dit 't geval is met de diphtheriebacterie. Na dat tijdperk is de melk dus niet gestremd,

niet van kleur of reuk veranderd, terwijl het organisme er overvloedig in is gegroeid.

Aanvankelijk wordt de melk dus op 't oog niet veranderd, maar na langeren tijd b.v. na 6 à 7 dagen bij 37° C. beginnen kleur, reuk en consistentie te veranderen. Die verandering neemt daarna vrij snel in intensiteit toe om na 5 à 6 weken haar maximum te bereiken. Dan ziet de melk koffiebruin, is zoo slijmerig als kippeneiwit en is min of meer doorschijnend geworden en riekt bovendien zéér onaangenaam.

Van deze geweldige verandering van 't melkeiwit, waarop ik in een afzonderlijk hoofdstuk terugkom, heb ik in de litteratuur niets gevonden, integendeel wordt overal vermeld, dat de melk onveranderd blijft, wat inderdaad de eerste vijf dagen 't geval is.

Hoewel de bacterie v. Hofmann Wellenhof B dus proteolytische fermenten kan afscheiden, is zij niet in staat gelatine tot vervloeiïng te brengen.

Uit:

glucosepeptonlakmoesoplossing,
lactosepeptonlakmoesoplossing,
saccharosepeptonlakmoesoplossing en
mannietpeptonlakmoesoplossing,

wordt na 24 uur geen zuur en geen gas gevormd, ook niet na langeren tijd.

De bacteriën zijn avirulent tegenover caviae.

Deze beide bacteriën v. Hofmann Wellenhof (BI en BII) met haar saprophytisch karakter heb ik 't geheele onderzoek door zuiver kunnen houden, terwijl ik menigen diphtheriestam wegens infectie aan het onderzoek heb moeten onttrekken.

Het is niet onmogelijk, dat ook hier het recht van de sterkste geldt, en dat dit krachtig organisme een toevalligen indringer onmiddellijk onschadelijk maakt.

Deze beide pseudo-diphtheriebacteriën, die identiek zijn met de bacterie v. Hofmann Wellenhof, zoover hij deze in 1888 beschreven heeft, zijn met zekerheid van de diphtheriebacterie te onderscheiden op grond van de onderstaande eigenschappen:

Diphtheriebacterie.	Pseudo-diphtheriebacterie. Bacterie v. Hofmann Wellenhof B.
1e. aanwezigheid van metachromatische korrels na kleuring met Neisser of Loeffler na ± 18 uur bij 36° C.	1e. afwezigheid van metachromatische korrels na kleuring met Neisser of Loeffler na ± 18 uur bij 36° C.
2e. op versch gedestilleerd water verliest zij bij 37° C. binnen 24 uur hare levensvatbaarheid.	2e. op versch gedestilleerd water behoudt zij bij 37° C. weken lang hare levensvatbaarheid.
3e. zuurvorming in glucosepeptonlakmoesoplossing na 1 maal 24 uur bij 37° C.	3e. geen zuurvorming in glucosepeptonlakmoesoplossing na 1 maal 24 uur of langer bij 37° C.
4e. onveranderd uiterlijk en onveranderde reuk van melk na 7 dagen of langer.	4e. sterk veranderd uiterlijk en sterk veranderde reuk van melk na 7 dagen of langer.

5e. weinig abundante groei op de gebruikelijke media.	5e. abundante groei op de gebruikelijke media.
6e. in den regel virulent voor caviae met typisch sectiebeeld.	6e. avirulent voor caviae.
7e. afwisselend v. vorm.	7e. gelijkmatig v. vorm.

De morphologische en cultureele verschillen zijn dus wel van dien aard, dat men op grond hiervan deze onschuldige saprophiet kan scheiden van de diphtheriebacterie.

Het feit, dat geen immuniteit tegen diphtherie verkregen kan worden door middel van anti-pseudo-diphtherieserum en omgekeerd, bewijst wel, dat deze bacteriën niet met elkander verwant zijn, terwijl agglutinatieproeven deze meening nader bevestigen.

Deze bacteriën vertoonen zoo weinig overeenkomst met elkaar, dat het destijds geen gelukkige gedachte geweest is de naam pseudo-diphtheriebacterie aan dit organisme te geven.

BACTERIE VON HOFMANN WELLENHOF A.

I_7, I_8, v. R.

De stammen I_7 en I_8 zijn afkomstig uit 't laboratorium van Neisser „Städt. Hygiën. Universitäts Institut" te Frankfort am Main en werden gezonden als oudere pseudodiphtheriebacteriën.

v. R. isoleerde ik uit een cultuur afkomstig van 't bacteriologisch laboratorium van het Ziekenhuis aan den Coolsingel. Alle drie stammen stemden morphologisch en cultureel overeen met de bacterie v. Hofmann Wellenhof type A. Het waren n.l. staafjes van gelijke grootte, ze vertoonden na 18 uur geen metachromatische korreltjes volgens Neisser of Loeffler; na een tijdsverloop langer dan 24 uur trad wel korreling op, doch niet sterk. Ze waren Gram-positief, hadden geen eigenbeweging, vormden geen sporen of kapsel. Vooral de typische palissadenvormige ligging was aanwezig, weinig v-vormen werden waargenomen.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht.

In een „tube de Veillon" waren slechts in een klein deel van den steek de bacteriën gegroeid, terwijl een sterke oppervlaktegroei werd waargenomen.

Melk werd uiterlijk zelfs na langen tijd niet veranderd.

Neutrale glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur en langer onveranderd gebleven, terwijl geen gasvorming had plaats gevonden.

De bacteriën waren avirulent voor caviae.

LITTERATUUR.

v. Hofmann Wellenhof. Wien. med. Wochenschr. 38-65-108-1888.
Loeffler. C. f. Bact. 2-105-1887.
Marzinowsky. Z. f. Hyg. u. Inf. 73-185-1913.
Slawyk und Matricatide. Z. f. Hyg. u. Inf. 29-181-1898.
Kurth. Z. f. Hyg. u. Inf. 28-409-1898.
v. Pesch. C. f. Bact. 92-27-1924.
Golowkew. Mil. Aertzl. Zeit. 1-1899.
Schabad. Jahrb. f. Kinderh. 54-381-1901.
Zarniko. C. f. Bact. 6-153-177-224-1889.
Escherich. Berl. kl. Wochenschr. 30-492-520-549-1893.
Falières. Thèse. Des granulations polaires du bacille diphthérique. Bordeaux 1901.
Prochaska. Z. f. Hyg. u. Inf. 24-373-1897.
Neumann. Z. f. Hyg. u. Inf. 40-33-1902.

KORT OVERZICHT VAN DE OVERIGE STAMMEN, WAARMEDE HET ONDERZOEK WERD VERRICHT.

Nadat in de voorgaande hoofdstukken de algemeene eigenschappen van de diphtheriebacterie en die der bacterie v. Hofmann Wellenhof A en B volgens eigen waarnemingen werden meegedeeld, volgt hier nog een korte beschrijving van de overige stammen, die bij dat onderzoek werden gebruikt. Zij kunnen ingedeeld worden bij de diphtheroïden of diphtherieachtigen en werden meest toegezonden als pseudo-diphtheriestammen. Allen, die zoo vriendelijk waren, mij een of meer organismen af te staan, dank ik hier ter plaatse nogmaals hartelijk voor hunne bereidwilligheid.

BACTERIUM CUTIS COMMUNIS.

Daar het moeilijk bleek te zijn, zuivere pseudo-diphtheriestammen van andere laboratoria te krijgen, ten einde hare biochemische eigenschappen te kunnen vergelijken met die der bacterie v. Hofmann Wellenhof, was wijlen Professor de Jong destijds zoo vriendelijk uit Parijs mee te brengen een organisme genaamd: Bacterium cutis communis. Deze bacterie werd door de bacteriologen van het Instituut Pasteur voor een pseudo-diphtheriebacterie gehouden.

Van deze bacterie, die weinig overeenkomst bleek te vertoonen met de bacteriën v. Hofmann Wellenhof

A en B, doch eerder dan deze aanleiding zou kunnen geven tot verwarring met de diphteriebacterie, volgt hier een korte beschrijving.

Bacterium cutis communis is een zéér kort, dun, niet of nauwelijks gebogen staafje, dat microscopisch een nietiger indruk maakt dan de diphtheriebacterie en zelfs kleiner is dan de bacterie v. Hofmann Wellenhof A en B.

Na enting op glycerineserum en glycerine-agar is na 24 uur een wit vochtig beslag gevormd, noch gelijkend op 't beeld, dat de diphtheriebacterie, noch op 't beeld, dat de bacterie v. Hofmann Wellenhof A of B ons te aanschouwen geeft.

De groei is n.l. zoo overvloedig en sappig, dat na 24 uur geen enkele afzonderlijke kolonie meer wordt waargenomen.

Om de eigenschappen van Bacterium cutis communis te kunnen vergelijken met die der vorige organismen, werd ook hier steeds afgeënt van een 1 maal 24 uur oude glycerineserumcultuur, terwijl op glycerine-agar de cultuur werd aangehouden.

Gekleurd volgens Neisser en Loeffler zijn de metachromatische lichaampjes na 18 uur aanwezig; voornamelijk eindstandig; de bacterie is Gram-positief, vertoont geen eigen beweging, sporen of kapsel, terwijl in de microscopische praeparaatjes de meer besproken typische ligging wordt waargenomen.

Morphologisch zou Bacterium cutis communis dus alleen door 't verschil in **grootte** van de diphtheriebacterie zijn te onderscheiden.

Het verschil in groei op glycerine-agar of glycerineserum

buiten beschouwing gelaten — immers in gemengde culturen zal dit verschil minder op den voorgrond treden — zal dit organisme mijns inziens eerder aanleiding kunnen geven tot 't stellen van een verkeerde diagnose, dan dat dit 't geval is met de beschreven bacteriën v. Hofmann Wellenhof A en B. 't Feit, dat het na 1 maal 24 uur de metachromatische korreling en de typische ligging vertoont, bovendien Gram-positief is, doet iedere bacterioloog neigen tot diphtherie te besluiten, waarbij hij mogelijk de opmerking zal maken, dat de staafjes wat klein zijn. Daar de afmetingen ten opzichte van de diphtheriebacterie in de juiste verhouding zijn afgenomen, zou men het een miniatuur diphtheriebacterie kunnen noemen.

Vergissing met deze bacterie is intusschen vrijwel uitgesloten, want zij komt, zooals de naam aanduidt, voor op de huid en wordt, voor zoover mij bekend, niet naast de diphtheriebacterie op 't neusslijmvlies gevonden.

Bacterium cutis communis groeit aëroob en zéér overvloedig op de vroeger beschreven voedingsbodems.

Bouillon is na 24 uur sterk troebel, terwijl zich een praecipitaat op den bodem van de buis heeft afgezet. Op glycerine-agar groeit het organisme buitengemeen snel en men kan van het egaal witte, vochtige beslag, in tegenstelling met de bacterie v. Hofmann Wellenhof B, elke willekeurige hoeveelheid afenten.

Indol werd in peptonwater, waarin het ook weer krachtig groeit, na 1, resp. 3, 7, 14, 21, 28 dagen niet geconstateerd.

Het uiterlijk en de reuk van melk bleven onveranderd en de melk was zelfs na 6 weken niet van de contrôlebuis

te onderscheiden. Dat het er wel degelijk op groeide, bleek na overenten op glycerine-agar; na 24 uur ontstond een dik overvloedig beslag.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht.

Glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur rood gekleurd, evenals de saccharosepeptonlakmoesoplossing.

Lactose-, maltose- en mannietpeptonlakmoesoplossing daarentegen hadden hare neutrale tint behouden.

In alle 4 oplossingen was het organisme goed gegroeid, de vloeistof was troebel, een neerslag lag op den bodem. Gasontwikkeling had nergens plaats gehad.

Hieruit blijkt bovendien, dat de ontleding van glucose door deze bacterie een reden te meer zou zijn tot gelijkstelling met de diphtheriebacterie.

Inmiddels zal een gelijktijdige enting op saccharose-peptonlakmoesoplossing het raadsel oplossen en diphtherie ten eenenmale uitsluiten, daar eerstgenoemd organisme uit saccharose **wel**, de diphtheriebacterie uit saccharose **nooit** zuur vormt, terwijl de bacteriën v. Hofmann Wellenhof A en B noch glucose, noch saccharose aantasten.

De vitaliteit op glycerine-agar gaat vrij snel verloren; het bleek mij noodig het tenminste éénmaal in de 10 dagen, bij voorkeur zelfs eens per week, over te enten; op vloeibare media behield het organisme zijn levensvatbaarheid veel langer. De beide andere bacteriesoorten behouden op glycerine-agar hunne levensvatbaarheid eveneens veel langer.

Ten slotte bleek Bacterium cutis communis niet pathogeen voor caviae. Men zal moeten toegeven, dat Bacterium cutis communis, eerder

dan de bacterie v. Hofmann Wellenhof aanspraak zou mogen maken op den naam „pseudo-diphtheriebacterie", indien men de eigenschappen met elkander vergelijkt.

Hoewel ik dit organisme niet onder den naam Bacterium cutis communis in de handboeken gevonden heb, vermoed ik, dat het identisch is met de paradiphtheriebacterie van Lubinski.

Lubinski vond bij diphtherische wonden twee soorten bacteriën, n.l. de echte diphtheriebacterie en een diphtheroïde, die hij paradiphtheriebacterie noemde. Deze paradiphtheriebacterie is morphologisch volgens zijn beschrijving korter en iets plomper dan de diphtheriebacterie.

Zij is Gram-positief, vertoont volgens Neisser en Loeffler gekleurd, voornamelijk eindstandige korreling. Ook vertoont zij de typische groepeering, tast saccharose aan onder zuurvorming en is apathogeen tegenover caviae.

Het is zeker jammer, dat Lubinski daarvoor den naam paradiphtheriebacterie gekozen heeft en terecht stelt Rohde dan ook voor deze bacterie den naam Bacterius dermophilus te geven, daar hij deze identiek houdt met staafjes op huid en slijmvlies gevonden.

Radice houdt deze paradiphtheriebacteriën voor veranderde diphtheriebacteriën; een omzetting van eerstgenoemde in diphtheriebacteriën heeft hij echter nooit waargenomen.

Typisch voor Bacterium cutis communis is wel, dat het saccharose na 1 maal 24 uur wel splitst, maltose na 1 maal 24 uur niet.

Dit organisme, dat dus verward zou kunnen worden met

de diphtheriebacterie, kan op grond van de volgende eigenschappen hiervan worden onderscheiden:

1e. het wordt hoofdzakelijk op de huid gevonden.
2e. het is kleiner van afmetingen.
3e. het groeit intensiever op alle voedingsmedia.
4e. het vormt zuur uit saccharosepeptonlakmoesoplossing.
5e. het is avirulent voor caviae.

STAMMEN X EN Y.

Deze twee stammen waren afkomstig uit de keel van kinderen uit Weenen. Op de glycerineserumplaat, waarop de keelwatjes waren afgestreken, waren na 18 uur een aantal verdachte kolonies te voorschijn gekomen, die gekleurd volgens Neisser en Loeffler, de metachromatische korreltjes vertoonden en die bovendien Gram-positief bleken te zijn.

De stammen, die ik gemakshalve X en Y zal noemen, werden in reincultuur gebracht en ingespoten bij caviae, genummerd 1 en 2. Cavia 1 ingespoten met stam X, vertoonde niets bijzonders, terwijl cavia 2, die ingespoten was met stam Y, eerst na 6 dagen een zwak infiltraat vertoonde; overigens is 't dier ook gezond gebleven.

Daar het dierexperiment bij beide stammen virulentie uitgesloten had, was 't dus nu de vraag of men hier te doen had met een avirulent geworden diphtheriebacterie, of wel met een bacterie v. Hofmann Wellenhof.

Ten einde dit uit te maken werden beide organismen van een 24 uur oude glycerineserumcultuur overgeënt op

neutrale glucosepeptonlakmoesoplossing en op glucose-glycerineserumplaten, die neutraal getint waren ten opzichte van lakmoesoplossing.

De glucosepeptonlakmoesoplossing was na 18 uur door stam X onveranderd gebleven, terwijl stam Y hierin zuur gevormd had. Stam X had de kleur der glucoselakmoesserumplaat eveneens neutraal gelaten; er waren witte kolonies op een paarsblauwen grond te voorschijn gekomen, terwijl stam Y de plaat lichtrood had getint.

Deze proeven in duplo ingezet, werden gedurende 7 dagen gecontroleerd, waarbij geen verandering werd waargenomen.

Ten slotte werd in een buis volgens V e i l l o n een 10 tot 12 cm. diepe agarsteek gemaakt. Deze glucoseagarvoedingsbodem zou in staat zijn de diphtheroïden te onderscheiden van de diphtheriebacterie. Laatstgenoemde is n.l. facultatief anaëroob, terwijl de diphtheroïden veelal streng aëroob zijn. Stam X was na deze enting uitsluitend aan de oppervlakte gegroeid, was dus aëroob, terwijl stam Y tevens dieptegroei vertoonde.

Beide stammen geënt op afgeroomde melk lieten de melk uiterlijk gedurende langen tijd onveranderd en misten het vermogen het eiwit aan te tasten.

Men zou stam Y dus een avirulent geworden diphtheriestam kunnen noemen, terwijl stam X aanspraak maakt op den naam bacterie v. H o f m a n n W e l l e n h o f A.

STAM KRALL.

Deze bacterie, afkomstig van het Instituut K r a l l te

Weenen, was gezonden als een pseudo-diphtheriebacterie. Het waren plompe staafjes, ongelijk en onregelmatig van vorm, die na 24 uur onregelmatige, grove poolkorreling vertoonden. Ze gaven weinig van de typische ligging te zien. Na een week waren enorme poolkorrels en kolven opgetreden. Bovendien groeide de bacterie met een vuilgeel dik beslag op serum.

In een „tube de Veillon" was zij in 24 uur tot onderin den steek doorgegroeid en gedroeg zich ook in dit opzicht weinig als een bacterie v. Hofmann Wellenhof.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht — geen eigenbeweging, sporen of kapsel.

Melk werd gestremd, de kleur werd niet veranderd, ook verspreidde ze naast de zwak zure, geen bijzondere reuk, ook niet na langeren tijd.

Neutraal glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur rood gekleurd, terwijl geen gas gevormd was.

Het organisme was avirulent tegenover caviae.

Op grond van bovengenoemde cultureele en morphologische eigenschappen is identificatie met de bacterie v. Hofmann Wellenhof uitgesloten en heeft men hier een diphtheroïde voor zich.

STAM LISTER.

Uit het Lister-Institute te Londen werd dit organisme als pseudo-diphtheriestam op aanvrage toegezonden.

Deze bacterie groeide zeer slecht en vertoonde na 24 uur een nauwelijks zichtbaar beslag. Zij was een korte, dikke

staaf, nagenoeg eivormig; gaf dubbelkleuring, was Gram-positief, maar vertoonde weinig de typische ligging. In de „tube de Veillon" was zij langs den geheelen steek gegroeid.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht, eigenbeweging, sporen en kapsel ontbraken.

Melk werd gestremd — geen afwijkende reuk of kleur werd na langeren tijd waargenomen.

Glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur rood.

Zij was avirulent tegenover caviae.

Ook dit organisme zou ik cultureel noch morphologisch voor een bacterie v. Hofmann Wellenhof houden en maakt evenals het vorige aanspraak op den naam diphtheroïde.

EEN VIJFTAL DIPHTHERIE-ACHTIGEN IN MOND EN KEELMEMBRANEN VAN DE KIP.

No. 1 werd geïsoleerd uit de keelmembraan van een aan vogeldiphtherie gestorven kip. Het was een kort staafje, gelijkend op de diphtheriebacterie, dat na 24 uur nagenoeg geen metachromatische korreltjes vertoonde. Na langeren tijd werd sterke korreling waargenomen, die na 3 weken zoo was toe genomen, dat zij na kleuring met methyleenblauw zichtbaar was. De bacterie was Gram-positief en wel Gram-vaster dan de diphtheriebacterie.

De bacteriën waren over 't algemeen even groot, en vertoonden de typische ligging. Ze groeiden facultatief anaëroob. Zij misten eigenbeweging, kapsel en waren asporogeen.

Melk werd ook na langen tijd niet van uiterlijk veranderd, een weinig geel depôt bevond zich op den bodem, zij was niet gestremd, niet gekleurd en riekte normaal.

Neutrale glucoselakmoespeptonoplossing was na 24 uur zwak rood gekleurd, terwijl geen gas gevormd was. Gelatine bleef onveranderd.

De kolonies lieten zich met water homogeen verdeelen.

De bacterie was avirulent voor caviae.

No. 2 was afkomstig uit de normale keel van een gezonde kip in een met humane diphtherie besmet milieu. Na 24 uur vertoonden de bacteriën, die kleiner waren dan No. 1, nagenoeg geen metachromatische lichaampjes. Zij waren sterk Gram-positief en vertoonden de karakteristieke ligging.

Zij groeiden facultatief anaëroob, de kolonies lieten zich met water homogeen verdeelen. Dit organisme had bovendien de eigenschap citroengeel pigment te vormen en groeide iets vochtiger dan de andere drie. Geen eigenbeweging, kapsel of sporen werden waargenomen.

Neutrale glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur zwak rood, geen gas was gevormd. Melk bleef uiterlijk ook na langen tijd niet te onderscheiden van de contrôlebuis.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht.

De bacterie was avirulent voor caviae.

No. 3 was afkomstig uit een droog diphtheritisch kaakproces van een kip, die overigens volkomen gezond was en die leefde in een met humane diphtherie besmette omgeving.

Zij groeide facultatief anaëroob, de kolonies lieten zich

met water niet homogeen verdeelen, er waren korreltjes in, maar gaven evenmin het beeld van positieve agglutinatie.

Op serum groeide zij evenals op andere voedingsbodems zeer welig, een aaneengegroeide massa vormend, waarop de gewelfde kolonies een weinig bovenuit kwamen. Na 24 uur werd sterke poolkorreling waargenomen, en deden zij zich kennen als polymorphe staafjes, die sterk Gram-positief waren. Van de typische groepeering trad vooral de v-vorm op den voorgrond.

Bij ouder worden heeft deze bacterie de eigenschap een weinig lichtgeel pigment te vormen.

Eigenbeweging, een kapsel of sporen werden niet geconstateerd.

In vloeibare voedingsmedia werd na 24 uur steeds een oppervlaktevlies gevormd.

Neutrale glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur sterk rood gekleurd, terwijl geen gas was gevormd.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht.

Melk werd ook na langen tijd niet veranderd.

Zij was avirulent voor caviae.

Volgens hare morphologische en cultureele eigenschappen zou zij aanspraak kunnen maken op den naam van avirulente diphtheriebacterie.

No. 4 werd gewonnen uit de keel van een kip, die submuqueus werd geïnfecteerd met een sterk toxische humane diphtheriebacterie en die dientengevolge na 2 dagen stierf. Op de entplaatsen hadden zich diphtheritische membranen gevormd.

Ook deze bacteriën groeiden facultatief anaëroob. Ze vertoonden weinig de metachromatische korreling, waren sterk Gram-positief en vertoonden weinig de typische groepeering.

Ze hadden geen eigenbeweging, geen kapsel en waren geen sporenvormers.

Neutrale glucosepeptonlakmoesoplossing was na 24 uur zeer zwak rood gekleurd. Geen gas was gevormd.

Gelatine werd niet tot vervloeiing gebracht.

Melk werd uiterlijk ook na langen tijd onveranderd gelaten.

Dit organisme was avirulent voor caviae.

No. 5. Een diphtheriebacterie, geïsoleerd uit de keel van een ter onderzoek aangeboden en gestorven kip, met een grijswitte diphtheriemembraan op het gehemelte.

Deze bacterie gedroeg zich in alle opzichten als een diphtheriebacterie, was een Gram-positief staafje, dat Neisser's kleuring en kolfvorming vertoonde.

Zij was zeer virulent; een cavia geënt met 0,75 cm^3 van een 24 uur oude bouilloncultuur was na 2 dagen dood. Bij de sectie werd het typische beeld van diphtherie waargenomen. Op de plaats van injectie onder de borsthuid was een gelatineus oedeem, terwijl hier en daar verbloeding op 't punt was op te treden. In borst- en buikholte was veel vocht aanwezig. De bijnieren waren zwartrood en gezwollen aan beide zijden.

Ten slotte rest mij nog de volgende virulente diphtheriestammen op te noemen:

844, 473, Poels, 1314, 1825, R I en R II, C. L. II, Parijs I. Parijs II, Amsterdam, Ba, Sm, Diphth. 2, Diphth. 4, Diphth. 5, Amerika I, Amerika II, Holland, 334.

Diphth. 2 en Diphth. 4 bleken zwak virulent voor caviae.

EENIGE BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE DIPHTHERIEBACTERIE, DE BACTERIE v. HOFMANN WELLENHOF A EN B EN VAN EENIGE ANDERE DIPHTHEROIDEN.

GEDESTILLEERD WATER.

Als allereenvoudigst medium voor deze verschillende organismen werd gekozen: gesteriliseerd, versch gedestilleerd water.

Een normaal oogje van de in de volgende tabel voorkomende bacteriën werd van een 24 uur oude glycerineserumcultuur gebracht in een buis met 10 cm^3 steriel gedestilleerd water.

Deze buizen werden in de broedstoof geplaatst en na 24 uur werd met behulp van een steriele pipet 1 cm^3 van het geïnfecteerde water overgebracht op een steriele glycerineserumplaat, die vervolgens bij 37° C. werd weggezet, om na verloop van een bepaalden tijd te controleeren òf en hoeveel kolonies er waren opgekomen.

De inhoud der buizen, geënt met de diphtheriestammen, en de diphtheroïden, was over 't algemeen slecht aangeslagen; het water geënt met bacterie v. Hofmann Wellenhof B was troebel, dat, met de bacterie v. Hofmann Wellenhof A, nagenoeg helder. Na 2 maal 24 uur bij 37° C. werd wederom 1 cm^3 water met een pipet overgebracht op een serumplaat en zoo vervolgens verder nagegaan.

Zooals uit bijgaande tabel blijkt, hebben de diphtherie-

stammen hunne levensvatbaarheid in den regel binnen 24 uur reeds verloren. Ook die v. Hofmann Wellenhof A en overige diphtheroïden hielden 't niet veel langer uit.

Anders is het daarentegen met de bacterie v. Hofmann Wellenhof B gesteld. Na 24 uur waren er verscheidene kolonies opgekomen; 10 dagen achtereen werd iederen dag 1 cm^3 water overgebracht op glycerineserum. Den 10en dag waren er nog verschillende kolonies opgekomen, die geïdentificeerd werden als reinkolonies van den geënten stam.

Het water zag troebel, in tegenstelling met dat, waarin de andere organismen waren geënt.

Deze proef werd nog tweemaal bevestigd; speciaal met de diphtheriestammen en met de stammen v. Hofmann Wellenhof B. Beide keeren hadden de eerste binnen 24 uur hunne levensvatbaarheid verloren; de beide andere stammen, nu op een grootere hoeveelheid water geënt en op geregelde tijden overgebracht op serum, gaven daarentegen zelfs na 4 maanden nog kolonies, die zuiver bleken en de typische eigenschappen van de oorspronkelijke stammen bleken te bezitten. Deze bacteriën hebben dus een uitgesproken saprophytisch karakter.

Steriel gedestilleerd water zou dus zeker in aanmerking komen om de bacterie v. Hofmann Wellenhof B, van die van A, van de overige diphtheroïden en van de diphtheriebacterie te onderscheiden.

Over 't algemeen is mij gebleken, dat de diphtheriebacterie zeer kieskeurig is. Men moet haar, wil zij behoorlijk groeien, een voedingsbodem geven van vrij gecompliceerde samenstelling.

Bij de bestudeering van de omzetting van de meerwaardige alcoholen, koolhydraten en enkele andere chemische stoffen en bij de bestudeering van de indolvorming heb ik in de eerste plaats getracht zeer eenvoudige voedingsmilieu's te maken, om daardoor op eenvoudige wijze en met meer zekerheid de omzettingsproducten te kunnen aantoonen; doch deze bleken onbruikbaar, omdat ze zich op een dergelijken ongunstigen voedingsbodem niet ontwikkelden, zoodat ik steeds mijn toevlucht heb moeten nemen tot toevoeging van eenig pepton.

In glycerinewater bijv., bestaande uit 0.5 % glycerine en 0.5 % chloretum natricum, waren de bacteriën binnen 6 dagen vernietigd. Tusschentijds werd niet gecontroleerd, maar de heldere vloeistof bewees wel, dat zij niet of zeer schaars gegroeid waren.

Het is dus niet te verwonderen, dat zij het in een armoedig milieu als gedestilleerd water zeer kort zullen uithouden.

d'Espine en Marignac hebben waargenomen, dat de diphtheriebacterie binnen 24 uur te gronde gaat; op sterk verontreinigd water zou de levensduur ongeveer 6 dagen zijn.

Démétriades daarentegen vond uit proefnemingen, dat zij pas na 21 dagen dood was, terwijl Seiler en de Stoutz haar niet minder dan 8 maanden in drinkwater in leven konden houden, waarna ze zelfs haar virulentie niet had ingeboet.

Van 't gedrag van de bacterie v. Hofmann Wellenhof ten opzichte van water heb ik geen opgaven kunnen vinden.

GEDESTILLEERD WATER.

	1 X 24 uur	2 X 24 uur	3 X 24 uur	4 X 24 uur	5 X 24 uur	1 week	2 weken	1 maand	2 maanden	3 maanden	4 maanden
Blanco	—	—	—	—							
473	—	—	—	—							
844	—	—	—	—							
R I	—	—	—	—							
R II	—	—	—	—							
Poels	—	—	—	—							
1314	+	+	—	—							
1825	+	—	—	—							
Parijs I	—	—	—	—							
Parijs II	—	—	—	—							
C. L. II.	—	—	—	—							
Holland	—	—	—	—							
Amerika I	—	—	—	—							
Diphth. 2	—	—	—	—							
Diphth. 4	—	—	—	—							
B. v. H.W. B I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. v. H.W. B II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I_7	—	—	—	—							
I_8	—	—	—	—							
Krall	—	—	—	—							
Lister	+	—	—	—							
No. 1	+	+	—	—							
No. 2	+	+	+	—							
No. 3	+	+	—	—							
No. 4	—	—	—	—							

STIKSTOFHOUDENDE MEDIA.

UREUM.

Omdat bij het voorloopig onderzoek gebleken was, dat de bacterie v. Hofmann Wellenhof B 't melkeiwit ontleedde, dus stikstofhoudende verbindingen aantastte, werd als eenvoudigste stikstofbron gekozen: **ureum.**

Een aantal diphtheriestammen, de beide bacteriën v. Hofmann Wellenhof A en B en enkele andere diphtheroïden werden geënt op een voedingsbodem, die de volgende samenstelling had:

0,500 g ureum
0,250 g pepton
0,250 g natriumchloride tot
100 cm^3 met gedestilleerd water.

Deze vloeistof werd op de gewone wijze gesteriliseerd en vervolgens 10 cm^3 hiervan in steriele buizen gepipetteerd en wederom gesteriliseerd.

Van de in de volgende tabel voorkomende stammen werd een normaal oogje materiaal geënt en alles naast eenige contrôlebuizen in de broedstoof gezet. De bacteriën waren na 6 weken in alle buizen goed gegroeid, bovendien werden de culturen toen, om zeker te zijn, dat geen infectie had plaats gehad, op zuiverheid gecontroleerd.

De inhoud der buizen werd quantitatief overgebracht in maatkolven en in een bepaalde hoeveelheid, overeenkomende met 2 cm^3 oorspronkelijke vloeistof, het ureumgehalte bepaald in den ureometer van Yvon, waarbij 't ureum door natriumhypobromiet geoxydeerd werd tot N_2, CO_2 en H_2O.

$$CO(NH_2)_2 + 3\,NaBrO \rightarrow 3\,NaBr + N_2 + CO_2 + 2H_2O$$

Per mol. ureum ontstaat dus bij 0° C. en 760 m.M. druk 22.35 L. stikstof.

Uit het overzicht blijkt, dat de diphtheriebacterie, de bacterie v. Hofmann Wellenhof A en B, Bacterium cutis communis evenals de meeste diphtheroïden ureum **niet** aantasten. De vermindering in ureumgehalte door de bacterie v. Hofmann Wellenhof mag van geen beteekenis worden genoemd. Alleen de diphtheroïden Krall en No. 2, welke proeven nog eens herhaald en daardoor bevestigd werden, maakten hierop een uitzondering.

Uit berekening volgt intusschen, dat de gevonden waarde van de blanco-oplossingen iets boven de theoretische waarde ligt, wat waarschijnlijk daaraan te wijten is, dat de peptonoplossing een verbinding bevat, die met hypobromiet ook eenig stikstof levert.

Een peptonoplossing zonder ureum, op dezelfde manier met hypobromiet behandeld, deed inderdaad een weinig stikstof te veel vinden.

UREUMPEPTONOPLOSSING.

	In 2 cm^3 oorspr. vloeistof	Berekende hoeveelheid ureum per 10 cm^3	Theoretische hoeveelheid ureum 50 00 mg. per 10 cm^3
Blanco . . .	4,1 cm^3 N_2	52,11 mg. ureum	
473	4,1 „ „	52,11 „ „	
844	4,1 „ „	52,11 „ „	
Parijs II . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
C. L. II . . .	4,05 „ „	51,44 „ „	
Poels . . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
Holland . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
Amerika . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
Diphth. 4 . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
B. v. H.W. B I	3,55 „ „	45,10 „ „	
B. v. H.W. B II	3,55 „ „	45,10 „ „	
I_7	4,1 „ „	52,11 „ „	
I_8	4,05 „ „	51,44 „ „	
Krall . . .	2,7 „ „	34,29 „ „	
Lister . . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
No. 1 . . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
No. 2 . . .	0,75 „ „	9,53 „ „	
No. 3 . . .	4,1 „ „	52,11 „ „	
No. 4 . . .	4,0 „ „	50,76 „ „	
B. cutis comm.	4,05 „ „	51,44 „ „	

ONTLEDING VAN NITRAAT.

Een aantal diphtheriestammen, de bacteriën v. Hofmann Wellenhof en eenige andere diphtheroïden werden geënt op een voedingsbodem bestaande uit peptonwater, waaraan 1 % kaliumnitraat was toegevoegd.

Steriele, van gistbuisjes voorziene buizen werden met 10 cm^3 van deze vloeistof gevuld en opnieuw gesteriliseerd.

Na 24 uur werd toegevoegd een mespunt van het reagens van Griess-Romijn, bestaande uit een mengsel van 1 deel naphthylamine, 10 dln. sulfanilzuur en 89 dln. wijnsteenzuur. Bij aanwezigheid van nitriet treedt een roodkleuring op.

Alle diphtheriestammen hadden na 24 uur min of meer nitriet gevormd en vertoonden duidelijke roodkleuring met het reagens van Griess-Romijn. Ook de diphtheroiden hadden nitriet gevormd, uitgezonderd bacterie v. Hofmann Wellenhof B en No. 3, zoodat eerstgenoemd organisme zich ook ten opzichte van dezen voedingsbodem afwijkend gedroeg.

Gas werd nooit gevormd.

De gevoeligheid van deze nitrietreactie in aanmerking genomen, zou men hoogstens bij een negatieven uitslag, diphtherie mogen uitsluiten. Overigens heeft zij niet veel waarde.

Van enkele oplossingen werd 't nitriet quantitatief bepaald met behulp van kaliumpermanganaat.

Dat er evenwel meestentijds slechts sporen nitriet gevormd werden, bleek wel hieruit, dat de onderzochte, met bacteriën geënte kaliumnitraatpeptonoplossingen, practisch dezelfde uitkomst gaven als de blanco proef.

1 % NITRAAT PEPTONWATER.

	Nitriet 1 X 24 uur.	Nitriet 2 X 24 uur.	Nitriet 3 X 24 uur.	Nitriet 4 X 24 uur	Nitriet 5 X 24 uur.	Nitriet 6 X 24 uur.	Nitriet 7 X 24 uur	Nitriet 14 X 24 uur.	Gas
Blanco . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
473	+	+	+	+	+	+	+	+	—
844	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Poels . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
C. L. II	+	+	+	+	+	+	+	+	—
1825 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
1314 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
X	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Y	+	+	+	+	+	+	+	+	—
B. v. H.W. B I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. v. H.W. B II	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_7	+	+	+	+	+	+	+	+	—
I_8	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Krall . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Lister . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
No. 1 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
No. 2 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—
No. 3 . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 4 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	—

MELK.

Daar bij het vooronderzoek bij de bestudeering van de cultuureigenschappen gebleken was, dat de bacterie v. Hofmann Wellenhof B in tegenstelling met de diphtheriebacterie en andere diphtheroïden in staat bleek melk na verloop van 14 dagen geheel van uiterlijk te doen veranderen, besloot ik een nader onderzoek betreffende die omzetting in te stellen.

Slechts weinig onderzoekers hebben zich, voor zoover mij bekend is, bezig gehouden met de omzetting der bestanddeelen van de melk door de diphtherie- of pseudodiphtheriebacterie. Veelal wordt melk genoemd als een geschikte voedingsbodem voor 't eerstgenoemde organisme en als zoodanig dus als een bron van infectie.

Schottelius vermeldt, dat de diphtheriebacterie op steriel opgevangen rauwe melk veel beter groeit dan op gesteriliseerde melk. Hij wijt dat aan de verhooging van den zuurgraad van de melk door sterilisatie, hetgeen een remmenden invloed zou uitoefenen op den bacteriëngroei.

Feinberg heeft in 1897 de stofwisselingsproducten nagegaan, die de diphtheriebacterie in melk teweegbrengt en wel speciaal die van de melksuiker en die der eiwitten.

Hij komt tot de conclusie, dat dit organisme in steriele melk 't koolhydraat ontleedt, onder vorming van alcohol, aldehyde en vluchtige zuren.

Wat de niet vluchtige zuren betreft, vindt hij wellicht sporen melkzuur, want het is hem niet gelukt om 't zinkzout te bereiden en bovendien was de reactie van Uffelmann twijfelachtig positief.

Barnsteenzuur kon niet worden aangetoond.

Alcohol toonde hij aan als jodoform; aldehyde volgens de reactie van L e g a l.

Wat nu het aantoonen van alcohol betreft met behulp van de jodoformreactie moet men bedenken, dat zij geenszins specifiek is en door een reeks van lichamen gegeven wordt. Steriele afgeroomde melk, gedestilleerd, gaf een vloeistof, die een positieve jodoformreactie (reuk) en positieve aldehyde-reactie gaf (T o l l e n s). Deze jodoformreactie zou even goed van 't aldehyde of van sporen melkzuur afkomstig kunnen zijn. Het lijkt mij dus wel wat onzeker, de koolhydraatontleding van melk te baseeren op genoemde reacties, terwijl barnsteenzuur niet en melkzuur ook niet positief werd aangetoond.

Uit latere onderzoekingen van de koolhydraten door de diphtheriebacterie is gebleken, dat lactose naast de stikstofbron pepton, zelfs na maanden **niet** wordt aangetast, zoodat genoemde producten wel niet van lactosegisting afkomstig zullen zijn.

In de tweede plaats hebben de onderzoekingen van F e i n b e r g aan 't licht gebracht, dat melkeiwit door de diphtheriebacterie niet wordt aangetast.

In 1914 hebben K e n d a l l - D a y en W a l k e r zich eveneens met de omzettingen van de melk door de diphtheriebacterie beziggehouden en bevestigd, dat die bacterie slechts zeer weinig veranderingen in de eiwitstoffen teweeg brengt. Zij bepaalden o.a. de hoeveelheid ammonia en vonden in 100 cm^3 na 14 dagen eene hoeveelheid van 3,5 mgr.

Ook vonden zij, hoewel weinig, een verhoogd zuurgetal in de melk.

Zij schrijven deze verhooging van zuurgetal toe aan een

splitsing van lichamen van dextrose-achtigen aard, die normaal in de melk zouden voorkomen.

Of deze verhoogde zuurgraad afkomstig is van zure phosphaten, of afbraak van caseïne of van melkvet, is niet uitgemaakt. Alleen zeker is het, dat hij niet afkomstig is van de melksuiker, omdat deze niet wordt ontleed.

De stijging van den zuurgraad, hoewel regelmatig waargenomen, is trouwens zoo gering, dat dit moeilijk uit te maken is.

Zij komen dan ook tot de conclusie, dat de diphtheriebacterie geen zichtbare verandering in de melk teweegbrengt; zelfs niet na drie weken, en vinden de inwendige veranderingen zoo gering, dat zij met chemische middelen nauwelijks zijn aan te toonen.

Van de intensieve ontleding van 't melkeiwit door de bacterie v. Hofmann Wellenhof B, heb ik geen litteratuuropgave gevonden. Toch blijkt uit het verschil in gedrag ten opzichte van melk, dat deze voedingsbodem als differentieel diagnotisch hulpmiddel van belang zou kunnen zijn om deze bacterie te scheiden van de diphtheriebacterie en de overige diphtheroïden.

Volledigheidshalve wordt hier nog even in 't kort meegedeeld, wat met 't bloote oog aan de melkculturen, geënt met de bacterie v. Hofmann Wellenhof B, werd waargenomen.

De eerste vier dagen zag de melk er volkomen normaal uit en er was uiterlijk geen verschil op te merken met de contrôlebuis. Na den 5den dag evenwel trad er verandering op: de kleur werd iets afwijkend van de niet geënte buis en had dan de kleur van hooggesteriliseerde melk. Dat verschil in kleur nam dagelijks toe tot deze na verloop van

14 dagen rosebruin geworden was. De melk was dan niet gestremd, maar verspreidde een onaangename reuk, die reeds bij 't openen van de broedstoof waarneembaar was. Intusschen nam de kleur voortdurend in intensiteit toe, totdat zij na een maand koffie- tot chocoladebruin geworden was, terwijl de melk zeer onaangenaam riekte (rottingslucht). Ook de consistentie van de melk was veranderd. De viscositeit was sterk toegenomen, er waren slijmerige slieren in, zooals men die bij kippeneiwit vindt; bovendien was zij meer doorschijnend geworden. Ook de reactie der melk was veranderd; ten opzichte van lakmoes had zij een uitgesproken alkalisch karakter. Ammoniak werd ontwikkeld, dat oppervlakkig aangetoond werd door de volgende reacties:

1e vochtig rood lakmoespapier werd blauw gekleurd;
2e nevelvorming trad op, als een met zoutzuur of azijnzuur bevochtigde staaf boven de kolf werd gehouden;
3e een druppel Nessler's reagens, aan een staaf boven de kolf gehouden, werd bruin gekleurd;
4e calomel werd zwart gekleurd.

Bij onderzoek bleek de cultuur zuiver en de bacterie identisch met die van v. Hofmann Wellenhof B, zoodat deze geweldige proteolyse niet tengevolge van een infectie had plaats gehad.

Het is een bekend feit, dat bacteriën fermenten kunnen vormen en afscheiden. Zoo kunnen ze proteasen vormen, waarmee ze eiwitten; carbohydrasen, waarmee ze koolhydraten, en lipasen, waarmee ze vetten en aanverwante lichamen kunnen splitsen.

Door vorming van deze fermenten zijn ze in staat niet of moeilijk diffundeerbaar materiaal te ontleden en in dif-

fundeerbaren vorm om te zetten, om aldus hunne voedselvoorziening te regelen.

De bacterie v. H o f m a n n W e l l e n h o f B blijkt dus in staat proteolytische fermenten te vormen en af te scheiden, die ontledend op 't melkeiwit werken.

Uit het feit, dat de bacterie, zooals blijken zal, niet terstond het eiwit aangrijpt, maar ongeveer 5 dagen na de enting, zou men kunnen opmaken, dat de proteasen afkomstig zijn uit de afgestorven bacteriën.

Voor het quantitatieve onderzoek werd in plaats van volle melk, afgeroomde melk gebruikt.

Wanneer men in volle melk ent, laat men de bacterie feitelijk min of meer onder anaërobe omstandigheden groeien, daar de gevormde roomlaag de lucht afsluit. Hoewel in volle melk eveneens ontleding van 't eiwit plaats had, was deze toch in denzelfden tijd veel minder dan in ontroomde melk.

De verandering in kleur bij de centrifugemelk was veel grooter, zoodat de ontwikkelingsvoorwaarden hierin voor deze bacterie gunstiger zijn, dan in volle melk.

De melk werd gesteriliseerd, hetzij 20 minuten op 115° C. of drie opeenvolgende dagen gedurende 40 minuten op 100° C. in vooraf gesteriliseerd glaswerk. Voor het quantitatief onderzoek werd in alle kolfjes zooveel mogelijk een gelijke hoeveelheid materiaal (1 normaal oogje) van een 24 uur oude glycerineserumcultuur gebracht.

Na een bepaalden tijd werden hierin de volgende bepalingen verricht:

1e vetgehalte;
2e zuurgraad;
3e formaldehydegetal;

4e draaiingsvermogen van het melkserum.

Het vetgehalte werd bepaald volgens de acidbutyrometrische methode van Gerber en volgens de methode van Schmid-Bondzynski.

De zuurgraad werd uitgedrukt in het aantal cm^3 ¼N. loog, noodig ter neutralisatie van 100 cm^3 melk, phenolphtaleïne als indicator. Aan deze bepaling werd verbonden die van het formaldehydegetal, waaronder men verstaat het aantal cm^3 ¼N. loog, dat noodig is voor de neutralisatie van het met behulp van formaldehyde gevormde en zuur reageerende methyleeneiwit in 100 cm^3 melk.

Dit zoogenaamde aldehydegetal der melk, waarop Steinegger in 1905 de aandacht vestigde, kan men beschouwen als de uitkomst van een eiwitbepaling.

Deze reactie werd door Schiff beschouwd als een additie-werking, waarbij water uittreedt en uit een eiwitstof of een aminozuur de overeenkomstige methyleenverbinding ontstaat, die in 't algemeen door de volgende vergelijking kan worden voorgesteld:

$$R\begin{cases}NH_2\\COOH\end{cases} + CH_2O = R\begin{cases}N\,CH_2\\COOH\end{cases} + H_2O$$

Het amphotaire karakter van een aminozuur is hierbij verloren gegaan en heeft plaats gemaakt voor een uitgesproken zure reactie, zoodat deze met loog, phenolphtaleïne als indicator, titreerbaar is.

Door de Graaff en Schaap werd als gemiddeld cijfer voor 't formaldehydegetal van melk vastgesteld 7,2, terwijl dit getal, vermenigvuldigd met 0.53, het procentcijfer aan eiwit in de melk aangeeft.

Indien men dus het formaldehydegetal van de niet ge-

ente melk bepaalt en dat van de met diphtheriebacterie resp. bacterie v. Hofmann Wellenhof B of andere diphtheroïden geïnfecteerde melk en die met elkaar vergelijkt, zal men een inzicht kunnen krijgen van de veranderingen, die eventueel het melkeiwit heeft ondergaan.

Deze bepaling, waaraan de bepaling van den zuurgraad voorafging, werd als volgt uitgevoerd:

50 cm^3 melk titreert men na toevoeging van 0,5 cm^3 2 % phenolphtaleïneoplossing met ¼ N. loog tot zwakke rosekleuring. Vervolgens voegt men aan deze geneutraliseerde melk 10 cm^3, vooraf ten opzichte van phenolphtaleïne geneutraliseerde formaline-oplossing toe en titreert wederom met ¼ N. loog tot zwakke rosekleuring.

Het aantal cm^3 ¼ N. loog, na de formoltoevoeging, vermenigvuldigd met 2, geeft het formaldehydegetal der melk aan.

Is dus het formaldehydegetal der geïnfecteerde melk na een bepaalden tijd gelijk aan dat van de contrôlemelk, dan mag men besluiten, dat de betreffende bacterie 't eiwit onveranderd heeft gelaten.

De uitvoering van deze bepaling is hoogst eenvoudig en geeft snel een quantitatieven indruk van de verandering, die 't eiwitmolecuul onder invloed van de verschillende bacteriën na een bepaald tijdperk heeft ondergaan.

Onder draaiingsvermogen verstaat men de in boograden uitgedrukte draaiing van het polarisatievlak bij doorgang van rechtlijnig gepolariseerd natriumlicht door een buis van 2 dm lengte, gevuld met een vloeistof, die op de volgende wijze verkregen wordt.

Men mengt 50 cm^3 melk met 5 cm^3 75 % oplossing van trichloorazijnzuur, filtreert na 30 minuten dit mengsel door

een droog filter, waarbij de eerste 5 cm^3 worden weggeworpen.

Het draaiingsvermogen van de melk zal een inzicht kunnen geven van een eventueele verandering van het melksuikergehalte.

Het onderzoek werd gelijktijdig ingezet met 2 diphtheriestammen en met 2 stammen der bacterie v. Hofmann Wellenhof B. Het uiterlijk der melk, waarin de eerstgenoemde waren geënt, was onveranderd gebleven wat kleur, reuk en consistentie betrof, terwijl bij de melk der laatstgenoemde de reeds uitvoerig beschreven veranderingen werden waargenomen.

Uit dit onderzoek is gebleken:

1e. dat 't vet, noch door de diphtheriestammen, noch door die van v. Hofmann Wellenhof B werd aangetast;

2e. dat de diphtheriebacterie den zuurgraad van de melk iets verhoogt, het formaldehydegetal practisch onveranderd laat, dat wil dus zeggen 't eiwit niet aantast;

3e. dat de diphtheriebacterie de melksuiker niet aantast, hetgeen met latere waarnemingen (zie hoofdstuk : meerwaardige alcoholen enz.) volkomen overeenstemt;

4e. dat bij de melk onder invloed van de bacterie v. Hofmann Wellenhof B. de zuurgraad afneemt, naarmate zij langer in de stoof staat en de melk, na 4 weken, sterk alkalisch is geworden ten opzichte van lakmoes;

5e. dat het formaldehydegehalte van de melk, door deze bacterie geïnfecteerd, sterk toeneemt gedurende de eerste twee weken; tijdens de derde en vierde minder en tusschen de 4e en 5e week haar maximum bereikt.

Aldus gaat met een daling van de zuurgraad een snelle stijging van het formaldehydegetal gepaard.

6e. dat het draaiingsvermogen van de melk onder invloed van deze bacterie ten slotte afneemt. De bepaling van de draaiing van dit melkserum leverde intusschen eenig bezwaar op. In cultures ouder dan 2 weken was de bruine kleur der vloeistof n.l. zoo sterk in intensiteit toegenomen, dat de gekleurde oplossing in den polarimeter gebracht, geen nauwkeurige waarneming toeliet. Ook een klaring met norit bleek onvoldoende.

Onwillekeurig zal men beginnen, met het geringe afnemen in draaiing van het melkserum door de bacterie v. Hofmann Wellenhof B op rekening te stellen van een vermindering van het melksuikergehalte. Toch geloof ik niet, dat dit juist is, omdat uit latere proefnemingen (zie hoofdstuk: Ontleding der Koolhydraten enz.) gebleken is, dat deze bacterie lactose zelfs na zes weken niet aantast.

Het is niet onmogelijk, dat enkele splitsingsproducten van het eiwit hier hunnen invloed op de draaiing doen gelden, waardoor de rechtsdraaiing vermindert.

Voor de geringe verhoogingen van den zuurgraad door de diphtheriebacterie heb ik geen verklaring kunnen vinden.

Wel deelt Zarniko mee, dat de diphtheriebacterie snel in melk groeit en dat deze zuur wordt, maar de meeste onderzoekers hebben geen stremming waargenomen. Het is intusschen wel te verklaren, dat daarover de meeningen uiteen zullen loopen, omdat de beginreactie en de stijging van den zuurgraad het al of niet stremmen van de melk zullen beheerschen.

De beste verklaring van de stijging van den zuurgraad is die van Kendall-Day en Walker, die deze verhooging toeschrijven aan normaal in de melk voorkomende lichamen van dextrose-achtigen aard.

Bij mijn onderzoekingen werd de melk **nooit** gestremd; ze was uiterlijk en wat de reuk betreft in geen enkel opzicht van de contrôlekolf te onderscheiden. Dat de bacteriën toch wel gegroeid waren en nog levensvatbaarheid hadden na 4 weken, bleek bij overenten op een glycerineserum, waarbij een reincultuur van diphtheriebacteriën ontstond.

De melk, geënt met de bacterie v. Hofmann Wellenhof B, gaf bij de bereiding van het serum met behulp van trichloorazijnzuur sterke nevelvorming, die mij ammonia deed vermoeden.

Behalve met de vroeger genoemde reacties, werd ammonia nader microchemisch aangetoond. Melk werd opnieuw geënt met de bacterie v. Hofmann Wellenhof B. In het vat, waarin zich de melk bevond, werd een bakje met 5 cm^3 $^1/_{10}$ N. zwavelzuur geplaatst. Na 4 weken werd getitreerd, methyloranje als indicator, waarbij 3,6 cm^3 $^1/_{10}$ N. zwavelzuur reeds gebonden bleek te zijn. Quantitatief had deze bepaling natuurlijk niet de minste waarde, daar de gevormde ammonia op deze wijze slechts gedeeltelijk was opgevangen.

Een druppel verdund zoutzuur werd op een voorwerp glas een oogenblikje omgekeerd geplaatst op de kolf, waarin zich een vier weken oude cultuur van bacterie v. Hofmann Wellenhof B bevond. Hierin kon ammonium microchemisch worden aangetoond.

In het destillaat van deze melk kon met behulp van de isonitrilreactie geen primaire aminen worden aangetoond.

Ten slotte werd nog nagegaan of deze diphtheriebacteriën en bacteriën v. Hofmann Wellenhof B katalase gevormd hadden en of ze niet in staat waren peroxydasen te vormen.

De katalaseproef verliep bij alle vier positief, terwijl de bacteriën v. Hofmann Wellenhof B ook peroxydasen bleken gevormd te hebben. Met pyrocatechine en waterstofperoxyde werden deze cultures paarsbruin.

AFGEROOMDE MELK.

STAMMEN	Zuurgraad	Zuurgraad na 14 dagen	Zuurgraad na 21 dagen	Zuurgraad na 28 dagen
Oorspr. melk .	9	9	9	9
473	9	10,6	9,2	10,4
844	9	12,4	11,3	11,7
B. v. H.W. B I	9	2,5	alk.	alk.
B. v. H.W. B II	9	3,4	0,4	alk.
	Formaldehydegetal	Form.-getal na 14 dagen	Form.-getal na 21 dagen	Form.-getal na 28 dagen
Oorspr. melk .	7,8	7,8	7,8	7,8
473	7,8	8,0	7,7	8,0
844	7,8	8,1	7,3	8,2
B. v. H.W. B I	7,8	34,5	40,2	45,2 } benaderd
B. v. H.W. B II	7,8	34,9	43,2	47,5 } benaderd
	Vet in %	Vet in % na 14 dagen	Vet in % na 21 dagen	Vet in % na 28 dagen
Oorspr. melk .	0,1	0,1	0,1	0,1
473	0,1	0,1	0,1	0,1
844	0,1	0,1	0,1	0,1
B. v. H.W. B I	0,1	0,1	0,1	0,1
B. v. H.W. B II	0,1	0,1	0,1	0,1
	Draaiing	Draaiing na 14 dagen	Draaiing na 21 dagen	Draaiing na 28 dagen
Oorspr. melk .	4° 4	4° 4	4° 4	4° 4
473	4° 4	4° 4	4° 4	4° 4
844	4° 4	4° 4	4° 4	4° 4
B. v. H.W. B. I	4° 4	3° 41	Onafleesbaar	Onafleesbaar
B. v. H W. B. II	4° 4	3° 53	Onafleesbaar	Onafleesbaar

Zooals uit de gevonden analyse blijkt, ontleedt geen der organismen 't botervet, althans werd onveranderd 0.1 % gevonden. Bij een dergelijk laag percentage vet zal men moeilijk kunnen constateeren of een klein deel soms omgezet is geworden.

Daarom werden dezelfde stammen nu nog eens geënt op volle melk en deze na een maand geanalyseerd. De volle melk, geënt met de bacteriën v. Hofmann Wellenhof B, was, zooals reeds werd meegedeeld, veel minder gekleurd, dan de centrifugemelk, omdat de bacteriën hier onder eenigszins anaërobe omstandigheden werden gekweekt.

De vetbepaling geschiedde weer volgens Gerber en Schmid-Bondzynski; van het melkvet, volgens deze laatste methode afgescheiden, werd tevens de refractie bepaald.

Deze vetbepalingen bevestigden den uitslag van 't eerste onderzoek; onveranderd werd 3 % teruggevonden, terwijl de refractie bij 40° C. 1,4558 bedroeg. Daar de refractie bij allen 't zelfde was, mag men dus wel aannemen, dat 't melkvet noch door de diphtheriebacterie, noch door de bacterie v. Hofmann Wellenhof B wordt aangetast en dus de verhoogde zuurgraad van de melk, geënt met diphtherie, niet van ontleed melkvet afkomstig zal zijn.

Volledigheidshalve worden zuurgraad, formaldehydegetal en draaiing in onderstaande tabel vereenigd.

VOLLE MELK NA 1 MAAND.

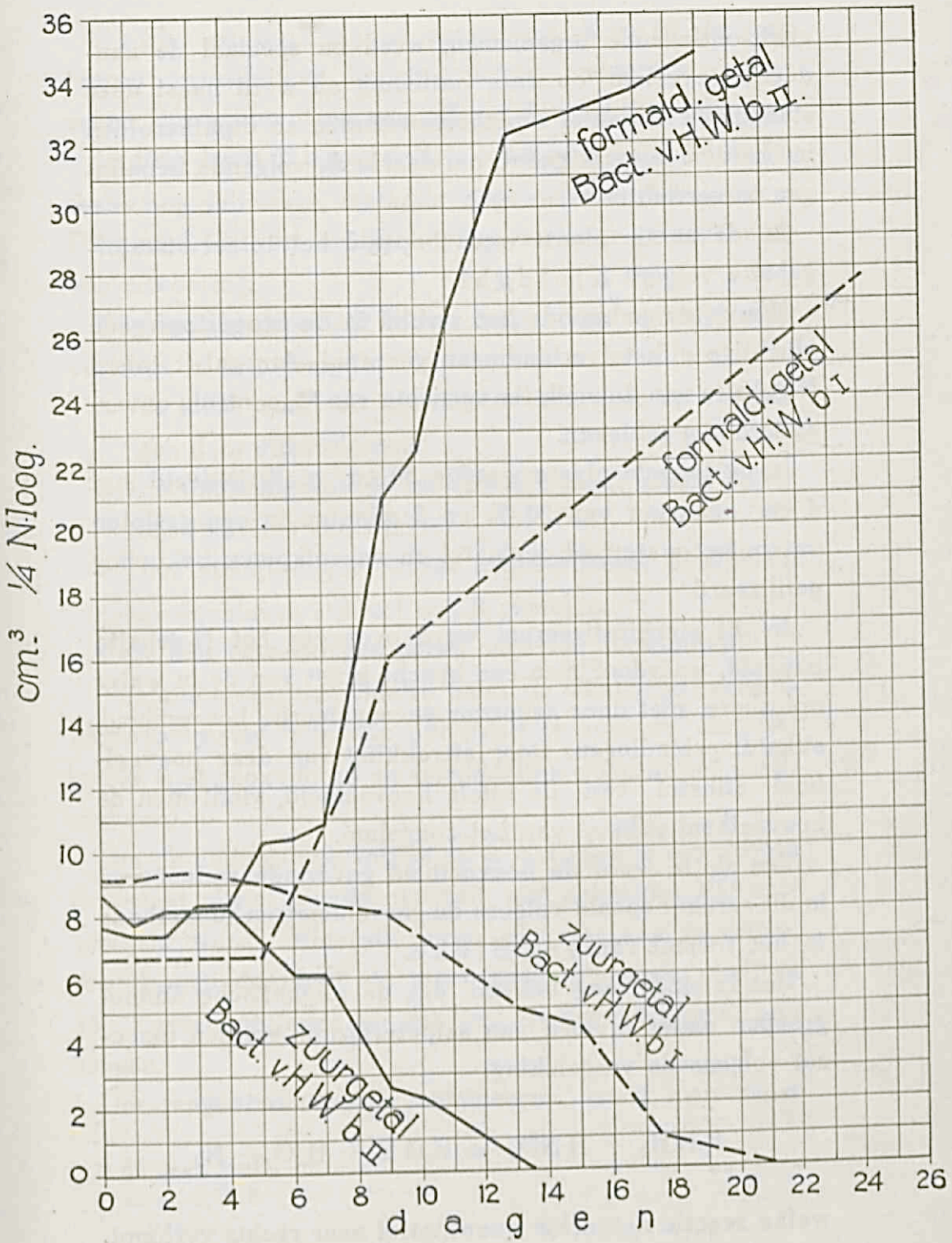
STAMMEN	Vet-gehalte	Zuurgetal	Formald. get.	Draaiing	N_D vet 17° C.
Blanco . . .	3%	8	7.8	4° 62	1.4558
844	3%	11.1	8.2	4° 62	1.4558
473	3%	9.8	8.0	4° 62	1.4558
B. v. H.W. B. I	3%	3.1	32.5	4° 29	1.4558
B. v. H.W. B. II	3%	3.1	36.9	4° 20	1.4558

Zooals ik reeds in het begin opmerkte, was het verschil in uiterlijk tusschen de blanco en de met bacteriën v. Hofmann Wellenhof B geënte melk met 't bloote oog pas na 5 dagen zichtbaar. Het was nu de vraag of de verandering in zuurgetal en formaldehydegetal parallel ging met deze uiterlijke verandering, of dat er reeds onzichtbare, inwendige veranderingen hadden plaats gehad.

Hiervoor werden een aantal kolfjes, ieder 50 cm^3 centrifugemelk bevattende, gesteriliseerd en gelijktijdig geënt met de beide stammen v. Hofmann Wellenhof B.

Teneinde in alle kolfjes evenveel entmateriaal te brengen werd een 24 uur oude glycerineserumcultuur langen tijd afgeschud met peptonwater en ieder kolfje met 2 druppels dezer suspensie bedeeld. Dagelijks werden de kolfjes getitreerd; uit de graphische voorstelling ziet men, dat inderdaad noch zuurgraad, noch formaldehydegetal veel veranderen gedurende de eerste 5 dagen, vervolgens stijgen de lijnen, die 't formaldehydegetal aangeven, snel, terwijl 't zuurgetal daalt.

Daar deze beide bacteriën zich hadden doen kennen als


cm.³ ¼ N.loog.
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
d a g e n
formald. getal
Bact. v.H.W. b II.
formald. getal
Bact. v.H.W. b I
zuurgetal
Bact. v.H.W. b I
zuurgetal
Bact. v.H.W. b II

eiwit-ontledende organismen, werd nu speciaal de aandacht gevestigd op deze ontleding en werd naast deze stammen een aantal diphtheriestammen en diphtheroïden in ontroomde melk geënt, om daarin de volgende bepalingen te verrichten.

In de eerste plaats werd bepaald het totaal stikstofgehalte volgens K j e l d a h l.

Waren er gedurende het verblijf in de broedstoof geen vluchtige stikstofverbindingen gevormd, dan zal 't totaal N gehalte van de melk ten opzichte van de contrôle onveranderd zijn gebleven.

In de tweede plaats werden 80 cm^3 melk bedeeld met 4 cm^3 azijnzuur van 30 % en 5 minuten in een gesloten vat in het waterbad geplaatst en na volkomen bekoeling gefiltreerd.

In dit sterilisatieserum werd eveneens het N-gehalte bepaald, waardoor men een inzicht krijgt van de in water oplosbare, niet door azijnzuur gecoaguleerde hoeveelheid, stikstofverbindingen. Door aftrekking van deze hoeveelheid stikstof van de totale hoeveelheid, vindt men de hoeveelheid stikstof van het coagulum.

Ten slotte werd de hoeveelheid gevormde aminozuren in dit serum bepaald volgens de gasvolumetrische methode in het toestel van v o n S l i j k e.

Het is sinds lang bekend, dat de aliphatische aminogroepen onder invloed van salpeterigzuur worden omgezet volgens de vergelijking:

$$R.NH_2 + HNO_2 \rightarrow R.OH + H_2O + N_2$$

welke reactie natuurlijk quantitatief naar rechts verloopt.

Sachs en Kormann en na hen, König, hebben hierop quantitatieve bepalingen van aminozuren gebaseerd, die echter geen van alle in de praktijk voldeden.

In 1910 heeft Donald D. von Slijke de volgende, thans nog gebruikte, methode uitgewerkt en beschreven. Deze methode verloopt snel, is betrouwbaar en eenvoudig van uitvoering.

De bepaling geschiedt in het toestel van v. Slijke en verloopt in drie tempo's.

a. de lucht wordt uit het toestel verdreven en vervangen door stikstofoxyde,
b. de ontleding van de aminozuren heeft plaats onder ontwikkeling van stikstof,
c. het stikstofoxyde wordt geabsorbeerd, terwijl de overgebleven stikstof wordt gemeten.

Deze drie bewerkingen duren ongeveer 10 minuten.

Van alle absorptiemiddelen bleek de alkalische permanganaatoplossing *) in alle opzichten te voldoen. Het NO wordt snel geoxydeerd en onmiddellijk quantitatief geabsorbeerd.

Om de aminozuren volkomen te ontleden is een groote overmaat nitriet noodig, waaruit, met azijnzuur, NO ontwikkeld wordt. Minerale zuren zijn niet aan te raden, omdat men daardoor de meer gecompliceerde eiwitten zou kunnen ontleden en dus een foutieve uitkomst zou krijgen.

Om reagentiafouten te elimineeren, voert men naast

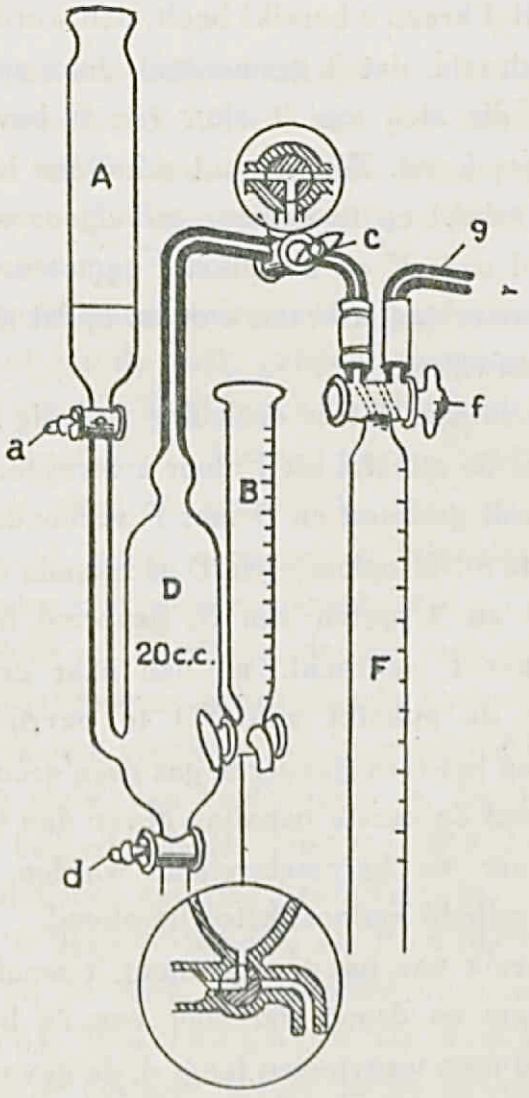
*) 50 gr. $KMnO_4$
25 gr. KOH
1 L. water.

een bepaling van aminozuren, een blanco bepaling uit en vermindert de gevonden waarde hiermee. Het apparaat, dat hier is afgebeeld, werkt op de volgende wijze.

De in cm^3 verdeelde buret F, waarin de stikstof gemeten wordt, vult men evenals de beide capillairen tot aan kraan c met gedestilleerd water, daarna sluit men c en f. Men brengt thans 7 cm^3 ijsazijn in D door A en kraan a. Kraan c, een driewegskraan, wordt zoo geplaatst, dat er communicatie is met D en de buitenlucht, zoodat gas en lucht kunnen ontwijken. Een hoeveelheid nitrietoplossing, die 30 g $NaNO_2$ in 100 cm^3 bevat, laat men uit A in D vloeien, tot dit vat geheel, en A tot even boven kraan a gevuld is en laat die geopend. Nu sluit men c en schudt het vat D; er heeft heftige gasontwikkeling plaats, waardoor de vloeistof uit D weer in A gedreven wordt. Kraan c wordt geopend, waardoor lucht en NO kunnen ontsnappen. Deze manupulatie herhaalt men nog eens om de laatste sporen lucht te verdrijven. Nu wordt c weer gesloten en D zoo lang geschud tot er ± 20 cm^3 vloeistof in D terugblijven. Dan wordt a gesloten en c en f zoo gesteld, dat D en F met elkaar in verbinding staan. Het verdrijven van de lucht uit het toestel duurt 2 minuten.

Thans laat men de gewenschte hoeveelheid vloeistof, waarvan men het aminozuurgehalte wil bepalen — de oplossing mag niet meer dan 20 mg aminostikstof bevatten — uit B in D vloeien en schudt D eenigen tijd flink met behulp van een motor.

Aminozuren vereischen 3 à 4 minuten ter volledige ontleding; gedeeltelijk of geheel gehydrolyseerde eiwitten hebben langeren tijd noodig. Om eventueel schuimen tegen te gaan, brengt men alvorens de aminozuuroplossing toe



Toestel van D. D. v. Slijke.

te voegen, een weinig secundair octylalcohol in vat D. Zoo gauw de reactie afgeloopen is, wordt het gas in D door openen van a door de vloeistof naar F gedreven tot de vloeistof kraan c bereikt heeft, dan wordt c gesloten en f zoo gedraaid, dat 't gasmengsel, door oplichten van den ballon, die zich aan 't eind van F bevindt, in de absorptiepipet komt. Een minuut schudden is voldoende om de NO geheel op te nemen, vervolgens wordt 't gas teruggevoerd naar F en de stikstof gemeten. Gedurende de laatste bewerking is kraan a open, opdat gevormd NO uit D kan ontwijken.

Om zeker te zijn, dat de ontleding volledig heeft plaats gehad, wordt de stikstof uit F door c teruggebracht in D. Kraan a wordt gesloten en D met F verbonden. Het gas, dat zich in de nitrietoplossing in D gedurende de absorptie van de NO en 't meten van N, gevormd heeft, wordt geschud, naar F gebracht, en dan naar de pipet van Hempel om de stikstof van NO te bevrijden. Na de absorptie mag het teruggevoerde gas geen grooter verschil in aflezing met de eerste bepaling geven dan 0,1 cm^3.

Temperatuur en barometerstand worden opgenomen en de hoeveelheid aminostikstof berekend.

Na 't gebruik van het toestel moet 't maatglas B volkomen schoon en droog zijn voor een 2e bepaling. De vloeistof laat men wegvloeien langs d, de gevormde N laat men ontsnappen door c en buret en capillairen worden weer met gedestilleerd water gevuld.

Als voorloopige proef werd de bacterie v. Hofmann Wellenhof B II geënt op een bepaalde hoeveelheid melk en deze na een bepaalden tijd, tegelijk met een

blanco proef, die eveneens in de broedstoof bij 37° C. had gestaan, onderzocht.

Na dien tijd, werden daarin de volgende bepalingen verricht:

1e. de totale hoeveelheid stikstof,

2e. de hoeveelheid stikstof van het sterilisatieserum, bereid zooals hierboven werd opgegeven,

3e. de hoeveelheid gevormde aminostikstof in dit sterilisatieserum.

Uit bijgaande waarnemingen blijkt, dat de hoeveelheid totale stikstof van de melk, geïnfecteerd door de bacterie van v. Hofmann Wellenhof BII, minder is, dan die der blanco proef. Er is dus een hoeveelheid verdwenen, die berekend werd als ammoniak, daar deze verbinding met zekerheid werd aangetoond. Vluchtige, primaire aminen konden niet worden aangetoond.

Verder blijkt uit de cijfers, dat de verhouding van de, in het sterilisatieserum voorkomende hoeveelheid N, tot de in het coagulum voorkomende hoeveelheid N bij de oorspronkelijke melk, een heel andere is, dan bij de melk, waarin de bacterie v. Hofmann Wellenhof BII haar proteolytische splitsing heeft verricht.

Practisch is deze verhouding als 1 : 4 (0.0989 : 0.4044), terwijl die bij de melk, geïnfecteerd door deze bacterie v. Hofmann Wellenhof is als 4 : 1 (3.963 : 1.07). Naarmate deze cultures langer in de broedstoof staan, zullen ze meer N als NH_3 verliezen en zullen er meer oplosbare N-verbindingen in het sterilisatieserum gevonden worden, terwijl ook de hoeveelheid aminostikstof toeneemt.

STIKSTOFBEPALINGEN IN MELK UITGEDRUKT IN G PER 100 CM³ MELK.

STAM	Tijd in weken	Tot. hoev. stikstof	Ster. ser. stikstof	Coagul. stikstof	Ster. ser. Amino stikstof	Vluchtige stikstof verbind.
Blanco . . .	4	0,5033	0,0989	0,4044	0,00623	
Bact. v. H.W. B II	4	0,420	0,313	0,107	0,0360	0,0833 = 0,1012 NH_3
Bact. v. H.W. B II	6	0,389	0,320	0,069		0,1142 = 0,1386 NH_3
Bact. v. H.W. B II	8	0,350	0,2905	0,060		0,1534 = 0,1863 NH_3

Van een enkel sterilisatieserum werd het ammoniakgehalte op de gebruikelijke wijze bepaald.

Zoo bevatte het sterilisatieserum van bact. v. H.W. B II na 6 weken in 100 cm³ 0.109 stikstof, overeenkomend met 0.1445 gr. ammoniak, zoodat voor andere stikstofverbindingen overblijft 0.320 — 0.119 = 0.201 gr. stikstof.

Het blijkt dus wel, dat ingrijpende veranderingen in het eiwitmolecuul hebben plaats gegrepen, waarbij dit afge-

broken wordt tot eenvoudiger in water oplosbare verbindingen.

Wanneer men de analyse der melk beschouwt, die 6 weken onder invloed van de proteolytische fermenten heeft gestaan, dan ziet men, dat nog meer vluchtige verbindingen verdwenen zijn en er nog meer eiwit gesplitst is, daar zich nu de in azijnzuur oplosbare eiwitontledingsproducten tot die van het coagulum verhouden als 6,3 : 1.

Deze bepalingen werden nogmaals verricht en wel in melk, geënt met de beide bacteriën v. Hofmann Wellenhof B en met Bacterium cutis communis. Van deze onderzoekingen zijn de resultaten vereenigd in de navolgende tabel, waarin volledigheidshalve zuurgetal, formaldehydegetal en draaiing werden opgenomen.

De uitslag van de beide eerste bevestigden dien van de voorgaande onderzoekingen.

Wat Bacterium cutis communis betreft, bleek in de eerste plaats, dat dit organisme na 10 weken nog leefde en op glycerine-agar overgeënt, een reincultuur gaf.

Uit de analysecijfers blijkt, dat de melk na 1 maand door Bacterium cutis communis practisch **niet** veranderd is. De waarnemingen na 2 maanden zijn van onwaarde, daar het totaal stikstofgehalte plotseling toeneemt. De eenige verklaring, die hiervoor te geven is, is, dat deze culturen, die naast die der pseudo-diphteriestammen in de broedstoof gestaan hebben, vluchtige stikstofverbindingen hebben opgenomen en daardoor hoogere waarden geven.

De melk was na 1 maand niet gestremd, practisch niet van uiterlijk veranderd en verspreidde geen afwijkende geur.

STIKSTOFBEPALINGEN IN MELK, UITGEDRUKT IN G PER 100 CM^3 MELK.

STAM	Tijd in dagen	Zuur-getal	Form. getal	Draai-ing	Totale hoeveelh. stikstof	Steril. serum stikstof	Coagul. stikstof	Amino-stikstof	Vluchtige stikstofverbinding
Blanco . . .	18	9,2	7,4	4° 62	0,5149	0,0685	0,4464	0,0068	
B. v. H.W. B I	18	2,0	24,4	4° 07	0,4886	0,2205	0,2681	0,0592	0,0252 = 0,0306 NH_3
B. v. H.W. B I	30	alk.	26	3° 85	0,4025	0,2629	0,1396	0,0676	0,1085 = 0,1318 NH_3
B. v. H.W. B I	60	alk.	35,2	3° 08	0,3728	0,2840	0,0888	0,0923	0,1441 = 0,1713 NH_3
B. v. H.W. B II	19	2,8	23,6	4° 51	0,5138	0,2068	0,3070	0,0637	
B. v. H.W. B II	30	alk.	45° 2	3,63	0,4550	0,3269	0,1281	0,1281	0,0588 = 0,0714 NH_3
B. v. H.W. B II	60	alk.	39,6	2° 75	0,4340	0,2832	0,1508	0,0897	0,0777 = 0,0944 NH_3
			benaderde bepalingen						
Blanco . . .	21	9,8	7,6	4° 84	0,5418	0,0817	0,4601	0,00822	
B. cut. comm.	21	8	7,6	4° 84	0,5470	0,0810	0,4660	0,00822	
B. cut. comm.	33	7,2	9	4° 84	0,5464	0,0820	0,4644	0,00817	
B. cut. comm.	56	7,7	8,8	4° 73	0,6090	0,1162	—	0,00933	
B. cut. comm.	70	6,8	10	4° 73	0,6680	—	—	0,0144	

Bovendien werd nog nagegaan of Bacterium cutis communis het melkvet aantastte. Geënt op volle melk, was de hoeveelheid vet onveranderd gebleven, terwijl ook de refractie geen verandering had ondergaan.

Samengevat heeft dit onderzoek de volgende uitkomsten gegeven:

1e. De bacterie v. Hofmann Wellenhof B tast het melkeiwit zeer sterk aan;

2e. het zuurgetal van de melk neemt na den 5den dag gestadig af; tenslotte wordt de vloeistof alkalisch;

3e. het formaldehydegetal neemt in verband met de eiwitsplitsing toe;

4e. het totaal stikstofgehalte vermindert, doordat er vluchtige stikstofverbindingen (NH_3) ontstaan en ontwijken;

5e. de hoeveelheid stikstof in het sterilisatieserum neemt toe, in vergelijking met die in het sterilisatieserum van de blanco en wel meer naarmate de culturen langer in de stoof staan. In gelijke mate neemt het stikstofgehalte van het coagulum af. In vergelijking met de blanco wordt daardoor de verhouding serumstikstof tot coagulumstikstof sterk gewijzigd;

6e. de hoeveelheid aminozuren neemt toe;

7e. de draaiing van het melkserum, waaruit de hoeveelheid melksuiker berekend wordt, vermindert, naarmate het eiwitmolecuul meer wordt gesplitst. Daar uit herhaalde proeven is gebleken, dat deze bacterie melksuiker onveranderd laat, zelfs na 2, 4 en 6 maanden, zal deze vermindering in draaiing op rekening moeten komen van een eventueele links-

draaiing, ontstaan als resultante van de splitsingsproducten van het eiwit.

Tenslotte werden een aantal diphtheriestammen, de beide stammen v. Hofmann Wellenhof A, afkomstig uit het laboratorium van Neisser en de verschillende beschreven diphtheroïden op dezelfde wijze onderzocht en de uitkomsten in de volgende tabel vereenigd.

De diphtheriestammen vertoonen ook hier weer 't zelfde wat het voorloopig onderzoek uitmaakte. In de eerste plaats zijn ze in geen enkel opzicht van de blanco te onderscheiden en vertoonen ze een weinig stijging van den zuurgraad; 't eiwit wordt practisch niet aangetast.

Wat betreft de beide pseudo-diphtheriestammen I_7 en I_8, ook zij tasten 't melkeiwit niet aan en gedragen zich dus in dit opzicht geheel anders dan de hiervoor op melk beproefde stammen v. Hofmann Wellenhof B. Wat betreft Lister en Krall, deze tasten op den duur ook melksuiker aan, zoodat de waargenomen stremming van de melk is te verklaren. Ook zij laten practisch het eiwit onveranderd. (De uitkomsten zijn iets lager dan de blanco, omdat er in de pipet gecoaguleerd eiwit aan de wanden is blijven hangen.)

Van de diphtheroïden uit de kippenkelen gedroeg No. 4 zich 't meest als de stammen v. Hofmann Wellenhof B. Ook wat 't uiterlijk betrof waren de melkculturen dezer stammen afwijkend van kleur ten opzichte van de blanco en wel vertoonde No. 4 de grootste afwijking. Bovendien was hier een korrelig depôt aanwezig, terwijl de stammen No. 1 en No. 3 meer een fijn gelijkmatig depôt vertoonden.

STIKSTOFBEPALINGEN IN MELK, UITGEDRUKT IN G PER 100 CM³ MELK.

STAMMEN	Tijd in weken	Zuurgetal	Form. getal	Draaiing	Totale hoeveelh. stikstof	Steril. serum stikstof	Coagul. stikstof	Amino-stikstof
Blanco . . .	4	8,46	7,37	4°4	0,5600	0,1047	0,4553	0,00738
473	4	9,2	7,5	4°4	0,5551	0,1064	0,4487	0,00732
844	4	9,9	7,6	4°4	0,5579	0,1033	0,4546	0,00731
Poels . . .	4	9,8	7,5	4°4	0,5600	0,1068	0,4532	0,00766
Blanco . . .	6	7,1	7,6	4°4	0,5040	0,0840	0,4195	
Diphth. 2 . .	6	8,4	8,0	4°4	0,5075	0,0868	0,4207	
Diphth. 4 . .	6	9,0	8,2	4°4	0,5086	0,0917	0,4169	
Di. II Parys .	6	8,4	7,9	4°4	0,5047	0,0830	0,4217	
Blanco . . .	8	8,0	7,4	4°51	0,4900	0,0662	0,4238	
Amerika . .	8	8,8	7,4	4°51	0,4830	0,0672	0,4158	
Blanco . . .	6	7,1	7,6	4°4	0,5040	0,0845	0,4195	
I_7	6	7,6	7,2	4°4	0,5110	0,0709	0,4401	
I_8	6	7,6	7,2	4°4	0,4970	0,0730	0,4240	
Lister . . .	6	gestremd	7,0	4°4	0,4490	0,0735	0,3755	
Krall . . .	6	gestremd	7,4	4°4	0,4490	0,0662	0,3828	
Blanco . . .	8	8,0	7,4	4°51	0,4900	0,0662	0,4238	
No. 1 . . .	8	7,0	6,4	4°51	0,4935	0,0919	0,4016	
No. 2 . . .	8	3,2	8,8	4°4	0,4900	0,0977	0,3923	
No. 3 . . .	8	4,4	7,6	4°4	0,4935	0,0795	0,4140	
No. 4 . . .	8	1,6	9,6	4°51	0,4935	0,1225	0,3710	

No. 2 daarentegen had nagenoeg geen bezinksel.

De reuk van alle was als die van de contrôle melk.

De reactie van No. 4 was ten opzichte van lakmoes neutraal; die van No. 1 en No. 3 waren zuur, en die van No. 2 zwak zuur. Hoewel weinig, schijnen enkele dezer stammen het eiwit aangetast te hebben. Zoo is het stikstofgehalte van het sterilisatie-serum van de melk, geïnfecteerd door No. 4, gestegen, terwijl eveneens een geringe stijging wordt waargenomen bij No. 1 en No. 3. De refractie van dit serum van deze diphtheroïden werd bepaald bij 17° 5 C., waaruit bleek, dat de refractie bij enkele wat gestegen was, tengevolge van meer opgeloste bestanddeelen.

Tenslotte werd nog nagegaan, welke fermenten door de verschillende organismen in melk gekweekt, uitgescheiden werden.

1e. Katalase.

In een katalasebuisje werden 10 cm³ melk gemengd met 5 cm³ 1 % waterstofperoxydeoplossing. In alle gevallen had een meer of minder hevige zuurstofontwikkeling plaats.

2e. Reductase.

10 cm³ melk werden gemengd met 2 cm³ formol-methyleenblauwoplossing volgens Schardinger en gedurende eenigen tijd op 45° verwarmd. Slechts bij de melk, geënt door stam No. 4, trad ontkleuring op, zoodat reductase door de diphtheriebacterie **niet** wordt geproduceerd en door de diphtheroïden **in den regel niet.**

3e. Amylase.

10 cm³ melk werden gemengd met 1 cm³ 0.1 % amylumoplossing; — in de stoof bij 37° C. geplaatst en na 30

minuten met een jodiumoplossing op nog aanwezig amylum onderzocht.

Ook amylase werd **niet** afgescheiden.

4e. Peroxydase.

10 cm³ melk werden gemengd met 10 druppels ½ % waterstofperoxydeoplossing en 10 druppels eener versch bereide 10 % alcoholische pyrocatechineoplossing.

De diphtheriebacteriën hadden **geen** peroxydase afgescheiden; de bacteriën v. Hofmann Wellenhof B hadden peroxydase gesecerneerd, terwijl de diphtheroïden No. 2 en No. 4 een positieve reactie, No. 1 en No. 3 een zwak positieve reactie vertoonden.

STAMMEN	Tijd	Katalase	Reductase	Amylase	Peroxydase
Blanco . . .	6 weken	—	—	—	—
844	„	+			—
473	„	+			—
Blanco . . .	„	+			—
Diphth. 2 . .	„	+	—	—	—
Diphth. 4 . .	„	+	—	—	—
Holland . .	„	+ + +	—	—	—
Di. II Parys .	„	+	—	—	—
Amerika . .	„	Zw +	—	—	—
I_7	„	+	—	—	—
I_8	„	+	—	—	—
Lister . . .	„	Zw +	—	—	—
Krall . . .	„	+	—	—	—
v. H. W. B I .	„	+ + +			+
v. H. W. B II	„	+ + +			+
No. 1 . . .	„	+ +	—	—	Zw +
No. 2 . . .	„	+ +	—	—	+
No. 3 . . .	„	+ +	—	—	Zw +
No. 4 . . .	„	+ + +	Zw +	—	+

LITTERATUUR.

Lubinski. C. f. Bact. 85-96-1921.
Rohde. C. f. B. 91-20-1923. München. Med. Wochenschrift 68-234-1921.
Radice. C. f. Bact. 91-20-1923.
d'Espine et de Marignac. Revue méd. de la Suisse romande 10-34-99-1890.
Démétriadès. Action de l'eau sur le bacille diphthérique. Arch. de méd. expér. et d'anat. path. 7-607-1895.
Seiler et de Stoutz. Revue médic. de la Suisse romande. 24-772-1904.
Schottelius. C. f. Bact. 20-897-1896.
Feinberg. Zeitschrift f. klin. mediz. 33-432-1897.
Kendall-Day and Walker. Journ. of the Americ. chem. society 36-1937-1914.
Schmid-Bondzynski. Z. f. anal. Chemie 1891.
Steinegger. Z. f. Unters. d. Nahr. u. Genussm. 10-659-1905.
Schiff. Ann. d. Chem. 319-59-287-1901 en 325-348- 1902.
Zarniko. C. f. Bact. 6-153-177-224-1889.
Donald D. v. Slijke. Ber. d. d. Chem. Ges. 1910.
Donald D. v. Slijke. The journal of biol. Chem. 1911.
Sachs und Kormann. Z. f. anal. Chem. 1875.
König. Chem. d. Menschl. Nahr. und Genussm. Ed. IV.

DE ONTLEDING DER KOOLHYDRATEN EN MEERWAARDIGE ALCOHOLEN.

Toen het verschil in morphologische en grof cultureele eigenschappen tusschen de diphtheriebacterie en de diphtheroïden, waaronder de bacterie v. Hofmann Wellenhof, niet voldoende in staat bleek te zijn, om deze organismen met zekerheid te onderscheiden, heeft men de ontleding der koolhydraten door deze organismen bestudeerd, in de hoop beide langs dezen biochemischen weg van elkaar te kunnen onderscheiden. Bovendien zou men mogelijk op de basis van deze vergistingsproeven een systematische indeeling van de diphtheroïden onderling kunnen verkrijgen.

Zooals bekend is, zijn de bacteriën in staat fermenten te vormen en af te scheiden om daardoor stoffen om te zetten in producten, die zij door middel van diffusie tot zich kunnen nemen.

Zoo zijn zij door afsplitsing van carbohydrasen in staat de groep der koolhydraten te ontleden.

Deze ontleding der koolhydraten heeft men in 't algemeen aangeduid met den naam „vergisting", feitelijk onjuist, omdat men bij een vergisting denkt aan gasvorming, die hier intusschen niet altijd bij plaats heeft.

Onder vergisting verstaat men het uiteenvallen van een koolhydraatmolecuul in moleculen van eenvoudiger samenstelling, welke ontleding al of niet gepaard gaat met gasontwikkeling. Het is gebleken, dat de diptheriebacterie en de meeste diphtheroïden bij de monosacchariden een ontleding veroorzaken, die aanspraak maakt op den naam van gemengd zure gisting.

Hierbij worden n.l. een aantal organische zuren gevormd, terwijl soms sporen alcohol en aldehyde kunnen worden aangetoond.

De talrijke systematische indeelingen van de diphtheriebacterie en van de diphtheroïden, berustende op de ontleding der koolhydraten, dateeren zeker wel van 1888, toen Roux en Yersin mededeelden, dat de diphtheriebacterie in staat bleek, zwak alkalischen bouillon tijdelijk zuur te maken. Zij stelden echter alleen een zure reactie tegenover lakmoes vast, zonder intusschen op 't chemisme van deze zaak dieper in te gaan. Escherich, Fränkel, Peters en Neisser hebben zelfs de moeite genomen om deze hoeveelheid zuur te bepalen met behulp van normaal loog, phenolphtaleïne als indicator, maar zij bekommerden zich noch om den aard, noch om de hoeveelheid van de in deze voedingsmedia voorkomende zuren.

In 1889 kwam Zarniko met de mededeeling, dat de pseudo-diphtheriebacterie van v. Hofmann Wellenhof geen zuur vormde in bouillon, zoodat men dit als de eerste systematische indeeling mag beschouwen, die gebaseerd is op de ontleding van suikers.

Vanaf 't moment, dat Spronck in 1895 attent maakte op 't feit, dat deze zuurvorming te wijten was aan sporen glucose in den bouillon aanwezig, heeft deze ontleding der suikers zeer de aandacht getrokken en heeft zij haar intrede gedaan in de bacteriologische diagnostiek.

Wanneer men de verschillende litteratuuropgaven eens met elkaar vergelijkt, dan blijkt, dat deze elkaar, zooals

meer, tegenspreken. Dit zal eensdeels toe te schrijven zijn aan het verschil in samenstelling der gebruikte voedingsbodems, anderdeels aan de mogelijk onzuivere samenstelling der gebruikte koolhydraten.

Men denke slechts aan bouillon, afkomstig van paardenvleesch, dat rijk is aan glucose. Deze voedingsbodem werd vroeger veel gebruikt als grondstof voor de koolhydraatoplossing. Het is begrijpelijk, dat in dergelijke suikerbouillonoplossingen, na enting met de diphtheriebacterie, een zuurvorming geconstateerd kon worden.

Wat de zuiverheid der chemische producten betreft, denke men aan de handelsdextrine, die naast dextrine, steeds glucose bevat en waarbij dus na enting met de diphtheriebacterie eveneens een zure reactie valt waar te nemen. Zoo zal saccharose, dat een weinig invertsuiker bevat, eveneens een foutieve uitkomst kunnen geven.

Hierbij komt nog 't feit, dat men 't begrip „pseudo-diphtherie bacterie" nergens duidelijk vindt omschreven en iedere onderzoeker er zijn eigen beteekenis aan hecht.

Men behoeft er zich dus niet over te verwonderen, dat de litteratuuropgaven over de suikervergistingen zéér uiteenloopend zijn.

Zonder uitzondering echter is door latere onderzoekers vastgesteld, dat de diphtheriebacterie glucose binnen 24 uur splitst onder zuurvorming, dat de pseudo-diphtheriebacterie van v. Hofmann Wellenhof dit vermogen mist, en dat er nooit gas gevormd wordt.

Helaas zijn er onder de diphtheroïden weer een aantal, die glucose aantasten onder zuurvorming, zoodat men met behulp van deze ééne suiker niet in staat is, de organismen te onderscheiden.

Ook zal men met behulp van de suikervergistingen geen scheiding kunnen maken tusschen de virulente en avirulente diphtheriebacteriën, daar deze zich volkomen gelijk gedragen. In dit geval is men dan ook uitsluitend op het dierexperiment aangewezen.

In de bacteriologische diagnostiek zal men dus bij gebruik van glucose bij een negatieven uitslag (geen zuurvorming) besluiten op **afwezigheid** van de diphtheriebacterie; bij een positieven uitslag (zuurvorming) zal men alleen in verband met het klinische beeld op de **aanwezigheid** ervan mogen besluiten.

OVERZICHT VAN DE BELANGRIJKSTE UITKOMSTEN, BETREFFENDE DE SUIKERVERGISTINGEN.

Park en Beebe baseerden hunne indeeling op de zuurvorming in bouillon en verdeelden de organismen in 3 groepen:

1e. virulente diphtheriebacteriën, zuur vormend in bouillon;

2e. avirulente diphtheriebacteriën, zuur vormend in bouillon;

3e. avirulente bacteriën, gelijkend op de diphtheriebacteriën, niet zuur vormend in bouillon. Dat was de groep der pseudo-diphtheriebacteriën, waarin de bacterie van v. Hofmann Wellenhof thuis hoorde.

Een jaar later, 1896, deelt Theobald Smith mede,

dat de diphtheriebacterie saccharose en lactose niet aangrijpt.

Ritter zegt, dat de pseudo-diphtheriebacterie ook zuur vormt uit peptonsuikerbouillon.

In 1898 schrijft Martin, dat de diphtheriebacterie wel splitst: glucose, galactose, laevulose, saccharose en glycerine; daarentegen glycogeen, amylum, lactose, maltose, raffinose, arabinose, erythriet, dulciet en manniet onveranderd laat.

Hij is dus de eerste geweest, die de diphtheriebacterie op een reeks koolhydraten entte; maar zijn onderzoekingen zijn slechts gedeeltelijk bevestigd geworden.

In 't zelfde jaar spreekt Kurth van een zuurvormende pseudo-diphtheriebacterie, „Bacterium diphtericum acidumfaciens" — een saccharose splitsend organisme, dat verder weinig gelijkenis vertoont met de diphtheriebacterie.

In 1904 heeft Knapp deze splitsing uitvoerig bestudeerd en gebruikte als grondstof het serumwater van Hiss *), waaraan hij koolhydraat en lakmoes toevoegde.

Deze voedingsbodem heeft het voordeel, dat de bacteriën er goed op zullen groeien; het nadeel, dat hij gecompliceerd is.

Knapp las de resultaten af na 24—48 uur bij 37° C. en vond:

---

*) Serumwater van Hiss:
1 deel runderserum, 3 dln. water, verhitten op 100° C.
Vervolgens toevoegen 5 % lakmoesopl. en 1 % koolhydraat.
Alles 3 opeenvolgende dagen 10 min. steriliseeren bij 100° C.

	glucose	maltose	lactose	sacch.	dextrine	manniet
diphth. bact.	+	+	?	—	+	+
pseudo-diphth. bact.	—	—	—	—	—	—

Het is eigenaardig, dat manniet ontleed werd onder zuurvorming; waarschijnlijk zal de stof chemisch niet volkomen zuiver zijn geweest, daar deze splitsing later nooit meer is bevestigd geworden.

Theobald Smith heeft toen de ontleding der koolhydraten ook op den voedingsbodem van Hiss nagegaan. Hij onderzocht: glucose, maltose, lactose, saccharose, dextrine, glycerine en manniet.

Hiervan werden zonder uitzondering gesplitst: glucose, maltose en dextrine. Saccharose en manniet werden niet gesplitst, terwijl lactose en glycerine wisselende uitkomsten gaven.

Later onderzocht hij nog eens 22 stammen, waarvan 19 saccharose splitsten, maar hij geeft van dit merkwaardig resultaat geen uitleg, terwijl ook niets omtrent de virulentie van deze stammen bekend is.

Zijn eindconclusie, wat betreft de suikersplitsing luidt:

de diphtheriebacterie splitst steeds glucose, galactose, laevulose, maltose,

splitst meestal, mits de bacteriën er maar lang genoeg mede in aanraking blijven: dextrine en glycerine,

splitst ongeregeld lactose en saccharose, terwijl eindelijk manniet nooit wordt gesplitst.

De vraag was nu **kan** de diphtheriebacterie saccharose splitsen en waarom gedraagt lactose zich zoo wisselend.

Zinnser heeft toen in 1907 dit vraagstuk ter hand genomen en vastgesteld, dat de wisselende uitkomsten met lactose gezocht moesten worden in de samenstelling van deze suiker. Zinnser stelde de volgende formule voor de diphtheriebacterie vast:

glucose	galact.	laevul.	maltose	lactose	sacch.	dextr.	manniet	dulciet
+	+	+	+	±	−	+	−	−

Deze resultaten werden bevestigd door Priestley, Morse en Kolmer.

In 1921-'22 verschijnt er uit het Lister Institute een publicatie, waaruit blijkt, dat 68 diphtheriestammen, waarvan 51 virulente en 17 avirulente zich volkomen gelijk gedragen en wel werden vergist:

glucose, galactose, maltose en dextrine, terwijl saccharose en manniet niet aangetast werden en lactose soms aangetast werd.

Onderzoekingen van recenten datum, Eagleton en Baxter, Okell en Baxter bevestigen allen 't feit, dat de diphtheriebacterie saccharose **niet** kan splitsen. Wat de intensiteit van splitsing door dit organisme betreft, staat glucose vooraan, dan volgt dextrine, maltose en galactose. Als maatstaf gold hiervoor de tijd, waarin de splitsing waargenomen werd. Christiansen bepaalde de grootte van dit splitsend vermogen door colorimetrische metingen van de pH op verschillende tijden. Deze pH steeg voor glucose-bouillon tot een bepaald maximum; in media, die lactose, saccharose of manniet bevatten, werd geen verandering in de pH opgemerkt.

In 1908 had Lubenau reeds een dergelijke reeks opgemaakt; het fermentatief vermogen neemt af in de volgorde: glucose, dextrine, maltose, laevulose, lactose, saccharose.

Wat betreft het labiele gedrag van de diphtheriebacterie tegenover lactose, hebben latere waarnemingen, waarbij voedingsbodems op verschillende wijze werden bereid, uitgemaakt, dat deze suiker **niet** vergistbaar is.

Morse heeft eene indeeling gegeven van de diphtheriebacterie, de pseudo-diphtheriebacterie en de diphtheroïden volgens hare eigenschappen en daarin opgenomen de suikervergisting.

	invol. vorm	Neisser	gluc.	malt.	sacch	glyc.	dextrine	toxine	groei
diphth. bact.	+	+	+	+	−	+	±	+	middelmatig
pseudo-diphth. bact.	−	−	−	−	−	−	−	−−	overvloedig of weinig

Mellon en Eberson onderzochten de bacteriën in suikervrijen bouillon en maakten een indeeling in 6 groepen; in 1918 gaf Eberson nog eens een veelomvattend overzicht van de diphtheriebacterie en de diphtheroïden en verdeelde ze in 9 groepen.

Lubinsky onderzocht in 1922 een aantal stammen in een 1 % koolhydraatlakmoespeptonoplossing en stelde na 24 uur de volgende formule vast:

	aantal stamm.	gluc.	mannose	galact.	laev.	lact.	sacch.	dextr.	glyc.
diphth. bact. .	18	+	+	+	+	—	—	—	—
paradiphth. . .	41	+	+	+	+	—	+	—	—
pseudo-diphth. bact	5	—	—	—	—	—	—	—	—

Wat betreft de ontleding van glycerine door de diphtheriebacterie, trad na 4 dagen eene verandering op; de oplossing was toen zwak rood, na 5 dagen rood gekleurd.

't Onderscheid tusschen de paradiphtheriebacterie en de

	aantal stamm.	gluc.	galact.	malt.	sacch.	lact.	dextr.	mannit
I	15	+	+	—	+	—	—	—
II	11	+	—	—	+	—	—	—
III	11	+	—	+	—	—	—	—
IV	6	+	—	±	—	—	—	—
V	4	+	+	+	—	—	—	—
VI	4	+	+	+	+	+	—	—
VII	5	+	—	+	+	—	—	—
VIII	3	+	+	+	+	—	—	—
IX	1	+	+	+	+	+	+	—
X	1	+	+	—	+	—	—	+
XI	18	—	—	—	—	—	—	—

diphtheriebacterie is dus o.a. vast te stellen met behulp van de saccharosepeptonlakmoesoplossing, waarop de eerste steeds zuur vormt.

In 1923 werd door Andrews en zijne medewerkers een verdeeling gegeven van 46 stammen diphtheroïden, waarvan 36 uit de keel en 10 uit de neus afkomstig waren. Zij waren genoodzaakt deze diphtheroïden volgens de eigenschappen der suikervergisting onder te brengen in 11 groepen, waarin de bacterie v. Hofmann Wellenhof kan terug gevonden worden in groep XI.

Hoewel het niet vermeld wordt, zullen deze onderzoekers wel den voedingsbodem van Hiss gebruikt hebben, omdat zij bij 't zuur worden van een gelijktijdige stremming spreken.

Bovendien onderzochten ze 68 diphtheriestammen, waarvan 17 avirulent en 51 virulent waren. Zij hadden alle de volgende vergistingsformule:

glucose	galactose	maltose	sacch.	lactose	dextrine	manniet
+	+	+	−	−	+	−

Wil de gistbaarheid der koolhydraten dus leiden tot identificatie van het organisme, dan zal men het op een reeks dezer lichamen moeten enten.

Zoo heeft glucose, althans voor de onderverdeeling der diphtheroïden weinig waarde, omdat deze suiker alleen de bacterie v. Hofmann Wellenhof scheidt van de rest.

De groep, die de splitsingsformule van de diphtheriebacterie 't meest nabij kwam, is groep V. Het bleek, dat

hiertoe 4 stammen behoorden, die glucose, galactose en maltose konden ontleden, terwijl saccharose, lactose, dextrine en manniet resistent bleken te zijn. De diphtheriebacterie zou dan bovendien dextrine kunnen splitsen. Volgens hunne eigen waarnemingen verschillen de zoogenaamde zuivere dextrinen sterk in roteerend en reduceerend vermogen, zoodat zij het daarom beter vinden dextrine in deze buiten beschouwing te laten.

Groep V stelt dus vermoedelijk de avirulente diphtheriebacterie voor.

Volgens Paul Engering 1923 zou de diphtheriebacterie maltose als regel vergisten; de diphtheroïden gedragen zich verschillend ten opzichte van dit disaccharide. Lactose zou nu eens wel, dan weer niet gesplitst worden, zoodat hij uit zijn waarnemingen als formule voor de diphtheriebacterie vaststelt:

mannose	galactose	glucose	laevulose	sacchar.	maltose	lactose
+	+	+	+	−	+	±

Saccharose is dus het eenigste disaccharide, dat met zekerheid niet aangetast wordt.

v. Pesch geeft een systematisch overzicht van deze bacteriën en deelt ze in 6 groepen. De suikerpeptonvoedingsbodem was door v. Pesch ingesteld op pH 7.8. In de 6e groep brengt hij alles onder wat hij niet in de overige 5 groepen kan plaatsen, zoodat deze verdeeling stellig nog voor uitbreiding vatbaar is.

Hij constateert de vergistbaarheid van de diphtherie-

bacterie ten opzichte van glucose en laevulose met zekerheid; die van maltose is twijfelachtig, terwijl lactose en saccharose niet ontleed worden. De bacterie van v. Hofmann Wellenhof kan ook volgens deze onderzoekingen geen suikersplitsende fermenten afscheiden.

De laatste mededeeling over deze vergisting is die van Bitter, Gundel en Garcia Sancho. Zij meenen namelijk met behulp van de bepaling van de pH in glucosepeptonoplossingen te kunnen uitmaken of men met een diphtheriestam dan wel met een diphtheroïde te doen heeft.

Zij gaan uit van een glucosepeptonoplossing met pH 6.9 en bepalen na enting met de onbekende bacterie de pH opnieuw na 4 dagen. Is de pH $<$ 6.5, dan is de onbekende een diphtheriestam, is daarentegen de pH na 5 dagen $>$ 6.5, dan is 't een diphtheroïde.

EIGEN ONDERZOEK.

Zooals uit voorgaand overzicht blijkt, is de ontleding der koolhydraten door de diphtheriebacterie en de diphtheroïden reeds vele malen qualitatief een onderwerp van studie geweest. Langzamerhand ziet men wat meer overeenstemming in de resultaten, maar men zal deze uitkomsten alleen dan mogen vergelijken, wanneer de omstandigheden, waaronder de geënte bacterie groeit, volkomen dezelfde zijn.

Bij de bestudeering van het gedrag van de diphtheriebacterie, van de bacterie v. Hofmann Wellenhof en der overige diphtheroïden tegenover de verschillende koolhydraten, zou 't zeker de voorkeur verdienen, deze chemische stoffen in een zéér eenvoudigen voedingsbodem, waarvan de scheikundige samenstelling volkomen bekend is, op te lossen. Alleen dan zal men aan den uitslag van dit onderzoek de meeste waarde kunnen hechten.

Maar in 't algemeen zijn bacteriën — en in 't bijzonder de diphtheriebacteriën — zeer kieskeurig en niet in staat om zich in een anorganisch milieu behoorlijk te ontwikkelen. Zoo bleek een zeer eenvoudige voedingsbodem, bestaande uit 0.5 % natriumchloride, 0.5 % glycerine en wat lakmoesoplossing totaal ongeschikt.

Zoowel diphtheriebacteriën als diphtheroïden waren binnen 4 × 24 uur dood. De meeste onderzoekers kozen dan ook als milieu den serumvoedingsbodem volgens Hiss, waarop bacteriën ongetwijfeld snel groeien. Daartegenover staat, dat men hier een aantal gecompliceerde eiwitverbindingen heeft, terwijl runderserum bovendien sporen glucose kan bevatten.

v. P e s c h was bovendien de meening toegedaan, dat de fermentatieve kracht der bacteriën verband houdt met den aard van den voedingsbodem. Wanneer men een diphtheriebacterie bijv. laat groeien op een voedingsbodem, die naast pepton nog serum als stikstofbron bevat, dan zal volgens hem de stikstofvrije koolstofbron minder aangegrepen worden, dan wanneer deze alleen pepton zou bevatten. Aldus zou de gewone koolhydraatpeptonlakmoesoplossing een geschikt milieu zijn om de vergisting dezer stoffen na te gaan. Afgezien van dit feit werden de organismen op den volgenden voedingsbodem geënt:

1 % pepton „W i t t e"
0,5 % koolhydraat
0,5 % natriumchloride
2 % lakmoesoplossing volgens K a h l b a u m.

Zoowel glaswerk als peptonoplossing werden vooraf gesteriliseerd om de koolhydraten zoo kort mogelijk aan verhitting bloot te stellen. Vervolgens werden koolhydraat en lakmoesoplossing toegevoegd en deze oplossing overgebracht in steriele reageerbuizen, voorzien van steriele gistbuisjes. Deze buizen met koolhydraatoplossing werden dan opnieuw gesteriliseerd; hetzij drie opeenvolgende dagen gedurende korten tijd, hetzij éénmaal gedurende 30—40 minuten bij 100° C. Tenslotte werden ze op steriliteit onderzocht. Van te voren was onderzocht en gebleken, dat deze pepton geen stoffen bevatte, die eveneens onder zuurvorming door de gebruikte organismen ontleed werden.

Van deze peptonoplossing werd de pH bepaald. Deze bleek 7,35 terwijl de glucosepeptonoplossing precies dezelfde pH had. Wanneer men nu in aanmerking neemt,

dat de pH bij 37° ± 0.25 daalt, dan was de pH van 't milieu, waarin de bacteriën groeiden pH 7.05—7.1. Aangezien de optimum-groei voor de diphtheriebacterie ontstaat in een milieu pH 7—7.5, werd aan dezen voedingsbodem niets veranderd, te meer daar men bij een pH, die vlak bij 7 ligt, eerder zuurvorming zal kunnen constateeren, dan uitgaande van een pH 7.8 (7.5 bij 37° C.). De buizen werden zooveel mogelijk geënt met een normaal oogje van een 24 uur oude, bij 37° C. gekweekte glycerineserumcultuur. De groeitemperatuur was op 35°—37° C. ingesteld bij atmospherischen druk.

Na 24 uur werd beoordeeld of al dan niet ontleding had plaats gehad; vervolgens werden de culturen dagelijks gedurende 14 dagen gecontroleerd, terwijl voortdurend op identiteit en steriliteit der bacteriën, resp. voedingsbodems werd gelet.

De navolgende meerwaardige alcoholen, suikers en andere koolhydraten, alle chemisch zuivere lichamen, werden onderzocht:

P e n t o s e n — arabinose, xylose, rhamnose.

H e x o s e n — mannose, glucose, galactose, laevulose, l gulose, l idose.

D i s a c c h a r i d e n — maltose, trehalose, saccharose, lactose.

T r i s a c c h a r i d e — raffinose.

P o l y s a c c h a r i d e n — dextrine, amylum.

D r i e w a a r d i g a l c o h o l — glycerine.

H e x i e t e n — manniet, sorbiet, dulciet.

Dextrine werd in het laboratorium, uitgaande van handelsdextrine, zuiver bereid; alle proeven werden in duplo ingezet. Het is mij meermalen gelukt, om omgekeerd met

behulp van de suikervergisting infectie van een stam vast te stellen. Zoo werd saccharose een enkele maal door een diphtheriestam gesplitst onder zuurvorming. Bij contrôle bleek, dat deze stam meestentijds vergezeld werd van coccen. Uit de na 24 uur verkregen resultaten, die in de tabel zijn vereenigd, blijkt:

1e. dat de pentosen: arabinose, xylose en rhamnose **niet** gesplitst worden door de diphtheriebacteriën;
2e. dat deze **wel** in staat zijn de hexosen: mannose, glucose, galactose en laevulose te splitsen, **niet** daarentegen l gulose en l idose;
3e. wat de disacchariden betreft, dat zij lactose, trehalose en saccharose **niet** splitsen. Maltose gedraagt zich twijfelachtig, na langer dan 24 uur is deze reactie **wel** positief;
4e. dat het trisaccharide raffinose **niet** gesplitst wordt;
5e. dat de genoemde 6 waardige alcoholen evenmin als
6e. de polysacchariden: dextrine en amylum worden aangetast;
7e. dat de 3-waardige alcohol glycerine na 't genoemde tijdsverloop **niet** gesplitst wordt.

Wat evenwel de ontleding van glycerine in peptonlakmoesoplossing betreft, zoo wordt deze wel gesplitst na verloop van 2 à 3 dagen, zoodat deze vertraagd positief verloopt. Hetzelfde werd geconstateerd door L u b i n s k i, die na 4 dagen een twijfelachtige reactie vaststelde, die na 5 dagen duidelijk positief was. Vermoedelijk had zijn gebruikte oorspronkelijke voedingsbodem een hoogere pH dan 7.05. Bovendien zal deze reactie beïnvloed worden door de hoeveelheid materiaal, waarmee geënt wordt.

De beide bacteriën v. Hofmann Wellenhof B en de drie stammen v. Hofmann Wellenhof A (I_7, I_8 en v. R.) tasten zooals de tabel aangeeft, **geen** der gebruikte stoffen aan, zelfs niet na 14 dagen. Integendeel was de kleur der geënte oplossing ten opzichte van de blanco's vaak iets blauwer geworden. Deze verhoogde alkaliciteit zou dus overeenkomen met de in de litteratuur vermelde waarnemingen.

Eenige andere diphtheroïden, als Lister en Krall, gedragen zich in 't geheel niet als bacteriën van v. Hofmann Wellenhof.

Beschouwt men 't gedrag van Bacterium cutis communis, waarschijnlijk identiek met de paradiphtheriebacterie van Lubinski, dan blijkt, dat deze van de pentosen alleen arabinose ontleedt.

Verder worden dezelfde monosacchariden gesplitst als door de diphtheriebacterie en wel blijkbaar in sterker mate. Van de disacchariden wordt alleen saccharose sterk aangegrepen. Lactose wordt nooit gesplitst, wat bij 't melkonderzoek bevestigd werd. In ieder geval maakt dit organisme geen aanspraak op den naam van „pseudo"-diphtheriebacterie. Wat eindelijk betreft het gedrag van diphtheroïden, afkomstig uit kippenkelen, ziet men, dat ze zich verschillend gedragen, dat ze nagenoeg dezelfde suikers splitsen als de diphtheriebacterie, maar dat hun fermentatieve werking minder krachtig is. Ten opzichte van glycerine onderscheiden ze zich van deze laatste, doordat ze **nooit** zuur vormen, zelfs niet na 14 dagen.

De hexieten en polysacchariden hebben dus voor dit onderzoek als differentieel diagnosticum niet de minste waarde.

Een differentieel diagnostische voedingsbodem voor Bacterium cutis communis is de arabinose-peptonlakmoesoplossing en de saccharosepeptonlakmoes-oplossing, terwijl glycerine als zoodanig in aanmerking komt om na 2 à 3 maal 24 uur de diphtheriebacterie van de diphtheroïden te onderscheiden.

NA 1 × 24 UUR

STAMMEN	PENTOSEN			MONOSACCHARIDEN						DISACCHARIDEN				Tri sacchar.	POLY-SACCHAR.		3 w. alcoh.	HEXIETEN			
	arabinose	xylose	rhamnose	glucose	mannose	galactose	laevulose	l idose	l gulose	maltose	sacch.	lactose	trehalose	raffinose	dextr.	amylum	glycerine	manniet	sorbiet	dulciet	gas
844	±	—	—	+	+	+	+	—	—	zw.+	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
473	—	—	—	+	+	+	+	—	—	zw +	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Poels	—	—	—	+	+	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
1314	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
1825	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
R I	—	—	—	+	+	zw.+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
R II	—	—	—	+	+	zw.+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
C. L. II	—	—	—	+	+	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Amsterdam	—	—	—	+	+	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Amerika I	—	—	—	+	+	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Amerika II	—	—	—	+	+	+	+			±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Ba.	—	—	—	+	+	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Smit	—	—	—	+	+	+	+	—	—		—	—	—	—	—	—	na 3 d	—	—	—	—
Diphth. 2	—	—	—	zw.+	+	zw.+	+			—	—	—	—	—	—	—	— +	—			—
Diphth. 4	—	—	—	+	+	+	+			+	—	—	—	—	—	—	— +	—			—
Diphth. 5	—	—	—	zw.+	+	zw +	+			—	—	—	—	—	—	—	— +	—			—
Di. Parijs I	—	—	—	+	+	+	+			±	—	—	—	—	—	—	— +	—	—	—	—
Di. Parijs II	—	—	—	+	+	+	+			zw.+	—	—	—	—	—	—	— +	—			—
Holland	—	—	—	+	+	+	+			+	—	—	—	—	—	—	— +	—			—
334	—	—	—	+	+	+	+				—	—	—	—	—	—	— +	—			—
No. 5	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Bact. v. H. W. B I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
Bact. v. H. W. B II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—
I_7		—		—	—	—	—			—	—	—	—	—	—	—	— —	—			—
I_8		—		—	—	—	—			—	—	—	—	—	—	—	— —	—			—
v. R.		—		—	—	—	—			—	—	—	—	—	—	—	— —	—	—	—	—
Bact, cutis communis	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—		—			—
Diphtheroïd No. 1		—		zw.+	—	—	±			—	—	—		—	—	—	— —	—			—
Diphtheroïd No. 2		—		+	—	—	±			—	—	—		—	—	—	— —	—			—
Diphtheroïd No. 3		—		+	+	+	+			—	—	—		—	—	—	— —	—			—
Diphtheroïd No. 4		—		±	—	±	±			—	—	—		—	—	—	— —	—			—
Pseudo di. Lister		—		+	+	+	+			+	+	+		—	—	—		—			—
Pseudo di. Krall		—		+	+	+	+			±	—	—		—	—	—	— —	—			—
A afkomstig uit de keel van Weensche	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— —	—	—	—	—
B kinderen.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—

Tenslotte werd een kort onderzoek ingesteld naar den aard der ontledingsproducten en wel qualitatief. Ook hiervoor werd weer gebruik gemaakt van een peptonoplossing, bereid volgens 't gegeven voorschrift, waaraan toegevoegd werd 0.5 % koolhydraat. Daar de omzettingen, die de micro-organismen hadden veroorzaakt, niet alleen afkomstig behoefden te zijn van de toegevoegde suiker, omdat dit niet de eenigste koolstofbron was, werd tegelijkertijd een peptonoplossing zonder koolhydraattoevoeging geënt met denzelfden diphtheriestam en beide oplossingen na denzelfden termijn aan een qualitatief onderzoek onderworpen (na 4—6 weken). Eerstens werd de zuurgraad van 25 cm^3 cultuurvloeistof vastgesteld door neutralisatie met $^1/_{10}$ N. NaOH, phenolphtaleïne als indicator. Volgens dit titercijfer werd de overige vloeistof geneutraliseerd en daarna aan destillatie met stoom onderworpen. Dit alkalische destillaat werd, ten opzichte van congopapier, zwak zuur gemaakt en opnieuw gedestilleerd. In dit destillaat werd gereageerd op

1e. alcohol,
2e. aldehyde,
3e. aceton,
4e. reduceerende stoffen.

De inhoud der kolf werd thans zuur gemaakt, ten opzichte van congo, met verdund zwavelzuur en aan destillatie met stoom onderworpen.

Ongeveer 1½ L. werd overgedestilleerd en na neutralisatie met $^1/_{10}$ N. NaOH op het waterbad ingedampt tot een klein volume. Hierin werd gereageerd op de volgende zuren:

1e. mierenzuur,

2e. azijnzuur,

3e. melkzuur.

De rest in de kolf werd op het waterbad tot een klein volume ingedampt, overgebracht in een perforator en gedurende 6 uur met aether geperforeerd. In dit perforaat werd na verwijdering van den aether gereageerd op:

1e. oxaalzuur,

2e. wijnsteenzuur,

3e. appelzuur,

4e. barnsteenzuur,

5e. melkzuur.

Alcohol werd aangetoond met behulp van de reactie van Lieben. Nu is deze reactie geenszins specifiek en slechts bewijzend, indien andere lichamen, die de groep $CH_3 . CO$ of $CH_3 . CHOH$ bevatten, afwezig zijn. Daar de jodoformreactie meestal min of meer positief was en de aldehydereactie eveneens, is dus moeilijk uit te maken of sporen alcohol aanwezig waren. Bovendien was het s.g. van het destillaat te gering, om van de eventueel daarin aanwezige alcohol bijv. de azijnzure ester te maken en aethylacetaat aan den reuk te herkennen. Op aldehyde werd gereageerd met Schiff's reagens en met een ammoniakale zilveroplossing volgens 't voorschrift van Tollens.

Op aceton werden de reacties van Gunning-Reynold en die van Legal uitgevoerd.

Met behulp van Fehling's proefvocht werd zoowel in de koude als, na verwarming, naar reduceerende stoffen gezocht.

Mierenzuur werd aangetoond door reductie van zilvernitraat en sublimaat.

Azijnzuur werd aan den reuk van den aethylester en microchemisch als natrium-uranylacetaat herkend.

Oxaalzuur kon evenmin als wijnsteenzuur en appelzuur worden aangetoond.

Barnsteenzuur werd aangetoond door de perforatierest op te lossen in alcohol, deze tot koken te verhitten en hierbij een oplosbaar bariumzout te voegen en eenigen tijd op kooktemperatuur te houden. Het bariumsuccinaat slaat neer; na affiltreeren wordt dit ontleed door zuur en aan microsublimatie onderworpen, waarna met loodacetaat de bekende ruiten van loodsuccinaat ontstaan.

Melkzuur werd aangetoond na oxydatie met kaliumbichromaat en zwavelzuur als aldehyde en microchemisch als cobaltlactaat.

In de peptonoplossing, die, ter contrôle naast die met glucose, geënt was met denzelfden stam, waren alcohol en aldehyde practisch afwezig. Melkzuur was twijfelachtig aanwezig, terwijl de andere vluchtige verbindingen en zuren **niet** konden worden aangetoond.

De glucosepeptonlakmoesoplossing, geënt met dezelfde diphtheriestam, op volkomen dezelfde wijze onderzocht, gaf het volgende resultaat.

jodoformreactie positief.

aldehyde spoor.

aceton afwezig.

reduceerende producten afwezig.

In het destillaat, verkregen na destillatie met stoom, konden worden aangetoond:

mierenzuur.

azijnzuur.
melkzuur.
In de perforatierest:
barnsteenzuur en
melkzuur.

Een tweede glucosepeptonlakmoesoplossing met een anderen diphtheriestam geënt leverde 't zelfde resultaat.

Daar de beide eerste termen van de verzadigde vetzuurreeks met zekerheid konden worden aangetoond, rees de vraag of ook propionzuur en boterzuur zouden gevormd worden temeer, daar bij het aantoonen van azijnzuur als aethylacetaat meerdere esters werden waargenomen en o.a. de reuk van aethylpropionaat eenigszins op den voorgrond trad.

Om dit zuur aan te toonen, werd opnieuw een diphtheriestam geënt in glucosepeptonlakmoesoplossing en na een maand onderzocht.

Het destillaat van de vluchtige zuren werd na neutralisatie ingedampt en opnieuw werden, na aanzuren met zwavelzuur, de vluchtige zuren overgedestilleerd. De laatste cm^3, die overgingen, werden afzonderlijk gehouden, geneutraliseerd met kalkwater en opnieuw ingedampt tot droog. Uitgetrokken met water, vormden zich, na toevoegen van bariumacetaat, kristallen van bariumpropionaat, die microchemisch te herkennen zijn als octaëderachtige kristallen. Bovendien werd van de rest de ester gemaakt met aethylalcohol, waarvan de reuk de aanwezigheid van propionzuur bevestigde.

Boterzuur, dat zich microchemisch laat herkennen als zilver- en als koperzout, kon niet worden aangetoond.

Vervolgens werd een mannosepeptonlakmoesoplossing

geënt met een diphtheriestam en na een maand op dezelfde wijze onderzocht. Ook hierin konden worden aangetoond:

alcohol?
aldehyde.
mierenzuur.
azijnzuur.
propionzuur.
melkzuur.
barnsteenzuur.

Ook Bacterium cutis communis werd op glucosepeptonlakmoesoplossing geënt.

Hierin werden na verloop van 6 weken aangetoond:

alcohol?
aldehyde.

Zwakke reductie van Fehling's proefvocht na verwarming.

mierenzuur.
azijnzuur.
propionzuur.
melkzuur.
barnsteenzuur.

De reacties op alcohol en aldehyde waren sterker dan die in de diphtherieglucoselakmoescultuur.

Ook was de totale zuurgraad hooger, zoodat Bacterium cutis communis meer zuren vormt dan de diphtheriebacterie.

Tenslotte werd een saccharosepeptonlakmoesoplossing geënt met Bacterium cutis communis en eveneens na een maand onderzocht.

Het ligt voor de hand, dat hierin dezelfde producten zullen gevonden worden.

Ook hier waren de reacties veel sterker dan bij de diphtheriestammen. Gevonden werden:

alcohol?

aldehyde.

Reductie van Fehling's proefvocht na verwarming.

mierenzuur.

azijnzuur.

propionzuur.

melkzuur.

barnsteenzuur.

In een glucosebouillonoplossing werd na enting met de verschillende organismen gereageerd op aethylmethylcarbinol volgens Voges en Proskauer. Wanneer een 48 uur oude glucosebouilloncultuur bedeeld wordt met 10 % NaOH oplossing en hevig geschud, treedt bij aanwezigheid van aethylmethylcarbinol eene eosineroode verkleuring op. Noch een der diphtheriebacteriën, noch de beide bacteriën van v. Hofmann Wellenhof of Bacterium cutis communis hadden dit lichaam gevormd.

Een enkele cultuurvloeistof werd ten slotte nog onderzocht op de aanwezigheid van acetylmethylcarbinol met behulp van de reactie van Lemoigne. (Zie o.a. Kluyver, Donker en Visser 't Hooft.)

De diphtheriebacterie had evenmin als de onderzochte diphtheroïden acetylmethylcarbinol gevormd.

Resumeerende blijkt uit dit onderzoek:

1e. de diphtheriebacterie splitst na 1 maal 24 uur alleen de monosacchariden: glucose, mannose, galactose en laevulose;

2e. de driewaardige alcohol glycerine wordt door de diphtheriebacterie slechts langzaam gesplitst;

3e. de pseudo-diphtheriebacterie v. Hofman Wellenhof oefent geen fermentatieve werking op de koolhydraten en meerwaardige alcoholen uit;

4e. de diphtheroïden vergisten ongeveer dezelfde suikers als de diphtheriebacterie maar over 't algemeen is de splitsende kracht veel geringer. Bovendien wordt glycerine ook na langer tijd niet aangetast, terwijl Bacterium cutis communis saccharose en arabinose binnen 24 uur aantast onder zuurvorming.

5e. De diphtheriebacteriën kunnen uit glucose en mannose en Bacterium cutis communis kan uit glucose en saccharose de volgende ontledingsproducten doen ontstaan:
alcohol?
aldehyde.
mierenzuur.
azijnzuur.
propionzuur.
melkzuur.
barnsteenzuur.

LITTERATUUR.

Roux et Yersin. Annal. de l'Instit. Pasteur 2-629-1888.
Escherich. Berl. kl. Wochenschr. 30-492-520-549-1893.
Fränkel. Berl. kl. Wochenschr. 34-1087-1897.
Peters. Deutsche med. Wochenschr. 23-133-1897.
Neisser. Z. f. Hyg. u. Inf. 24-443-1897.
Zarniko. C. f. Bact. 6-153-177-224-1889.
Spronck. Annal. de l'Instit. Past. 9-758-1895.
Park and Beebe. Med. Res. 46-385-1894.
Theobald Smith. C. f. Bact. 18-1-1895.
Theobald Smith. C. f. Bact. 1896.
Theobald Smith. C. f. Bact. 22-45-1897.
Martin. Annal. de l'Inst. Pasteur 12-26-1898.
Knapp. J. med. Res. 12-475-1904.
Kurth. Z. f. Hyg. und Inf. 28-409-1898.
Ritter. Z. f. Hyg. und Inf. 1897.
Zinnser. Journ. med. Res. 17-277-1907-1908.
Priestly. Proc. Roy. Soc. Med. 5-1911-1912.
Morse. Journ. Inf. Dis. 11-253-1912.
Kolmer. Journ. Inf. Dis. 11-56-1912.
Eagleton and Baxter. Brit. med. Res. 1-139-1922.
Okell and Baxter. Brit. med. Res. 1-139-1922.
Christiansen. Paris 1923.
Lubenau. Archiv. f. Hyg. 66-305-1908.
Eberson. J. Inf. Dis. 23-1-1918.
Chalmers and Macdonald. J. trop. M. 23-85-1920.
Lubinsky. C. f. Bact. 85-96-1921.
Andrewes enz. Med. Res. Council. Diphtheria 1923.
Engering. C. f. Bact. 89-120-1923.
v. Pesch. C. f. Bact. 92-27-1924.
Bitter-Gundel, Garcia Sancho C. f. B. 97-132-1926.
Tollens. Berl. Ber. 14-1950-1881.
Lemoigne. Compt. Rend. 170-131-1920.
Kluyver, Donker en Visser 't Hooft. Bioch. Z. 161-364-1925.

ONTLEDING VAN PEPTON, TRYPTOPHAAN, TYROSINE EN ALANINE.

Ook over het vermogen van de diphtheriebacterie om al of niet indol te kunnen vormen uit een tryptophaanhoudenden voedingsbodem heerscht in de litteratuur verschil van meening.

Lehmann en Neumann, Palmirsky en Orlowski, Escallon, Since, Prochaska en anderen hebben indol na korteren of langeren tijd in peptonwater kunnen aantoonen. De meeste onderzoekers en vooral die van lateren datum o.a. Zipfel en Frieber hebben de diphtheriebacterie intusschen met zekerheid gerekend tot de anindologene organismen.

Deze verdeeldheid heeft hoofdzakelijk haar ontstaan te danken aan:

1e. het verschil in samenstelling der gebruikte voedingsbodems,
2e. de reacties, welke men toepast voor het aantoonen van indol,
3e. den tijd, na welken men de reacties uitvoert.

Wat den voedingsbodem betreft, gebruikte men vroeger over 't algemeen peptonwater om aan te toonen, of de bacterie àl of niet indol kon vormen.

Nu kunnen handelspeptonen zeer verschillend van samenstelling zijn. Er komen in den handel peptonsoorten voor, die heelemaal geen tryptophaanpeptiden bevatten, terwijl er aan den anderen kant peptonen bestaan, waarin reeds een weinig indol aanwezig is. In het eerste geval zal een micro-organisme daarin dus nooit indol kunnen

vormen; in het tweede geval is de uitkomst zonder contrôleproef waardeloos.

Daar tryptophaan de moederstof is, waaruit indol ontstaat, werden de volgende tryptophaanhoudende voedingsbodems bereid, teneinde daarop de indolvorming door de verschillende bacteriën na te gaan.

Als eenvoudige voedingsbodem werd de synthetische tryptophaanoplossing van Zipfel gebruikt, bestaande uit:

0.500 g tryptophaan.
5.0 g kaliumbiphosphaat.
3.0 g asparagine.
5.0 g ammoniumlactaat.
0.200 g magnesiumsulfaat.
1 L. gedestilleerd water.

Daar de diphtheriebacterie over 't algemeen slecht op dergelijke voedingsmedia groeit, leek het mij gewenscht, ter betere beoordeeling van deze reactie, haar in een geschikter milieu te brengen. Daarom werden de bovengenoemde bestanddeelen ook in 0.25 % peptonwater opgelost.

Tenslotte werd de indolvorming van enkele stammen nog nagegaan op de gewone 1 % peptonoplossing. Al deze oplossingen werden 3 achtereenvolgende dagen gedurende 30 minuten op 100° C. gesteriliseerd en na enting met de verschillende organismen 6 weken bij 37° C. geplaatst, omdat over 't algemeen een langere kweektijd gunstig is voor de indolvorming.

Frieber heeft proefondervindelijk bewezen, dat de toegepaste reacties niet afkomstig waren van de stikstofverbindingen ammoniumlactaat of asparagine, door achter-

eenvolgens voedingsbodems te bereiden, waarin deze stoffen ontbraken; in deze gevallen waren toch de reacties op de ontledingsproducten van het tryptophaan positief. Omgekeerd bereidde hij ook een voedingsbodem, waarin het tryptophaan ontbrak; in dat geval bleef de reactie dan ook uit, zoodat wij met zekerheid mogen aannemen, dat 't indol of zijn derivaten uit het tryptophaan gevormd worden.

DE INDOLREACTIE.

De drie voornaamste reacties op indol zijn:

1e. de reactie van Paul Ehrlich. Met het reagens van Ehrlich in de sterk zoutzuurhoudende cultuur, ontstaat, indien indol aanwezig is, een kersroode verkleuring. Die kleurstof kan uitgeschud worden in amylalcohol en chloroform; niet in aether, benzol en toluol. Toevoeging van een weinig natriumnitrietoplossing versterkt de kleur, terwijl door toevoeging van veel nitriet een kleurloos product ontstaat.

2e. de reactie van Salkowski. Wordt de cultuurvloeistof gemengd met ⅓ van haar volume, met 50 % zwavelzuur en vervolgens zeer voorzichtig 0.02 % natriumnitrietoplossing toegevoegd, dan ontstaat bij aanwezigheid van indol op het scheidingsvlak een roode ring. Deze kleurstof kan weer door amylalcohol en chloroform aan de vloeistof onttrokken worden (nitroso-indolreactie).

3e. de nitroprussidnatriumreactie volgens Legal-Weyl. Worden 5 cm^3 zwak alkalisch gemaakte cultuurvloeistof bedeeld met 0.5—1 cm^3 2 % nitroprussidnatrium-

oplossing en deze vervolgens met azijnzuur zuur gemaakt, dan ontstaat een fraaie blauwe kleur bij aanwezigheid van indol. In de gewone uitschudmiddelen gaat deze kleurstof **niet** over.

De reactie van Salkowski en Ehrlich vindt men in de bacteriologie algemeen vermeld als reacties op de aanwezigheid van indol, zoodat deze beide reacties dan ook werden toegepast. Zij zijn echter niet specifiek voor indol. Daarom werd allereerst de nitroprussidnatrium-reactie uitgevoerd; zij is n.l. de eenigste der drie genoemde reacties, die specifiek is voor indol, maar helaas zeer weinig gevoelig, terwijl de beide eerste reacties een buitengewone gevoeligheid bezitten.

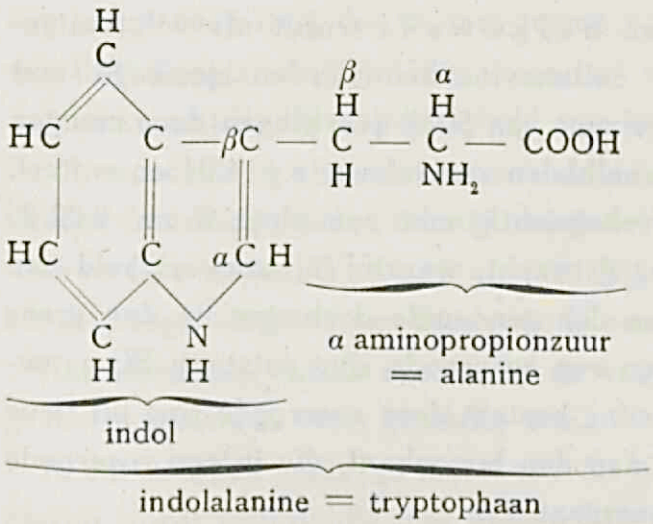
Op de uitvoering van deze reacties kom ik nog terug.

Uit onderzoekingen van Frieber en anderen is gebleken, dat Ehrlich's reagens, behalve indol, ook α methylindol (β methylindol alleen met sterke zuren) aantoont; indolaldehyde, indolcarboonzuur, β indolazijnzuur, tryptophaan, tryptamine, α methyltryptophaan en glyzyltryptophaan geven daarentegen geen reactie.

Verder bleek, dat de nitroso-indolreactie behalve indol, β indolazijnzuur aantoont en met β indolpyrodruivenzuur meer een purpere verkleuring geeft; de hierbovengenoemde stoffen reageeren niet. De reactie van Legal-Weyl toont **alleen** indol aan en geeft met de overige lichamen geen verkleuring.

Wanneer men nu de formule van tryptophaan beschouwt in verband met de experimenten van Frieber, dan blijkt:

dat het reagens van Ehrlich een vrij β C-atoom vraagt



om een positieve reactie te geven; immers behalve indol toont het ook α methylindol aan.

Daarentegen zal de reactie, uitgevoerd volgens Salkowski slechts positief verloopen, als de α plaats vrij is en ten slotte gaat de nitroprussidnatriumreactie slechts op als zoowel de α als de β plaats vrij zijn, dat wil dus zeggen, dat alleen indol zal reageeren.

Het minst betrouwbaar voor de aanwezigheid van indol is dus de reactie van Salkowski, dan volgt die van Ehrlich, die bovendien de meest gevoelige is en ten slotte is slechts de reactie volgens Legal-Weyl specifiek voor indol.

De reactie van Salkowski is de oudste. Zij werd 't eerst door Baeyer ontdekt, door Nencki als nitroso-indolreactie beschreven en door Salkowski en Kitasato in de bacteriologie ingevoerd. Door toepassing alleen van deze reactie zal men dus eerder dan met een der andere reacties indol aantoonen, hoewel het dan toch nog zeer goed mogelijk is, slechts een zijner derivaten te hebben gevonden.

De reactie van Salkowski wordt als volgt uitgevoerd: 10 cm³ cultuurvloeistof worden gemengd met ⅓ volume zwavelzuur van 50 % (verkregen door mengen van gelijke hoeveelheden zwavelzuur s.g. 1.84 en water). Hierop worden voorzichtig met een pipet 2 cm³ 0.02 % $NaNO_2$ oplossing gebracht, waarbij bij aanwezigheid van indol of van een der genoemde derivaten op den grens der vloeistoflagen een roseroode ring ontstaat. Bij nauwkeurige waarneming bestaat deze roseroode ring uit twee zônes, een gele aan den bovenkant, die in een roseroode naar beneden overgaat.

Deze nitrosoindolreactie is niet zoo gevoelig als die van Ehrlich. De gevoeligheidsgrens werd door Bauer bepaald en vastgesteld 1 : 320.000, terwijl Mac-Farland en Small als uiterste grens vonden 1 : 750.000. Daar ik den indruk gekregen had, dat deze reactie van Salkowski, als ringreactie uitgevoerd haast even gevoelig was als die van Ehrlich, werd door mij de grens bepaald en hiervoor gevonden 1 : 2.000.000.

Wat betreft de reactie van Ehrlich verdient de modificatie van v. Pringsheim, hoewel zeer eenvoudig in uitvoering, geen aanbeveling.

De uitvoering van deze reactie is wel hoogst eenvoudig, maar zij moet wijken voor de reactie van Gorter en de Graaff, die uitgevoerd, zooals zij haar beschreven hebben, veel gevoeliger is.

Hiervoor worden 10 cm³ cultuurvloeistof gemengd met 5 cm³ sterk zoutzuur s.g. 1.2, vervolgens laat men met behulp van een pipet zeer voorzichtig 2 cm³ Ehrlich's reagens toevloeien. Op het scheidingsvlak der beide vloeistoffen ontstaat bij aanwezigheid van sporen indol

een paarsroode ring, die na toevoeging van een oplossing van 0.02 % natriumnitriet niet verandert van kleur, alleen versterkt wordt. Bij aanwezigheid van meer dan sporen indol, wordt deze kleurstof na schudden der beide vloeistoffen aan den geheelen inhoud meegedeeld.

Gorter en de Graaff en ook Dénigès stelden als gevoeligheidsgrens van deze reactie vast, 1 : 10.000.000.

Het bleek mij, dat de reactie op de volgende wijze uitgevoerd, minstens even gevoelig was.

10 cm³ worden gemengd met 4 cm³ 50 % zwavelzuur en hierop wordt voorzichtig met behulp van een pipet 2 cm³ Ehrlich's reagens gebracht. Men ontloopt op deze manier de onaangename dampen van het sterke zoutzuur, terwijl men 't zelfde zuurmengsel noodig heeft voor de reactie van Salkowski, die men toch veelal gelijktijdig zal uitvoeren. Ook hier mag na toevoeging van een weinig 0.02 % natriumnitriet, de kleur niet veranderen.

De reactie van Legal-Weyl werd uitgevoerd door aan 5 cm³ cultuur, zwak alkalisch gemaakt met NaOH, 0.5—1 cm³ versch bereide 2 % nitroprussidnatriumoplossing toe te voegen en de oplossing vervolgens met azijnzuur zuur te maken. Bij aanwezigheid van indol ontstaat eene blauwe verkleuring, die **niet** overgaat in de bekende uitschudvloeistoffen. Gevoeligheid 1 : 5000. Bij 't onderzoek naar de vorming van indol door de verschillende diphtheriestammen en door de diphtheroïden werden door mij achtereenvolgens toegepast:

1e. Legal-Weyl.
2e. Ehrlich.
3e. Salkowski.

Is de 1e positief,, dan zullen de 2e en 3e stellig ook positief verloopen. Is de 1e negatief, dan kan nog zeer goed indol aanwezig zijn, doch dit is alleen met zekerheid vast te stellen, indien èn de reactie van Ehrlich èn de reactie van Salkowski positief verloopen, immers de eerste verlangt voor een positieve indolreactie een vrije β plaats, terwijl voor een positieve reactie volgens Salkowski een vrije α plaats noodig is. Zijn beide positief, dan wil dit dus zeggen, dat de beide plaatsen α en β onbezet zijn en men dus indol voor zich heeft.

Verloopen beide reacties negatief, dan mag men met zekerheid tot de afwezigheid van indol besluiten.

Is de reactie van Ehrlich positief, die van Salkowski negatief of omgekeerd, dan heeft men met een indolderivaat te doen.

De roode kleur, ontstaan door inwerking van 't reagens van Ehrlich op indol, hetzij in zoutzuur, hetzij in zwavelzuur milieu is gemakkelijk uit te schudden in amylalcohol en in chloroform.

Spectroscopisch werden in chloroform 3 absorptiebanden waargenomen: twee duidelijke banden in 't groen en een minder op den voorgrond tredende in 't blauw op de grens van 't violet. Tusschen de beide banden in 't groen is een diffuus gedeelte.

De plaatsen dezer banden werden bepaald.

een smalle intensieve band	583—567
een breede intensieve band	543—527
een breede band	487—468

Werd aan de roode kleurstof weinig nitrietoplossing toegevoegd, dan werd de kleur versterkt en gaf in chloroform uitgeschud, 't volgende spectrum:

Er was een breede band zichtbaar met een diffuus gedeelte ertusschen, dat slechts in verdunde oplossing of in dunnere laag zichtbaar was; deze band strekte zich uit van: 591—523, terwijl er weer een minder duidelijke band zichtbaar was in 't blauw van 487—468. Practisch heeft dus dit spectrum geen verandering ondergaan, is alleen versterkt en een weinig naar links verschoven. Eindelijk bevindt zich tusschen 523 en 488 een diffuus gedeelte.

Men zij intusschen voorzichtig bij de beoordeeling van de met amylalcohol uitgeschudde kleurstof, daar 't reagens van Ehrlich met handelsamylalcohol, wegens 't daarin voorkomende furfurol reeds een roode verbinding geeft!

Om nu 't indol in de verschillende vloeistoffen aan te toonen, werden de beschreven reacties als volgt uitgevoerd:

1e. in de cultuurvloeistof zelf, wat natuurlijk verreweg 't eenvoudigste is.

2e. het indol werd aan de cultuurvloeistof onttrokken en wel door stoomdestillatie en in de tweede plaats door extractie met aether.

De lichamen, die men als ontledingsproducten van het tryptophaan kan verwachten, zijn: het β indolcarboonzuur, het β indolazijnzuur en indol.

Zooals reeds in het begin van dit hoofdstuk werd meegedeeld, werden de verschillende diphtheriestammen en diphtheroïden geënt op:

50 cm³ tryptophaanoplossing

50 cm³ tryptophaanpeptonwater

50 cm³ peptonwater.

Na 6 weken werden deze cultures op de volgende manier onderzocht. 25 cm^3 werden zwak alkalisch gemaakt met een oplossing van natriumcarbonaat voor de indolcarboonzuren en aan destillatie met stoom onderworpen; vervolgens werd de inhoud van het kolfje juist zuur gemaakt met zwavelzuur ten opzichte van congopapier en opnieuw aan destillatie onderworpen. De andere 25 cm^3 werden eveneens met een oplossing van natriumcarbonaat zwak alkalisch gemaakt en eenige uren met aether geperforeerd, vervolgens werd de inhoud van den perforator zwak zuur gemaakt tegenover congo en opnieuw eenige uren geperforeerd.

In 't alkalisch en zuur destillaat werden de genoemde reacties uitgevoerd. De aether van 't alkalische en zure perforaat werd afgedestilleerd, de resten in zeer weinig water opgenomen en hierop eveneens de reacties uitgevoerd.

Omdat men met de afbraakproducten van het tryptophaan rekening dient te houden, zal men op deze manier bij de extractie met aether een scheiding kunnen maken tusschen indol en indolcarboonzuur, die beide in de cultures zouden kunnen voorkomen.

Bij de alkalische perforatie zal indol aan de vloeistof onttrokken worden, terwijl indolcarboonzuur na aanzuren met zwavelzuur in de aether zal overgaan, waarin het eveneens oplosbaar is.

Bovendien zal bij 't destilleeren in alkalisch milieu alleen 't indol overgaan, terwijl na zuur maken met zwavelzuur het labiele β indolcarboonzuur zich zal splitsen in CO_2 en indol. Wordt dus in 't zure destillaat indol gevonden, dan heeft men vermoedelijk 't splitsingsproduct van β indol-

carboonzuur voor zich. Het β indolazijnzuur is met waterdamp **niet** vluchtig en zal dus in de destillatiekolf terugblijven. Hierop werd dan de volgende door S a l k o w s k i beschreven reactie toegepast. Voegt men bij een oplossing van β indolazijnzuur, eenige druppels zoutzuur, vervolgens 2 à 3 druppels van een verdunde ijzerchloride oplossing (1.5 %), dan kleurt zich, na verwarming, de vloeistof nog voor zij kookt, intensief roodviolet.

Bovendien is het β indolazijnzuur oplosbaar in aether en zal dus in 't zure aetherperforaat teruggevonden moeten worden met de reactie van S a l k o w s k i.

Ook de oorspronkelijke cultuurvloeistof zal bij aanwezigheid van β indolazijnzuur een positieve nitrosoindol reactie geven.

Tenslotte werd nog gezocht naar β indolpropionzuur = skatolazijnzuur, dat eveneens beschreven wordt als een product der bacteriëele eiwitsplitsing. Hierop werd de door N e n c k i beschreven reactie uitgevoerd.

Wordt aan een oplossing van β indolpropionzuur toegevoegd een geconcentreerde oplossing van kaliumnitriet en met azijnzuur aangezuurd, dan worden gele kristalnaalden van de nitrosoverbinding gevormd.

Nu hadden H o p k i n s en C o l e bij de bestudeering van de ontleding van het tryptophaan door bacteriën opgemerkt, dat daarbij, bij aërobe rotting, indol en β indolazijnzuur werden gevormd, bij anaërobe rotting daarentegen, β indolpropionzuur; zoodat bij de ontleding door de diphtheriebacterie wel geen β indolpropionzuur gevonden zal worden.

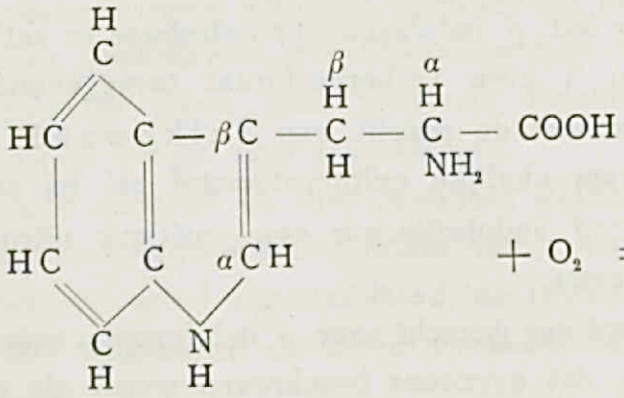
De bacteriëele afbraak door indolpositieve bacteriën

van het tryptophaan tot indol verloopt onder aërobe omstandigheden vermoedelijk in 3 phasen:

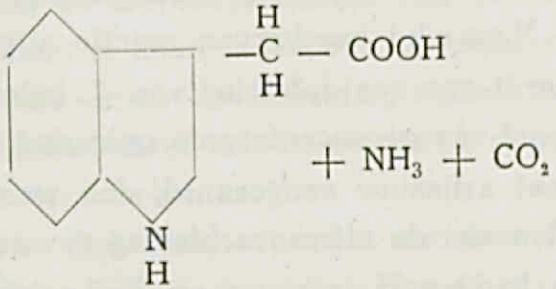
1e. tryptophaan wordt onder afsplitsing van het α C-atoom met de aminogroep omgezet tot β indolazijnzuur.

2e. het β indolazijnzuur gaat over in β indolcarboonzuur, dat

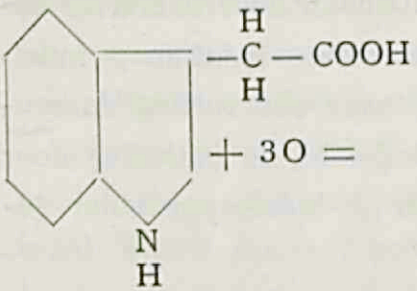
3e. CO_2 verliest en indol vormt.



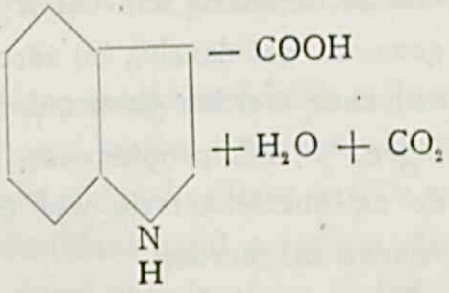
tryptophaan



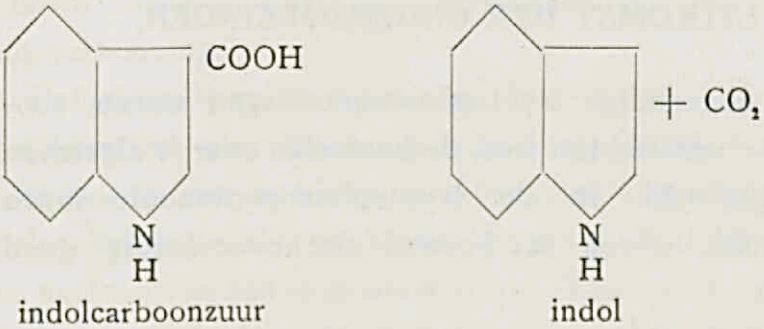
indolazijnzuur



indolazijnzuur



indolcarboonzuur



indolcarboonzuur indol

Indolpositieve bacteriën kunnen tryptophaan slechts tot indol ontleden via β indolazijnzuur, terwijl de indolnegatieve bacteriën het slechts hoogstens tot β indolazijnzuur zullen kunnen brengen.

Of een organisme dus al of niet indol zal kunnen vormen hangt af van zijn vermogen om de koolstof van de aliphatische rest te kunnen aantasten.

Zoo zal men indolpositieve bacteriën tijdelijk indolnegatief kunnen maken door aan den voedingsbodem een gemakkelijker assimileerbare koolstofbron in den vorm van suiker toe te voegen.

Frieber wil deze eigenschap van de bacterie om indol te kunnen vormen toeschrijven aan den bouw van de celwanden en vestigt de aandacht op 't feit, dat alle indolpositieve bacteriën Gram-negatief zijn, terwijl alle anindologene bacteriën Gram-positief zijn. Het is denkbaar, dat eigenschappen van de membraanstructuur van colloïdchemischen aard, die de Gram-kleurbaarheid beheerschen, eveneens de indolvorming zullen kunnen regelen.

UITKOMST DER ONDERZOEKINGEN.

In de eenvoudige tryptophaanoplossingen waren, zooals wel te verwachten was, de bacteriën over 't algemeen slecht gegroeid. In de tryptophaanpeptonoplossingen daarentegen, waren ze, hoewel niet overvloedig, goed gegroeid.

Zoowel de blanco tryptophaanoplossing, als de blanco tryptophaanpeptonoplossing als de blanco peptonoplossing gaven met Ehrlich's reagens een zwak rose ring, die na toevoeging van een weinig nitrietoplossing in paarsblauw tot blauw overging.

Ook de reactie van Salkowski verliep in alle 3 blanco-oplossingen zwak positief, doch in de destillaten of in de aetherische perforaten, 't zij alkalisch of zuur, kon geen indol of een zijner derivaten aangetoond worden. In geen der destillatieresten kon β indolazijnzuur aangetoond worden.

De reactie's volgens Ehrlich en Salkowski waren in de peptonoplossing 't sterkst, in tryptophaanoplossing 't zwakst.

Dat zal zijn toe te schrijven aan de onbekende stoffen, die eveneens kleuringen geven met 't reagens van Ehrlich en waarvoor Porcher en Gaulthier reeds hebben gewaarschuwd; bovendien zijn er vreemde stoffen, die een even duidelijke reactie geven volgens de reactie van Salkowski. Het is heel goed mogelijk, dat het éénzelfde stof is, die deze verkleuringen geeft, maar indol is het in ieder geval niet.

Wanneer men dus de reacties op indol uitvoert in de oorspronkelijke culturen, zonder vergelijking met een

blanco, zou deze reactie wel eens aanleiding kunnen geven tot verwarring.

Dat deze verkleuringen met Ehrlich's reagens in peptonwater niet afkomstig waren van indol, bleek o.a. wel hieruit, dat de kleur na toevoeging van eenige druppels nitrietoplossing in blauw overging. Deze kleur nam na verloop van tijd in intensiteit toe. Waar zij in aanraking was met de lucht, was zij 't sterkst, verbreedde zich en liep aan de onderzijde in lichtblauw tot kleurloos uit.

Deze reactie deed mij sporen skatol vermoeden. Skatol (β methylindol) geeft n.l. met sterke zuren en 't aldehyde eveneens een roode verkleuring, die na toevoeging van nitriet onmiddellijk in blauw overgaat en die langzamerhand in intensiteit toeneemt. Deze diepblauwe kleurstof vertoont fluorescentieverschijnselen blauw-paarsrood en kan uitgeschud worden in chloroform.

De gevormde blauwe kleurstof in pepton, na toevoeging dus van zoutzuur, 't reagens van Ehrlich en wat NO_2 kon niet uitgeschud worden met chloroform. Om deze twee stoffen spectroscopisch met elkander te kunnen vergelijken, werden ze in de oplossing zelf bekeken.

Zij vertoonden beide ook in deze oplossing dezelfde eigenaardige fluorescentie — blauw, paarsrood.

De plaats der banden werd bepaald en voor nitroso-skatol gevonden een intensieve breede band in 't rood van 653—614, dan een diffuus gedeelte, vervolgens een intensieve smalle band van 591—572, die vervolgens diffuus uitliep.

Bekijkt men nu de nitroso-verbinding van de onbekende stof, dan wordt eenzelfde beeld waargenomen; de plaatsen der banden waren 657—620 en 597—572, hier-

tusschen bevond zich weer een diffuus gedeelte, terwijl de rechtsche band in een zwak verduisterd gedeelte eindigde. Het tweede spectrum gelijkt dus practisch zeer veel op 't eerste, alleen is de band in 't rood bij de onbekende iets meer naar rechts verplaatst.

Over het ontstaan van deze fluoresceerende kleurstof na uitvoering van de indolreactie volgens Ehrlich en toevoeging van nitriet in de blanco-peptonoplossing heb ik geen verklaring kunnen vinden.

Alleen Frieber maakt eenmaal de opmerking, dat een colistam, geënt in gewonen bouillon met 0.03 % tryptophaan en 3 % glucose, met Ehrlich's reagens een zwakke roodkleuring geeft, die na toevoeging van nitrietoplossing diepblauw wordt. Deze kleurstof was met chloroform, amylalcohol, benzol, toluol of aether niet uit te schudden. Vermoedelijk zal dit dus wel dezelfde stof zijn geweest.

Volgens de onderzoekingen nu van Frieber zou de diphtheriebacterie geen indolvormer zijn, wel zou zij β indolazijnzuur kunnen vormen, een eigenschap, die volgens hem aan alle bacteriesoorten toekomt en derhalve qualitatief niet van belang is. Alle anindologene bacteriën zouden de amido-stikstof van de tryptophaan aangrijpen en daarmee een product, vermoedelijk β indolazijnzuur, vormen, dat **niet** met Ehrlich's, wel met Salkowski's reagens een verkleuring geeft.

De indolvormende bacteriën daarentegen kunnen het koolstofatoom van de alanine afsplitsen.

Hoewel ik de oplossing volgens 't recept van Frieber heb gemaakt en gebruikt, heb ik haar niet verder toegepast, omdat zij nog gecompliceerder van samenstelling

was dan de peptonoplossing en bovendien in de blanco-oplossing ook verkleuringen gaf.

Dat Frieber nooit van verkleuringen in de blanco-oplossing spreekt, zal wel zijn oorzaak hierin vinden, dat hij de reactie Ehrlich-Pringsheim toepaste, die veel minder gevoelig is, dan die van Ehrlich, uitgevoerd volgens Gorter en de Graaff.

In de volgende tabellen zijn de uitkomsten van de vorming van indol en zijn derivaten door de verschillende micro-organismen vereenigd.

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP.ZUUR
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.	
Blanco . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	z.zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am. stam .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Holland . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Di. II Parys .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diphth. 4 . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 1 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 2 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfelachtig	—	—	—	—
No. 3 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 4 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_7	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_8	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Krall . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lister . . .	—	z.zw.× met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

L. W. = Legal Weyl; E. = Ehrlich; S. = Salkowski.

In alle cultuurvloeistoffen was nog tryptophaan aanwezig, dat aangetoond werd met Broomwater (vuilpaarse verkleuring).

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP.ZUUR
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.	
Blanco . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	z.zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am. stam .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Holland . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Di. II Parys .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diphth. 4 . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 1 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 2 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfelachtig	—	—	—	—
No. 3 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 4 . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_7	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_8	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	zw.+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Krall . . .	—	z.zw.+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lister . . .	—	z.zw.× met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

L. W. = Legal Weyl; E. = Ehrlich; S. = Salkowski.

In alle cultuurvloeistoffen was nog tryptophaan aanwezig, dat aangetoond werd met Broomwater (vuilpaarse verkleuring).

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP. ZUUR
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.	
Blanco . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	zw. +	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am. stam . .	—	zw. + met NO_2 blauw	zw. +	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Holland . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—
Diphth. 4 . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 1 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 2 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ m.NO_2 onverand.	zw. +	st. rood	rood	—
No. 3 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
No. 4 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—
I_7	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_8	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Krall . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lister . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel	—

Met Broomwater ontstond een vuil paarse verkleuring in de cultuurvloeistoffen, zoodat nog tryptophaan aanwezig was.

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP. ZUUR
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.	
Blanco . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	zw. +	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am. stam . .	—	zw. + met NO_2 blauw	zw. +	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Holland . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—
Diphth. 4 . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 1 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 2 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ m. NO_2 onveranderd	zw. +	st. rood	rood	—
No. 3 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
No. 4 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—
I_7	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I_8	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Krall . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lister . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel	—

Met Broomwater ontstond een vuil paarse verkleuring in de cultuurvloeistoffen, zoodat nog tryptophaan aanwezig was.

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP. ZUUR	TRYPTOPHAAN
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.		
Blanco . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	zw.+	—	oranje r.	oranje r.	—	
Diphth. 4 . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—	aanwezig
Di. II Parys . 1 mnd. broedstoof 5 mnd. kamertemp.	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	zw.+	—	zw.+ m NO_2 onveranderd	+	—	+	+	rood	rood	—	aanwezig
No. 1 . . .	—	+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	oranje r.	oranje r.	—	aanwezig
No. 2 . . .	—	+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	zw.+	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—	aanwezig
No. 4 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	rood	rood	—	aanwezig

STAMMEN	OORSPR. CULT.			ALK. DEST.			ZUUR DEST.			ALK. PERF.			ZUUR PERF.			β INDOL-AZIJNZUUR		β INDOL-PROP. ZUUR	TRYPTOPHAAN
	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	L.W.	E.	S.	Oorspr. cult.	Destill. rest.		
Blanco . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	zw.+	—	oranje r.	oranje r.	—	
Diphth. 4 . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—	aanwezig
Di. II Parys . 1 mnd. broedstoof 5 mnd. kamertemp.	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	zw.+	—	zw.+ m NO_2 onveranderd	+	—	+	+	rood	rood	—	aanwezig
No. 1 . . .	—	+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	oranje r.	oranje r.	—	aanwezig
No. 2 . . .	—	+ met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	zw.+	—	—	—	—	twijfel.	twijfel.	—	aanwezig
No. 4 . . .	—	zw. + met NO_2 blauw	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	rood	rood	—	aanwezig

Uit dit onderzoek blijkt, dat de diphtheriebacterie en de diphteroïden **geen** indol kunnen vormen uit de beschreven tryptophaan-, tryptophaanpepton- of peptonoplossing, zelfs niet na 6 weken. In de tweede plaats werd geen indolcarboonzuur gevonden.

Ten slotte blijkt, dat de diphtheriestammen misschien in staat zijn β indolazijnzuur te vormen. Waar deze reactie volgens S a l k o w s k i een gevoeligheid bezit van 1 : 2.000.000 en nooit in 't zure perforaat werd teruggevonden, meen ik de vorming echter te mogen betwijfelen. Ook de reactie in de destillatierest met zoutzuur en een spoor $Fe\,Cl_3$ was niet gedecideerd positief. Wanneer het al gevormd wordt, zijn 't toch uiterst geringe sporen.

De vorming van β indolazijnzuur zou nog 't meest blijken uit 't verschil tusschen de nitrosoreactie in de cultuurvloeistof en die in de blanco. Deze was zeker sterker dan de blanco, maar er kan even goed wat van een onbekende stof gevormd zijn, die eveneens met S a l k o w s k i de roode verkleuring geeft.

De diphtheroïden No. 2, No. 3 en No. 4 kunnen β indolazijnzuur vormen; 't sterkst was deze reactie bij No. 3, die zich in alle opzichten afwijkend van de rest gedroeg. Bovendien werd bij No. 2 't zure perforaat in de tryptophaanpeptonoplossing met E h r l i c h's reagens rood gekleurd, na $NaNO_2$ toevoeging niet blauw wordend, zoodat hier dus een indolderivaat gevormd was.

β indolpropionzuur kon bij geen der stammen aangetoond worden.

Het is natuurlijk niet onmogelijk, dat de diphtheriebacterie wel in staat is β indolazijnzuur te vormen, maar

dat de gebruikte voedingsmedia niet in de geschikte verhouding gekozen zijn.

In 1879 hebben E. en H. Salkowski en Weyl bij de bestudeering der ontledingsproducten der eiwitten door micro-organismen een groot aantal aromatische lichamen gevonden, welke men tegenwoordig beschouwt als ontledingsproducten van het phenyl-, resp. paraoxyphenylalanine of het tyrosine. De voornaamste van die lichamen, die gevonden werden, zijn:

phenol, parakresol, phenylpropionzuur, phenylazijnzuur, paraoxypropionzuur en paraoxyphenylazijnzuur.

Paraoxyphenylpropionzuur en parakresol zouden meer onder anaërobe omstandigheden ontstaan, terwijl paraoxyphenylazijnzuur en phenol via paraoxybenzoëzuur door toevoeging van zuurstof zouden worden gevormd, op dezelfde manier als dat bij tryptophaan gebeurt.

$HO - C_6H_4 - CH_2 - CHNH_2 - COOH + H_2 =$
$HO - C_6H_4 - CH_2 - CH_2 - COOH + NH_3$
paraoxyphenylpropionzuur

$HO - C_6H_4 - CH_2 - CHNH_2 - COOH + O_2 =$
$HO - C_6H_4 - CH_2 - COOH + NH_3 + CO_2$
paraoxyphenylazijnzuur

$HO - C_6H_4 - CH_2 - COOH - {}_3O =$
$HO - C_6H_4 - COOH + CO_2 + H_2O$
paraoxybenzoëzuur

$HO - C_6H_4 - COOH = C_6H_5OH + CO_2$

Het paraoxybenzoëzuur is een labiele verbinding, die bij verhitting gemakkelijk uiteenvalt in phenol en CO_2. Dat zuur kan men aantoonen, doordat het met ferrichloride een geel amorph neerslag geeft.

Het paraoxyphenylazijnzuur is met waterdamp **niet** vluchtig, is echter behalve in water ook in aether oplosbaar.

Een waterige oplossing geeft met ferrichloride een intensieve groenkleuring.

Het paraoxyphenylpropionzuur is evenmin vluchtig met waterdamp, daarentegen weer wel oplosbaar in aether en water, waarin het met ferrichloride een grijsblauwe verkleuring geeft.

In analogie met de ontleding van tryptophaan door de diphtheriebacteriën, resp. diphtheroïden werden oplossingen bereid met tyrosine om vast te kunnen stellen òf en op welke wijze ze het tyrosine aangrepen.

Ook hier werd, teneinde de ontledingsproducten met meer zekerheid te kunnen vaststellen, een zeer eenvoudige voedingsbodem bereid. Hiernaast werd de kieskeurigheid der diphtheriebacterie in aanmerking genomen en werden dezelfde bestanddeelen van den eenvoudigen voedingsbodem opgelost in 0.25 % peptonwater.

De voedingsbodem was aldus samengesteld:

0.60 g tyrosine.
5.0 g kaliumphosphaat.
0.300 g magnesiumsulfaat.
1.0 g natriumchloride.
5.0 g ammoniumlactaat.
1 L. water.

Deze oplossingen werden verdeeld in kolfjes van 50 cm^3

en 3 achtereenvolgende dagen gedurende 30 minuten op 100° C. gesteriliseerd.

Na verloop van 8 weken werden in de verschillende cultures gezocht naar de ontledingsproducten van tyrosine en wel:

1e. naar phenol, dat in analogie met de vorming van indol wel niet gevonden zal worden.

2e. naar de aromatische oxyzuren, die zoowel met broomwater, als met Millon's reagens eene reactie zullen geven.

Om met zekerheid phenol te kunnen aantoonen en te scheiden van de p. oxyphenylpropionzuur, p. oxyphenylazijnzuur en p. oxybenzoëzuur werd de inhoud der kolfjes weer in tweeën verdeeld. De eerste helft werd eerst alkalisch, vervolgens zuur gedestilleerd; de tweede helft eerst alkalisch, vervolgens zuur geëxtraheerd met aether.

De bacteriën waren in de tyrosineoplossing slecht gegroeid; op den bodem der kolfjes lagen de bacteriën als bruin gekleurde brokjes. De kleur der oplossing was over 't algemeen niet afwijkend van die van de blanco, alleen de stammen No. 1, No. 3 en Holland waren zwak gekleurd. In de tyrosinepeptonoplossing waren ze over 't algemeen beter gegroeid, terwijl de cultures zich donkerder gekleurd hadden.

In de verkregen destillaten, respectievelijk aetherische perforaten, die na verdamping van de aether in water waren opgenomen, werd gereageerd:

1e. met Millon's reagens.

2e. met Broomwater.

3e. met een $FeCl_3$ oplossing.

Uit dit onderzoek bleek, dat de diptheriestammen geen

phenol konden vormen en evenmin werden aromatische oxyzuren gevormd; de diphtheroïden gedroegen zich op dezelfde manier, alleen bij stam No. 3 kon weinig phenol en tevens paraoxybenzoëzuur worden aangetoond, terwijl in het aetherextract geen oxyzuren werden teruggevonden. Ook stam Krall gedroeg zich afwijkend van de overige diphtheroïden en gaf een zeer zwakke reactie op aromatische oxyzuren.

De diphtheriebacteriën kunnen dus onder aërobe omstandigheden tyrosine niet splitsen, terwijl de diphtheroïden dit over 't algemeen evenmin kunnen.

Volledigheidshalve werden de diphtheriebacteriën en de verschillende diphtheroïden geënt op een voedingsbodem, die alanine bevatte, om na te gaan of zij in staat waren om zuren met de groep R — CH_2 — $CHNH_2$ — COOH te splitsen in ammonia en zuren van de samenstelling R — CH_2 — COOH. Wederom werd een voedingsbodem bereid van de volgende samenstelling:

0.600 g alanine
0.500 g sec. kaliumphosphaat
0.500 g ammoniumlactaat
0.030 g magnesiumsulfaat
400 cm^3 water.

en daarnaast dezelfde bestanddeelen opgelost in 0.25 % peptonwater.

Nadat de verschillende cultures 6 weken bij 37° C. gestaan hadden, werden ze zuur gemaakt met zwavelzuur en gedestilleerd. In 't destillaat werd op azijnzuur gereageerd.

Hoewel de meeste stammen op alaninewater nog vrij goed gegroeid waren, kon in 't destillaat geen azijnzuur

worden aangetoond. Ook in 't alaninepeptonwater, waarin de stammen goed gegroeid waren, kon na aanzuren met zwavelzuur en destillatie, geen azijnzuur worden aangetoond.

Toegepast werd de micro-chemische reactie (natriumuranylacetaat). Aldus missen de diphtheriebacteriën, zoowel als de bij dit onderzoek gebruikte diphtheroïden, het vermogen om zuren van de samenstelling

$$R — CH_2 — CHNH_2 — COOH$$

te ontleden in die van de samenstelling $R — CH_2 — COOH$ onder afsplitsing van NH_3.

KORT OVERZICHT VAN HET ONDERZOEK.

1e. De diphtheriebacterie vormt geen indol in eenvoudige tryptophaanhoudende voedingsmedia.

2e. De diphtheroïden vormen geen indol in eenvoudige tryptophaanhoudende voedingsmedia.

3e. De diphtheriebacterie vormt geen of hoogstens uiterst geringe sporen β indolazijnzuur in de beschreven voedingsmedia.

4e. De diphtheroïden vormen in den regel geen β indolazijnzuur, een enkele bleek daartoe wel in staat.

5e. Zoowel de diphtheriebacteriën als de diphtheroïden kunnen uit pepton, tryptophaan maken.

6e. Tyrosine wordt door de diphtheriebacterie niet gesplitst; er konden geen oxyzuren of phenol worden aangetoond. De diphtheroïden tasten tyrosine in den regel niet aan, een enkele bleek hiertoe in geringe mate in staat.

7e. Alanine wordt noch door de diphtheriebacterie, noch door de diphtheroïden gesplitst onder vorming van azijnzuur.

SLOTBESCHOUWINGEN.

De biochemische eigenschappen van de diphtheriebacterie en van de pseudo-diphtheriebacterie of in 't algemeen der diphtheroïden mogen alleen dan met elkaar vergeleken worden, indien men deze onder volkomen dezelfde omstandigheden waarneemt. Het is daarom wenschelijk de omstandigheden, waaronder men deze eigenschappen bestudeert in de bacteriologische litteratuur zéér nauwkeurig te omschrijven; alleen dan mag men de uitkomsten van een onderzoek met elkaar vergelijken.

Bij deze proeven werden de bacteriën steeds afgeënt van glycerineserum, zoodat zij onder geheel dezelfde levensomstandigheden hebben verkeerd en men mag dus veronderstellen, dat dit organisme zich aan 't nieuwe milieu heeft aangepast.

De verschillen in biochemische eigenschappen tusschen de diphtheriebacterie en de bacterie v. Hofmann Wellenhof blijken dan van dien aard, dat men deze organismen niet met elkaar behoeft te verwarren. Bij de bacterie v. Hofmann Wellenhof kan men 2 soorten onderscheiden:

1e. die eiwit niet aantasten en binnen 24 uur hare levensvatbaarheid verloren hebben op steriel gedestilleerd water.

2e. die proteolytische fermenten afscheiden en eiwit wel splitsen en maanden lang hare levensvatbaarheid op steriel gedestilleerd water behouden. Deze soort heeft dus een uitgesproken saprophytisch karakter.

De diphtheriebacterie vergist alleen de monosaccha-

riden: glucose, mannose, galactose en laevulose onder vorming van acetaldehyde, mierenzuur, azijnzuur, propionzuur, melkzuur en barnsteenzuur. Van de meerwaardige alcoholen ondergaat glycerine alleen een geringe splitsing.

De bacterie v. Hofmann Wellenhof tast noch koolhydraten, noch meerwaardige alcoholen aan.

Tryptophaan en tyrosine komen niet in aanmerking om als differentieel diagnostische stoffen te dienen. De diphtheriebacterie en alle diphtheroïden zijn anindologeen, terwijl β indolazijnzuur, de gevoeligheid der reactie in aanmerking genomen, **niet** of slechts in uiterst geringe sporen gevormd wordt door de diphtheriebacterie. Een enkele diphtheroïde schijnt dit lichaam te kunnen vormen.

Phenol of phenolachtige lichamen werden op tyrosinehoudenden voedingsbodem door geen der onderzochte organismen gevormd.

Een moeilijkheid is het intusschen om een ander diphtheroïde dan de bacterie v. Hofmann Wellenhof binnen 24 uur als zoodanig te identificeeren en te onderscheiden van de diphtheriebacterie. Het dierexperiment en de glycerinepeptonlakmoesoplossing zullen binnen 4 dagen uitsluitsel kunnen geven, daar de diphtheroïden glycerine **niet** aantasten.

Voor zoover dit onderzoek betreft, zou men onderstaande indeeling kunnen maken:

CORYNEBACTERIËN

Diphtheriebacterie

staafjes, verschillend van grootte en vorm
poolkleuring
weinig Gramvast
involutievormen
binnen 24 uur dood in gedest. water
tast eiwit niet aan
vergist: glucose, mannose, galactose, laevulose — binnen 24 uur
glycerine, binnen 3 × 24 uur

in staat diphtherie te verwekken. virulent v. caviae.

avirulent v. caviae.

Diphtheroïden

(Avirulent voor caviae)

Bact. v. Hofmann Wellenhof

staafjes v. gelijke grootte en vorm
geen poolkleuring
Gramvast
geen involutievormen
tasten meerw. alcoholen en koolhydraten **niet** aan.

Bact. cut. comm.

= Paradiphth. Lubinski
= Bact. dermophilus
miniatuur diphth. bact.
vergist: glucose, mannose, galactose, laevulose, saccharose, arabinose.

Overige diphtheroïden.

Hoewel deze koolhydraten kunnen splitsen, is hare fermentatieve werking **veel** zwakker, terwijl er enkele zijn, die de disacchariden op den duur splitsen.

A

binnen 24 uur dood in gedest. water.
tast eiwit niet aan.

B

lange levensduur in gedest. water.
tast eiwit aan.

LITTERATUUR.

Lehmann und Neumann. Bakteriologie und Bakt. Diagnostiek.
Palmirsky und Orlowski. C. f. Bact. **17**, 358, **1895**.
Escallon et Sicre. C. R. de la Soc. de Biol. **65**, 507, **1908**.
Prochaska. Z. f. U. u. Inf. **24**, 373, **1987**.
Frieber. C. f. Bact. **87**, 254, **1922**.
Porcher et Panisset. C. R. de la Soc. de Biol. **70**, 464, **1911**,
Gauthier. Diss. Lyon **1912**.
Berthelot. Ann. de l'Inst. Past. **28**, 839, **1914**.
Zipfel. C. f. Bact. **64**, 65, **1912**, **67**, 497, **1913**.
Ehrlich. D. med. Wochensch. **1901**.
Pringsheim. C. f. Bact. **1918**.
Baeyer. Annales de Ch. et de Ph. **1870**.
Nencki. B. d.d. chem. Ges. **8**, 336, 722, **1875**.
E. Salkowski. Virchow's Archiv f. path. Anat. **110**, 336, **1887**.
Kitasato. Z. f. Hyg. und Inf. **1889**.
Gorter en de Graaff. C. R. de la Soc. de Biol. **64**-402-**1908**.
Dénigès. Précis de chemie analytique Paris **1913**.
Mc. Farland and Small. C. f. Bact. **1908**.
E. Salkowski. Z. f. phys. Chem. **8**-423-**1885**, **9**-8-**1885**.
Hopkins and Cole. Journ. of physiol. **27**-418-**1901**, **29**-451-**1903**.
Porcher. C. R. de la Soc. de Biol. **65**-**1910**.
E. en H. Salkowski. Ber. d.d. chem. Ges. **12**-107-648-**1879**.
Weyl. Ber. d. d. chem. Ges. **12**-354-**1879**.
Baudet. Folia microbiologica. **2**, **1914**.
Bauer. Z. f. innere Medizin **26**-833-**1905**.

h 0419.

STELLINGEN.

I.

Een procesverbaal wegens aflevering van melk, die niet voldoet aan de eischen van art. 2, b en c van het Melkbesluit **kan** aanleiding geven tot een onbillijke veroordeeling.

K. B. 1925 S. B. No. 256.

II.

Het begrip vergif heeft slechts een quantitatief karakter.

III.

Het is wenschelijk, dat de Nederlandsche Pharmacopee bij het artikel Aqua Laurocerasi een reactie opneemt, waaruit blijkt, dat het product inderdaad is verkregen door destillatie van bladeren.

IV.

Bij het onderzoek van faeces op bloed hechte men uitsluitend waarde aan den spectroscopischen uitslag.

V.

Snelazijn is geen „gistingsazijn".

VI.

Het ferrosilicium worde uitsluitend in hermetisch gesloten vaten vervoerd.

VII.

Voor het aantoonen van bessenwijn in wijn is een quantitatieve citroenzuur-bepaling noodzakelijk.

VIII.

In verband met de schuldvraag, ware het wenschelijk na verkeersongevallen, naast een klinisch onderzoek, ten spoedigste het alcoholgehalte van het bloed van den beklaagde te bepalen.

IX.

De bepaling van het Nieuw-Kirschnergetal, art. 2 van het margarinebesluit voor de hoeveelheid botervet in melange, is als gecodificeerde methode niet te verkiezen.

K. B. 1925 S. B. No. 417.

X.

Een physiologische endogene koproporphyrinevorming is niet bewezen.