



Bijdrage tot de kennis van enkele lichtbacteriën

<https://hdl.handle.net/1874/299508>

A. Gu. 192. 1930

BIJDRAGE TOT DE KENNIS
VAN ENKELE LICHT-
BACTERIËN

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

J. P. W. VOET

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN ENKELE LICHTBACTERIËN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AANDER RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR. A. PULLE, HOOGLEERAAR IN DE FA-
CULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE, TE VERDEDIGEN OP MAANDAG
30 JUNI 1930, DES NAMIDDAGS OM 4 UUR,

DOOR

JAN PIETER WILLEM VOET
GEBOREN TE ALMELO (O)

UTRECHT — N.V. DRUKKERIJ v/h L. E. BOSCH & ZOON — 1930

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

BRIDGE TOT DE KENNIS
VAN
HAKKELE LICHTBACTERIËN

PROFESSOR

DE HAKKELE LICHTBACTERIËN
ZIJN EEN VAN DE MEEST
INTERESSANTE EN HET
LAATSTE ONTDEKTE
ORGAANEN. HETZELFDE
HEET HET BRIDGE TOT DE
KENNIS VAN HAKKELE
LICHTBACTERIËN. HET
IS EEN VAN DE MEEST
INTERESSANTE EN
LAATSTE ONTDEKTE
ORGAANEN. HETZELFDE
HEET HET BRIDGE TOT DE
KENNIS VAN HAKKELE
LICHTBACTERIËN.

END

W. J. VAN DER
W. J. VAN DER

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW

Bij het eindigen van mijne academische studiën is het mij een aangename taak, allen te bedanken, die op eenigerlei wijze mij met de bewerking van mijn dissertatie behulpzaam zijn geweest.

Hooggeleerde DE GRAAFF, hooggeachte promotor, U dank ik voor den welwillend verleenden hulp, welke Gij mij bij dit onderzoek hebt verleend. Hoewel ik door gebrek aan plaatsruimte niet onder Uw dagelijksche leiding kon werken, hebt Gij mij steeds met raadgevingen en aanwijzingen terzijde gestaan.

Hooggeleerde SCHORNAGEL, Gij kunt U verzekerd achten van mijn diepgevoelde erkentelijkheid, toen ik in Uw gastvrij Instituut de gewenschte werkgelegenheid verkreeg. Voor de wijze waarop Gij mij steeds terwille zijt geweest, alsmede voor de belangstelling, die gij bij voortduring voor mijne onderzoekingen hebt betoond, ben ik U tot warmen dank verplicht.

Hooggeleerde VAN OYEN, ook U ben ik zeer erkentelijk voor de daadwerkelijke steun en interesse, die Gij mij op zoo vriendschappelijke wijze hebt gegeven.

Hooggeleerde KLUYVER, het is mij bijzonder aangenaam, U mijn welgemeenden dank te kunnen betuigen voor het voor mij zoo onontbeerlijke bacteriën materiaal en tevens voor Uwe litteratuuropgaven, welke voor mij zeer waardevolle aanwijzingen zijn geweest.

Hooggeleerde VAN ROMBURGH, ik kan niet nalaten, U als nestor van de Wis- en Natuurkundige Faculteit te danken voor de prettige wijze, waarop Gij mij in de problemen der organische Chemie hebt ingewijd.

Hooggeleerde RUZICKA, Gij kunt U verzekerd achten, dat ik het als een voorrecht beschouw onder Uw leiding werkzaam te zijn geweest.

Hooggeleerde KRUYT, voor de bereidwilligheid en steun, welke ik steeds van U heb mogen ondervinden, ben ik U zeer dankbaar.

Hooggeleerde COHEN, U dank ik voor het vele, dat ik in het van 't HOFF-laboratorium heb mogen leeren.

Ook U, Heeren Conservatoren en Assistenten der Veeartsenijkundige Faculteit betuig ik met dezen mijn oprechten dank voor de vele blijken van vriendschap en hulpvaardigheid, die ik van U heb mogen ondervinden.

Geleerde MÜLLER, de welwillende wijze, waarop gij mij met het verzamelen van bacteriën materiaal tegemoet zijt gekomen, heeft mij ten zeerste aan U verplicht.

Tevens wil ik woorden van dank richten tot het personeel van het Org. Chemisch-, het Pharmaceutisch en het van 't Hoff-laboratorium voor de wijze, waarop zij steeds voor mij hebben gereed gestaan.

Tenslotte acht ik het een aangename plicht mijn erkentelijkheid te betuigen aan het technisch personeel van het Pathologisch Instituut, dat zich steeds heeft beijverd mij altijd en in alles terwille te zijn.

Bijdrage tot de kennis van enkele lichtbacteriën.

Algemeen overzicht.

HOOFDSTUK I.

Inleiding.

Het lichten van vleesch en visch is een sedert langen tijd bekend verschijnsel. Vooral het lichten van zeevisch, hetgeen meestal na den dood van de visch wordt waargenomen, is sedert eeuwen aan de visschers bekend geweest.

Het lichten van het vleesch echter, is met zekerheid ontdekt door HIERO FABRICIUS VAN AQUAPENDENTE, die het verschijnsel bij een geslacht lam waarnam. Het gelukte hem, om niet-lichtend vleesch lichtend te maken, indien hij dit met het lichtende vleesch inwreef. Het sterkst openbaarde het lichtverschijnsel zich op vochtige plekken, welke dan eenigszins kleverig werden. Deze waarneming dateert reeds van 1592.

BERTHOLIN nam in 1641 dit verschijnsel eveneens bij schapenvleesch waar, en maakte tevens melding van het lichten van rundvleesch. Volgens opgave van genoemden auteur hield het lichten van het vleesch op bij het optreden van rotting, terwijl de lichtende plekken gemakkelijk konden worden verwijderd.

R. BOYLE en BEAL maakten melding van de aanwezigheid van lichtend vleesch op de Londensche markt. Deze stelden vast, dat de intensiteit van het licht afnam bij luchtverdun-

ning, terwijl bij het dompelen onder water, na twee uren, geen lichten meer te zien was. Bij het dompelen onder alkohol was het lichten reeds na een kwartier verdwenen.

HELLER gaf bij zijn proeven met lichtend vleesch op, dat de oorzaak hiervan een lichtend microörganisme moest zijn, echter was genoemd microörganisme niet datgene, dat het lichten van hout veroorzaakte.

PFLÜGER ontdekte het microörganisme, dat het lichtverschijnsel te voorschijn riep, bij vleesch en visch. Deze onderzoeker bevestigde daarmede de waarnemingen van HELLER van 1842 in 1875.

In 1862 was het HANCKEL, die de noodzakelijke aanwezigheid van lucht voor het lichten van vleesch vaststelde, zoodat de waarnemingen van BOYLE en BEAL daarmede waren bevestigd.

NUESCH ontdekte in 1877 hetzelfde lichtverschijnsel bij varkensvleesch en isoleerde hiervan een lichtend microörganisme, dat hij *Bact. lucens* noemde.

LASSAR merkte op, dat het zoute water, waarin lichtend vleesch lag, niet tot lichten kon worden gebracht, terwijl het vleesch niet schadelijk voor de gezondheid was.

LUDWIG onderzocht verscheidene lichtende vleesch- en vischsoorten en schreef de oorzaak aan hetzelfde microörganisme toe, n.l. *Micrococcus pflügeri*, LUDWIG.

BLANC stelde te Parijs in 1885 het verschijnsel vast bij paardevleesch; MOULÉ vond dit weer bij schapenvleesch, en tenslotte constateerde DUBOIS het lichten van konijnvleesch in 1891. Laatstgenoemde isoleerde van dit vleesch een microörganisme, dat hij *Photobacterium sarcophyllum* noemde. Genoemde bacterie vervloede geen gelatine, had 3% chloornatrium noodig en groeide reeds bij 12° C.

LITTERATUUR.

MOLISCH, Leuchtende Pflanzen pag. 52—55.

MOLISCH, Ueber das Leuchten des Fleisches toter Schlachttiere.

HOOFDSTUK II.

Litteratuuroverzicht.

Bij het bestudeeren der diverse ter beschikking staande publicatie's blijkt, dat er meerdere namen voor eenzelfde lichtbacterie in de litteratuur voorkomen, waardoor verwarring niet is buitengesloten. De lichtbacteriën brengt men, in verband met hun vermogen om te lichten, tot een afzonderlijk genus, n.l. *Photobacterium*, een benaming, welke door de onderzoekers, DUBOIS en BEYERINCK, aan de lichtende bacteriën werd gegeven, maar welke niet algemeen gebruikelijk is.

Ook worden aan deze bacteriën door eenzelfde auteur soms meerdere namen gegeven, zoo o.a. door MOLISCH bij de door hem gevonden en beschreven lichtbacteriën in de haven van Triëst, terwijl MIGULA in zijn bacteriënsystematiek dit eveneens doet. Het gevolg van deze handelwijze is, dat men bij het opzoeken van deze bacteriën meerdere hoofden in MIGULA's System der Bakteriën moet naslaan. MOLISCH rangschikt in het zooeven genoemde onderzoek de door hem geïsoleerde en beschreven lichtbacteriën onder de geslachtsnamen *Bacillus*, *Microspira* en *Pseudomonas*, waaraan MIGULA op grond van de publicatie's van COHN den naam *Micrococcus*, alsmede den geslachtsnaam *Photobacterium* van BEYERINCK en DUBOIS heeft toegevoegd. Vooral de benamingen van MOLISCH zijn niet in overeenstemming met zijn kritiek op MIGULA's System der Bakterien (Band II), omdat deze in zijn iets latere publicatie (*Leuchtbakteriën im Hafen von Triëst*) hetzelfde doet, terwijl hij in zijn boek *Leuchten- de Pflanzen*, op grond van het feit, dat MIGULA t.o.v. het aantal trilharen, als kenmerk voor *Bacillus*, *Microspira* en *Pseudomonas* o.a. aangeeft, genoemd

kenmerk aan kritiek onderwerpt; MOLISCH heeft, althans volgens zijn opgave, talrijke onderzoeken gedaan om de trilharen bij lichtbacteriën aan te toonen, echter steeds met negatief resultaat.

Volgens opgave der litteratuur zijn de volgende soorten lichtbacteriën beschreven: (Hierbij worden de synoniemen eveneens opgegeven).

- 1 *Micrococcus phosphoreus* COHN.
Bacterium phosphoreum MOLISCH.
Bacillus phosphoreus BEYERINCK.
Photobacterium phosphorescens BEYERINCK.
Photobacterium sarcophyllum DUBOIS.
Photobacterium phosphorescens FISCHER.
- 2 *Bacterium pflügeri* LUDWIG.
Photobact. pflügeri (LUDWIG) BEYERINCK.
- 3 *Bacillus luminosa* KRUSE.
Microspira luminosa MIG.
Photobact. luminosum BEYERINCK.
- 4 *Bacillus phosphorescens indicus* KRUSE.
Bacillus phosphorescens FISCHER.
Photobacterium indicum BEYERINCK.
- 5 *Pseudomonas javanica* EYKMAN.
Photobacterium javanense BEYERINCK.
- 6 *Bacillus phosphorescens indigenus* KRUSE.
Photobacterium fischeri BEYERINCK.
Bacillus fischeri MIG.
- 7 *Bacillus phosphoreus* (KATZ) MIG.
Bacillus argenteo-phosphorescens liquifac. (KATZ) MIG.
- 8 *Bacillus argenteo-phosphorescens* KATZ I.
- 9 *Bacterium argenteo-phosphorescens* (KATZ) MIG.
Bacillus argenteo-phosphorescens KATZ II.
- 10 *Bacillus argenteo-phosphorescens* KATZ III.
Bacillus phosphoricus MIG.
- 11 *Bacillus cyaneo-phosphorescens* KATZ.

- 12 *Bacillus smaragdino-phosphorescens* KATZ.
Bacterium smaragdino-phosphorescens (KATZ) MIG.
- 13 *Bacillus phosphorescens* GIARDI.
Bacterium phosphorescens (GIARDI) BILLET.
- 14 *Microspira delgadensis* (FISCHER) MIG.
Photobacterium delgadense (FISCHER) BEYERINCK.
- 15 *Microspira dunbari* MIG.
Vibrio DUNBAR.
- 16 *Photobacterium coronatum* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira coronata (FISCHER) MIG.
- 17 *Photobacterium annularum* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira annulare (FISCHER) MIG.
- 18 *Photobacterium glutinosum* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira glutinosa (FISCHER) MIG.
- 19 *Photobacterium papillare* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira papillaris (FISCHER) MIG.
- 20 *Photobacterium tuberosum* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira tuberosa (FISCHER) MIG.
- 21 *Photobacterium caraibicum* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira caraibica. (FISCHER) MIG.
- 22 *Photobacterium degenerans* (FISCHER) BEYERINCK.
Microspira degenerans (FISCHER) MIG.
- 23 *Photobacterium hirsutum* (FISCHER) BEYERINCK.
- 24 *Microspira photogena* MOLISCH.
Bacillus photogenus MOLISCH.
- 25 *Microspira luminescens* MOLISCH.
Bacillus luminescens MOLISCH.
- 26 *Microspira gliscens* MOLISCH.
Bacillus gliscens MOLISCH.
- 27 *Pseudomonas lucifera* MOLISCH.
Bacillus lucifer MOLISCH.
- 28 *Photobacterium splendidum* BEYERINCK.
Photobacterium splendor majus BEYERINCK.
- 29 *Photobacterium hollandicum* BEYERINCK.
- 30 *Micrococcus pierantonii* ZIRPOLO.

- Coccobacillus pierantonii* MEISZNER.
 31 *Bacillus sepieae* ZIRPOLO.
Bacterium pierantonii ZIRPOLO.
Vibrio pierantonii MEISZNER.
 32 *Bacterium hippanis* ISSATCHENKO.
 33 *Bacterium chiromoni* ISSATCHENKO.
 34 *Bacillus sulla Sepia* MEISZNER.
 35 *Vibrio sulla Sepia* MEISZNER.
 36 *Photobact. balticum* BEYERINCK.

Op deze wijze gerangschikt is een overzicht gegeven van de tot nu onderzochte lichtbacteriën. De systematische opgave van MIGULA is een zeer onoverzichtelijke, omdat deze in zijn bacteriënsysteem de lichtbacteriën onder verschillende benamingen opgeeft, terwijl de beschrijving der eigenschappen, wat het culturiëele gedeelte betreft, ook zeer te wenschen overlaat. Echter zij opgemerkt, dat de chemische differentiaaldiagnose van lateren datum is, zoodat het onvolledige alleszins verklaarbaar wordt.

BUCHANAN geeft in zijn werk, *General Systematic Bacteriology* Vol. I, over de lichtbacteriën als algemeen culturiëele kenmerken:

Alle soorten groeien het beste in voedingsbodems met 3½% chloornatrium.

Het lichtvermogen gaat verloren in voedingsbodems met meer dan 2% glucose.

Een spoor zuur doet het lichten dezer bacteriën ophouden.

Pepton is het meest geschikte voedsel.

Alle soorten zijn beweegelijk en niet sporenvormend.

Geen der soorten produceert een enzym, dat invertierend of diastatisch werkt.

Het spectrum van het uitgezonden licht is continu en strekt zich over ± hetzelfde golflengtegebied uit (van 450—570 A.E.).

Dit werk is in 1925 uitgegeven, dat van MIGULA in 1897. Ofschoon de verschillende kenmerken der lichtbacteriën in het werk van BUCHANAN veel vollediger zijn opgegeven, hebben eigen waarnemingen, wat *Bact. phosphoreum* en *Bact. splendidum* betreft als resultaat gehad, dat BUCHANAN's opgaven met de resultaten van eigen proeven niet geheel overeenstemmen. Ik kom bij het bespreken van de eigen proeven hierop nog terug.

Wat de behoefte aan chloornatrium betreft, blijkt bij litteratuuronderzoek, dat dit zout bij enkele bacteriën niet noodig is, o.a. bij *Bact. hippanis*, Iss. en *Bact. chironi*, Iss., althans volgens opgave van den onderzoeker.

Ook wat het vervangen van chloornatrium door andere zouten betreft, geven MOLISCH en GERRETSEN ten aanzien van *Bact. phosphoreum* MOLISCH en *Bacillus photogenus* MOL., op, dat dit mogelijk is. Alleen mogen de kathionen niet giftig zijn (b.v. Mn).

Chloornatrium dient bij deze bacteriën als osmotischen factor; eigen waarnemingen op voedingsbodems met $\frac{1}{2}\%$ keukenzout (vleeschbouillonagar) alsmede de proeven van genoemde onderzoekers bevestigen dit. Behoudens de opgegeven uitzonderingen, is het gehalte van $3-3\frac{1}{2}\%$ chloornatrium in de kweekbodems noodzakelijk, of een zoodanige concentratie van andere zouten, welke isosmotisch is met genoemde chloornatriumoplossing. Het gebruik van sec. kaliumphosphaat in plaats van keukenzout in de voedingsbodems geeft in de isosmotische concentratie aanleiding tot ten hoogste een zeer slechte ontwikkeling van de lichtbacteriën, hoewel dit zout in geringe concentratie gebezigd juist zeer groeibevorderend werkt. Dit zout reageert in de isosmotische concentratie zeer sterk alkalisch t.o.v. phenolphtaleïne, zoodat de ontwikkeling in verband met een te hoge pH van den voedingsbodem geremd is. Dit laatste betreft *Bact. phosphoreum* MOL. en *Bacillus pho-*

t o g e n u s M o L. Het is een specifieke eigenschap der bacteriën dat iedere soort het best groeit tusschen bepaalde grenzen van pH. der voedingbodems.

Het temperatuuroptimum der opgegeven bacteriën, waarbij maximale groei en lichten plaats hebben, is eveneens afhankelijk van de soort. Bovendien is het groeien en lichten van de samenstelling van den kweekbodem afhankelijk. Hoewel voor iedere soort verschillend, ligt het temperatuurgebied, waarbij deze bacteriën afsterven, voor die met laag groei- en lichtoptimum bij ongeveer 37° C., voor die met hoog optimum bij ongeveer 45—50° C. Lage temperaturen verminderen groei en lichten, maar geven geen aanleiding tot afsterven.

Als meest geschikte voedingsbodem voor photobacteriën worden vleesch- of vischbouillon opgegeven (chloor-natriumgehalte 3%); BEYERINCK gebruikt een vischbouillon, gemaakt van zeewater en zeevisch, waaraan nog 1% pepton en 1% glycerine worden toegevoegd. Soms voegt deze ook nog asparagine toe, hetgeen het lichten zeer gunstig beïnvloedt.

Sommige lichtbacteriën geven, volgens opgave van BEYERINCK, bij het cultiveeren in peptonzeewater zeer zwak licht, ook wanneer dit amiden en ammoniakzouten van org. zuren bevat. In combinatie met enkele suikers, o.a. glucose, galactose, fructose, maltose, alsmede glycerine, asparagine (-zuur), alanine en glucosamine, lichten deze bacteriën sterk. Andere stoffen doen het lichten verminderen of geheel ophouden, o.a. aether, chloroform enz. (Zie onderz. van DUBOIS & WYSMAN en BEYERINCK).

Genoemde proeven heeft BEYERINCK met B a c t. p h o s-
p h o r e s c e n s gedaan.

BEYERINCK verdeelt de lichtbacteriën in twee groepen, n.l. de pepton-koolstofbacteriën en de peptonbacteriën. Bij nader onderzoek, alsmede uit de opgaven der litteratuur, blijkt, dat tot deze groep de volgende bacteriën behooren:

Photobact. phosphorescens BEYERINCK.	Bacterium phosphoreum MOLISCH.
Photobact. pflügeri BEYERINCK.	Cocco-bacillus pierantonii MEISZNER.
Pseudomonas lucifera MOLISCH.	

Deze bacteriën ontwikkelen in glucose-houdende voedingsbodems gas en vervloeien gelatine niet.

De tweede groep ontwikkelt in glucoshoudende voedingsbodems geen gas en vervloeit gelatine, (groep peptonbacteriën), waartoe o.a. de volgende bacteriën behooren:

Bacillus phosphorescens FISCHER.	Microspira degenerans FISCHER.
Photobact. fischeri BEYERINCK.	Microspira luminosa FISCHER.
Photobact. balticum BEYERINCK.	Microspira papillare FISCHER.
Bacillus argenteo-phosphorescens liquifaciens KATZ.	Microspira photogena FISCHER. (langzaam vervloeiend).
Bacillus cyaneo-phosphorescens KATZ.	Photobact. hollandicum BEYERINCK.
Microspira coronata FISCHER (langzaam vervloeiend).	Photobact. splendidum BEYERINCK.
Microspira annulare FISCHER (langzaam vervloeiend).	Bact. hippanis ISSATCHENKO.
Microspira delgadense FISCHER.	Bact. chiromoni ISSATCHENKO.
Microspira tuberosa FISCHER.	Bacillus sulla sepia MEISZNER.

Deze groepverdeling is een willekeurige, want er bestaat de mogelijkheid, dat er een aantal lichtbacteriën voorkomen, welke geen gelatinevervloeiërs zijn, maar eveneens geen gasvormers in glucoshoudende voedingsbodems.

Aangaande de lichtbacteriën, welke gelatine niet vervloeien geeft de litteratuur o.a. de volgende :

Bacillus argenteo-phosphorescens, KATZ I, II en III.	Vibrio pierantonii MEISZNER.
Pseudomonas javanica EYKMAN.	Bacillus smaragdino-phosphorescens KATZ.
Bacillus luminescens MOLISCH.	Vibrio sulla sepia MEISZNER.
Bacillus glycens MOLISCH.	

Het gedrag t.o.v. glucose is alleen opgegeven bij *Vibrio pierantonii*, en *Vibrio sulla Sepia* die hieruit zuur vormen.

Een aanwijzing omtrent zuurvorming uit glucose wordt

opgegeven van *Bacillus smaragdino-phosphorescens* KATZ, *Bacillus argenteo-phosphorescens* KATZ I en *Photobact. splendidum* BEYERINCK.

Bij de overige in deze groep genoemde lichtbacteriën ontbreekt elke aanwijzing omtrent zuurvorming uit glucose, alsmede of vervloeiing van gelatine plaats vindt.

Omtrent verdere culturiëele en andere eigenschappen is er weinig bekend. De differentiaaldiagnose met behulp van suikers is alleen uitgevoerd met de volgende bacteriën:

<i>Coccobacillus Pierantonii</i> MEISZ-	<i>Bacillus sulla Sepia</i> , MEISZNER,
NER,	<i>Vibrio sulla Sepia</i> MEISZNER,
<i>Vibrio Pierantonii</i> MEISZNER,	

welk onderzoek verricht is door GERTRUD MEISZNER. (Zie Zentralblatt f. Bakt., IIte Abt. 1926 Band 67 pag. 194—210).

Omtrent de natuur van het lichten zij het volgende meegedeeld: MOLISCH schrijft het lichtend vermogen aan een hypothetische stof toe, welke onder invloed van zuurstof licht. Hetzelfde doen BEYERINCK en DUBOIS als oudere onderzoekers, alsmede HARVEY en GERRETSEN. Aan deze hypothetische stof worden door de diverse auteurs verschillende namen gegeven: MOLISCH spreekt van *photogeen*, BEYERINCK van *photoplasma*, GERRETSEN van *photogenase*, DUBOIS en HARVEY van *luciferine*. HARVEY neemt voor het verklaren van het lichtverschijnsel der bacteriën aan, dat het lichten van luciferine door een oxydeerend enzym (eventueel co-enzym) met behulp van zuurstof tot lichten wordt gebracht, welk hij luciferase noemt. Het schijnt echter tot nog toe niet gelukt te zijn, het licht enzym uit de diverse lichtende bacteriën te winnen.

Bij het bestudeeren der litteratuur blijkt, dat het lichten vrijwel uitsluitend bij lagere zeedieren tot en met visschen voorkomt. Meestal treedt het verschijnsel na den dood dezer dieren op. Toch zijn er lichtbacteriën, welke op levende zeedieren voorkomen, dus ook op visschen. PIERANTONI en

ZIRPOLO hebben lichtende bacteriën ontdekt, welke in symbiose leven met visschen, inktvisschen enz. Het onderzoek van G. MEISZNER werd reeds genoemd.

GIARD en BILLET ontdekten een pathogene lichtbacterie bij *Talitrus* (*Bacillus phosphorescens* GIARDI). Ook komt de zoogenaamde lichtziekte bij enkele muggensoorten voor. (*Bacterium chiromoni* Iss.).

Microspira dunbari, is volgens opgave van MIGULA, voor *caviae* pathogeen.

Microspira caraïbica, volgens opgave van denzelfden auteur, pathogeen voor muizen.

Volgens opgave van G. MEISZNER dooden de volgende bacteriën bij intraveneuse injectie konijnen en *caviae*, wanneer deze dieren met groote hoeveelheden der bacteriën worden ingespoten. n.l. *Vibrio pierantonii* MEISZNER, *Coccobacillus pierantonii* MEISZNER en *Bacillus sulla Sepia* MEISZNER. Bij een hoeveelheid van minder dan 5 „ösen" treedt geen reactie op en blijven de proefdieren in leven.

Bij *Sepia officinalis* ingespoten, geven kleine hoeveelheden *Vibrio pierantonii*, MEISZNER aanleiding tot abscesvorming bij de injectieplaats, wanneer deze subcutaan werd verricht, en de bacteriën in steriele keukenzoutoplossing werden gesuspendeerd.

Bij *Scyllium* (kleine haaisoort) interperitoniaal ingespoten geven *Vibrio pierantonii* MEISZNER en *Coccobacillus pierantonii* MEISZNER aanleiding tot exsudaatvorming, waarna de oplossing der bacteriën, na het verschijnen der leucocyten begint.

De niet genoemde lichtbacteriën zijn volgens opgaven der litteratuur niet pathogeen.

Omtrent het lichten van visch en vleesch in het algemeen zij het volgende medegedeeld: Het lichten van vleesch en visch houdt op, wanneer rotting begint. Momenteel komt het lichten van vleesch ten gevolge van de verbeterde koel-

techniek, alsmede van de verbeteringen op hygiënisch gebied, practisch niet meer voor.

In hoeverre de lichtbacteriën, welke het lichten van zeevisch veroorzaken, bijdragen tot het bederf hiervan, is weinig bekend.

Het lichtverschijnsel treedt uitsluitend aan de oppervlakte op, niet op verse snee vlakte. Bij zoetwatervissen is het lichten bijna nooit waargenomen, alleen dan, wanneer deze met zeevisch in aanraking zijn geweest.

LITTERATUUR.

- MOLISCH, Leuchtende Pflanzen, pag. 52—67, 68—82, 84—133.
- MOLISCH, Ueber das Leuchten des Fleisches toter Schlachttiere Bot. Zeitung (1903).
- NUESCH, J., Ueber das leuchtende Fleisch gestorbener Tiere, Kosmos IV Gaea XIII (1877).
- M. W. BEYERINCK, Over lichtvoedsel en plastisch voedsel der lichtbacteriën. (Zie verslagen en mededeelingen der K. Academie van K. en W. Afd. Natuurk. 2e reeks deel VII 239—302b (1890).
- W. MIGULA, System der Bakterien I 335—342.
- W. MIGULA, System der Bakterien II 78, 433—437, 865—872, 953, en 1013—1016.
- A. PRATJE, Das Leuchten der Organismen, Erg. der Physiologie (ASHER & SPIRO) 21 I (1923), 187—221.
- B. FISCHER, Die Bakterien des Meeres (nach der Untersuchungen der Planktonexpedition 1894).
- R. E. BUCHANAN, General Systematic Bacteriology Vol. I, 421—422.
- GERTRUD MEISZNER, Bakt. Untersuchungen über symbiontische Leuchtbakterien u.s.w. Zentralblatt f.B., IIe Abt. Band 67, (1926).
- H. MOLISCH, Leuchtbakterien im Hafen van Triest.
-

HOOFDSTUK III.

Eigen proeven met lichtbacterien.

Deze proeven zijn gedaan met lichtbacteriën, deels *zelf geïsoleerd*, deels van anderen afkomstig. De in studie genomen bacteriën zijn drie stammen van *Photobacterium phosphoreum*, waarvan twee stammen resp. van visch en vleesch zijn geïsoleerd, terwijl de derde uit het Lab. voor Technische Microbiologie te Delft afkomstig is. De twee stammen van *Photobacterium splendidum* zijn eveneens uit genoemd laboratorium afkomstig.

Teneinde verwarring te voorkomen, worden in het vervolg aan de resp. bacteriestammen de volgende namen gegeven:

Bacterium phosphoreum A, voor den Delftschen laboratorium-stam.	de lichtbacterie, van lichtende visch afkomstig.
Bacterium phosphoreum B, voor de lichtbacterie, van lichtend vleesch afkomstig.	Bacterium splendidum voor Photobacterium splendidum, BEYERINCK, waarvan de twee stammen resp. met A en B zijn aangeduid.
Bacterium phosphoreum C, voor	

In de op deze microörganismen betrekking hebbende litteratuur is gezocht, naar morphologische en culturiëele kenmerken. MOLISCH en BEYERINCK geven op, dat *Bact. phosphoreum* geen gelatine vervloeit en in glucose- en fructose-houdende voedingsbodems gas ontwikkelt en op maltose-houdende voedingsbodems licht, in tegenstelling met *Bact. pflügeri*, BEYERINCK, welke in laatstgenoemde bodems niet licht. Volgens BEYERINCK lichten beide bacteriën zeer fraai onder den invloed van glycerine en asparagine in peptonhoudend extract van zeevisch, dat met behulp van zeewater gemaakt is.

Naar deze opgave is van zeevisch, extract gemaakt, waarin 3% chloornatrium, $\frac{1}{2}\%$ pepton, $\frac{1}{2}\%$ glycerine en $\frac{1}{2}\%$ asparagine zijn opgelost, waarna de verkregen oplossing met soda alkalisch gemaakt werd. Bovendien werd in deze oplossing nog 0.1% sec. natriumphosphaat opgelost, om den groei te verbeteren.

Voor de bereiding van z.g. vischbouillon, alsmede die van -agar en -gelatine wordt naar hoofdstuk IV verwezen.

Volgens opgave van BEYERINCK doen de stoffen, welke bij *Bact. phosphoreum* bij tamelijk groote concentratie het lichtend vermogen versterken, dit veel minder bij *Bact. splendidum*. Een concentratie van ten hoogste 0.1% dezer stoffen kan aan de kweekbodems worden toegevoegd. Alleen manniet maakt een uitzondering, daar deze stof geen invloed heeft op 't lichtend vermogen van *Bact. phosphoreum*.

De zoogenaamde lichtstoffen hebben bij *Bact. splendidum* volgens BEYERINCK een geheel andere werking dan bij *Bact. phosphoreum*. Grootere concentratie's dezer stoffen belemmeren den groei van *Bact. splendidum*.

BEYERINCK geeft echter op, dat de lichtstoffen bij langeren inwerkingstijd ook bij *Bact. phosphoreum* het lichtvermogen verminderen; bij neutralisatie van de cultuurvloeistof met soda, licht de cultuur dan echter weer op.

Dit wijst op zuurvorming uit deze stoffen door *Bact. phosphoreum*. Het blijkt, uit hetgeen over *Bact. splendidum* is medegedeeld, dat door deze bacterie de z.g. lichtstoffen van BEYERINCK, snel in zuur worden omgezet.

Wat den groei der beide bacteriën betreft, groeit *Bact. phosphoreum* langzaam, *Bact. splendidum* zeer snel.

Wat het gedrag ten opzichte van glucose en fructose

betreft, kan uit de proeven van BEYERINCK worden geconcludeerd, dat deze suikers door *Bact. phosphoreum* onder zuur- en gasvorming (bestaande uit kooldioxyde + waterstof 1 : 1) worden vergist, terwijl *Bact. splendidum* uit genoemde suikers zuur maakt, zonder gasvorming. Door *Bact. splendidum* kan uit manniet zuur gevormd worden, echter niet door *Bact. phosphoreum*, die manniet dan ook niet aantast.

Verder zijn ten aanzien van de morphologische kenmerken van *Bact. phosphoreum* de volgende eigenschappen gevonden:

Kleine, afgeronde staafjes, zonder eigen-beweging.

Gelatine plaatculturen: Kleine koloniën, $\pm \frac{1}{2}$ m.M. doorsnede.

Bact. splendidum heeft de volgende morphologische kenmerken:

Lange staafjes met sterke eigen-beweging, iets gekromd, (Vibriovorm) vervloeit gelatine aan de lucht. De vervloeiing begint na ongeveer vier dagen.

Lichtbacteriën zijn vrijwel uitsluitend zeemicroörganismen. Alleen *Bacterium phosphoreum* maakt hierop een uitzondering, en komt behalve op schelvisch en kabeljauw, ook nog wel voor in opslagplaatsen van verse beenderen, maar in koelhuizen bijna niet meer op vleesch. Gedurende het onderzoek is mij maar één geval bekend geworden in een plattelandsslagerij, maar dit lichtend vleesch heeft mij, in verband met het inmiddels opgetreden bederf, geen cultuur meer kunnen leveren.

In die slagerij was geen koelcel aanwezig, in welk geval het gemakkelijker geweest was van het lichtende vleesch een lichtende stam te kweken.

Genoemde vleeschphosphorescent heb ik dan ook slechts van versch beendermateriaal geïsoleerd.

Bact. splendidum komt in den zomer algemeen

in de Noordzee voor, maar het is mij na herhaalde pogingen niet gelukt, om deze uit Noordzeewater te isoleeren.

In tegenstelling met de opgave van BUCHANAN, dat alle soorten eigen-beweging hebben, blijkt, uit de opgave van MOLISCH, dat *Bact. phosphoreum* niet beweeglijk is.

De voor dit onderzoek bestemde stammen werden op de volgende wijze verkregen:

Lichtend vleesch en versche zeevisch zijn in een open schaal, gedurende 36 uur in de ijskast geplaatst in 3% chloor-natriumoplossing, zoodanig, dat slechts ongeveer de helft met deze oplossing bedekt was. Bij het verschijnen van lichtende plaatsen op het materiaal werden meerdere buizen met vischbouillonagar van genoemde plekken geënt en eveneens bij lage temperatuur weggezet. Na ongeveer 2 dagen werden die buizen, welke het sterkste licht verspreiden, gebruikt om het daarin verkregen bacteriën-materiaal via plaatculturen te zuiveren, waartoe verdunningen werden gemaakt. Hiertoe is vischbouillongelatine gebezigd, omdat vischbouillonagar door zijn hooge stol-temperatuur aanleiding tot het afsterven der lichtbacteriën zou geven.

Nadat losliggende, lichtende koloniën werden verkregen, zijn deze, na het overenten op schuingestolde vischagar, nauwkeurig op zuiverheid gecontrôleerd. Dit proces werd zoolang toegepast tot geheel lichtende gelatineplaten waren verkregen en bij verdunning uitsluitend lichtende bacteriën-kolonies op de platen aanwezig waren.

Het kweken der lichtbacteriën geschiedde bij kamertemperatuur.

Ook de laboratoriumstammen werden aldus aan een contrôle op zuiverheid onderworpen.

LITTERATUUR.

BEYERINCK, *Folia Microbiologica* 4 (1916) 15—36.

BEYERINCK, *Die Leuchtakterien der Nordsee im August und September*.

- MOLISCH, Leuchtbakterien im Hafen von Triest.
 MIGULA, System de Bakterien II pag. 78.
 BUCHANAN, General Systematic Bacteriology Vol I pag. 421.
 MOLISCH, Leuchtende Pflanzen, pag. 95.
 BEYERINCK, Over lichtvoedsel en plastisch voedsel van Lichtbacteriën
 Arch. neerlandaises T. XXIV p. 369—442.
 PRATJE, Das Leuchten der Organismen, Erg. der Physiologie (ASHER
 & SPIRO) 21 — I (1923) pag. 187—221.

HOOFDSTUK IV.

Gebruikte Voedingsbodems voor het onderzoek der Lichtbacterien.

Als regelmatige kweekbodem werden alkalische vischbouillon of daarvan afgeleide bodems, als vischbouillongelatine en -agar gebruikt. Daartoe werd eerst vischwater gemaakt, dat is een afkooksel van zeevisch, als schol, schelvisch, wijting, bot of rog. 200 g gemalen zeevisch werden met 1 l. leidingwater overgoten en dit mengsel gedurende $\frac{1}{2}$ uur in de autoclaaf bij 117—120° C. verhit. Na afkoelen werd het zoo verkregen vischwater gefiltreerd en de vischresten in een vleeschpers uitgeperst, waarna dit persvocht, na filtreren, met het filtraat werd vereenigd. Het verkregen vischwater werd daarna aangezuurd met 30 druppels phosphorzuur (sg 1.7) per liter. Daarna werd gedurende een half uur verwarmd op 100° C., waarna van het neergeslagen eiwit werd afgefiltreerd. Het op deze wijze behandelde vischwater werd gebruikt voor de diverse bodems, nadat het eerst met 10%-ige natriumcarbonaat-oplossing alkalisch was gemaakt tot pH. = 7, t.o.v. neutraalrood. Voor alkalischen vischbouillon werden dan nog in een liter van het aangezuurde, naderhand geneutraliseerde extract, de volgende stoffen in de daarachter vermelde hoeveelheden, opgelost:

Pepton Brunnengräber .	5 g	Sec. Natriumphosphaat	
Keukenzout	30 „	exsicc.	$\frac{1}{2}$ g

Deze bouillon werd gedurende 10 minuten bij 115° C. voorverhit en, na filtreeren en afkoelen, over buizen, kolfjes, enz. verdeeld en gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 110° C. Voor vischbouillonagar en -gelatine werd in bovengenoemden bouillon nog $\frac{1}{2}\%$ asparagine en 5—10 cm³ glycerine per liter opgelost, terwijl de hoeveelheden agar of gelatine 2% resp. 20% waren.

Zie litteratuur hiervoor BEYERINCK, en MOLISCH Leuchtende Pflanzen.

Toen echter naderhand bleek, dat in bovengemelden bouillon een steeds slechtere groei plaats vond, werd, in verband met onderzoekingen van MOLISCH, de samenstelling gewijzigd en daaraan per liter bouillonagar resp. bouillon nog $\frac{1}{4}$ g joodkalium en $\frac{1}{2}$ g magnesiumsulfaat toegevoegd, terwijl pepton „Brunnengräber” door pepton „Poulenc” werd vervangen.

Voor zuren vischbouillon werd in het primair verkregen afkooksel, direct $\frac{1}{2}\%$ pepton, 0.1% sec. natriumphosphaat exsicc. en 3% keukenzout opgelost. De verdere behandeling geschiedde als bij alkalischen bouillon, n.l. voorverhitten, filtreeren en steriliseeren.

Neutraalrood-glucose-vischbouillon.

Deze voedingsvloei-stof werd als volgt gemaakt; uitgegaan werd van alkalischen vischbouillon (zie boven), waarin $\frac{1}{2}\%$ glucose en 0.025% neutraalrood werden opgelost en gedurende 20 minuten bij 110° C. werd gesteriliseerd, meestal in buizen of kolfjes van 200 cm³ inhoud, waarin 150 cm³ bouillon werd gebracht.

Peptonwater.

Dit werd gemaakt van de peptonen Brunnengräber, Witte, Chapeautôt, Diest, Poulenc, alsmede van zelf gemaakte visch-

pepton. Van deze stoffen werden per liter 10 g opgelost, alsmede 3% chloornatrium, in sommige gevallen, ook mono-kaliumphosphaat, sec. natrium- resp. ammoniumphosphaat. In die gevallen wordt dit steeds afzonderlijk vermeld. Bovengenoemde peptonoplossingen werden eerst op 110° C. gedurende 10 minuten voorverhit en na afkoelen gefiltreerd, daarna over kolven resp. buizen verdeeld en 20 minuten bij 110° C. gesteriliseerd. Hieraan werden zoo noodig andere zouten toegevoegd.

Deze peptonoplossingen werden gebruikt voor het bestudeeren van het gedrag der lichtbacteriën t.o.v. vergistbare stoffen (suikers, meerwaardige alkoholen en pyrodruivenzuur, alsmede polysacchariden). Van deze stoffen werd $\frac{1}{2}$ —1% opgelost, terwijl aan de aldus verkregen vloeistoffen nog 10% Lackmuslösung „Kahlbaum” werd toegevoegd. Deze oplossingen werden verdeeld in buizen met gistbuisje, en gedurende 20 minuten bij 105° C. gesteriliseerd en gecontrôleerd. Vooral met fosphaathoudende oplossingen van genoemde stoffen moet men voor verharsen der suikers oppassen en niet te hoog steriliseeren.

Het pyrodruivenzuur werd met soda of ammonia geneutraliseerd t.o.v. lakmoespapier.

Soms werd lakmoes-pepton-mannietagar gebruikt, welke op de volgende wijze gemaakt werd: peptonoplossing met 0.1% sec. natriumphosphaat en 0.025% joodkalium en 1% manniet werd met 2% agar tot een vasten bodem gemaakt. Na voorverhitten en filtreeren werd aan de agar 10% lakmoesoplossing toegevoegd, waarna deze over buizen verdeeld werd en vervolgens 30 minuten bij 110° C. werd gesteriliseerd. Er zij opgemerkt, dat bij aanwezigheid van fosphaat deze agar, alsmede vischbouillonagar en gelatine, bij verwarming in de „Koch” gemakkelijk het daarin ontstane neerslag laat samenballen, zoodat het filtreeren zonder moeite door wattenproppen kan gebeuren. Lakmoes-pepton

manniet- en vischagar moeten gedurende $\frac{1}{2}$ —1 uur in de autoclaaf voorverhit worden, vischgelatine hoogstens tien minuten.

Sulfietgistingsooplossingen.

Hiervoor werd een oplossing van pepton Poulenc gebruikt van de volgende samenstelling:

Samenstelling I:		sec. Natriumphosfaat	
Water	1000 cm ³	exsicc.	1 g
Pepton Poulenc	10 g	Joodkalium	0.2 „
Chloornatrium	30 „	Magnesiumsulfaat	0.2 „
Natriumsulfiet p.a. .	10 „		

Deze oplossing werd gedurende 10 minuten in de autoclaaf op 110° C. verhit en na afkoelen gefiltreerd. Nadat deze oplossing in kolfjes met 2 g zuiver calciumcarbonaat per 100 cm³ vloeistof was gesteriliseerd, werd glucose toegevoegd, waarna nogmaals gesteriliseerd werd, bij dezelfde temperatuur en denzelfden tijd n.l. 20 minuten bij 105° C.

Wegens den slechten groei in tegenwoordigheid van natriumsulfiet werd de samenstelling der oplossing gewijzigd in de volgende:

Samenstelling II:			
Water	1000 cm ³	sec Natriumphosfaat exsicc.	0.5 g
Chloornatrium ...	20 g	Natriumsulfiet crist. p.a...	15 „
Joodkalium	0.2 „	Pepton Poulenc	10 „

Bovengenoemde oplossing bevatte 2% chloornatrium, omdat het naderhand in de oplossing ontstaan van keukenzout uit chloorcalciumoplossing en natriumsulfiet het gehalte weer tot 3% bracht en het aldus *ex tempore* gemaakte calciumsulfiet een fijnere verdeeling had als het preparaat, dat uit den handel betrokken kon worden.

Na verdeeling over kolven van 500 cm³, waarin 150 cm³ oplossing, (evenals bij I) werden deze met 5 cm³ 45% -ige chloorcalciumoplossing (gekristalliseerd) bedeed.

Nadat $2\frac{1}{2}$ g zuiver calciumcarbonaat was toegevoegd werd ged. 20 minuten bij 110° C. gesteriliseerd. Den daarop

volgenden dag werden hierin $1\frac{1}{2}$ g glucose opgelost en gedurende denzelfden tijd nagesteriliseerd. Soms werden, in plaats van glucose, ook manniet en amyllum solubile in dezelfde hoeveelheid toegevoegd. De hoeveelheid glycerine en pyrodruivenzuur, zoover deze stoffen bestudeerd werden, werd op $1\frac{1}{2}$ cm³ per 150 cm³ gelimiteerd. Bij pyrodruivenzuur werd bovendien eenigszins anders gewerkt en uitgegaan van een oplossing, welke in plaats van 2% NaCl daarvan 3% bevatte. Ook werd weer 150 cm³ in een kolf van 500 cm³ inhoud gebracht, en daarin tevens $3\frac{1}{2}$ g zuiver calciumcarbonaat. Uit een pipet werd dan daarin $1\frac{1}{2}$ cm³ pyrodruivenzuur „Kahlbaum” gedruppeld en vervolgens zacht verwarmd in een waterbad, tot de kooldioxyde-ontwikkeling was afgelopen. Daarna werd $1\frac{1}{2}$ g. natriumsulfiet crist. p.a. in de kolf gebracht en nogmaals verwarmd. Tenslotte werd gesteriliseerd gedurende $\frac{1}{2}$ uur bij 110° C.

Voedingsoplossingen volgens Gersbach.

Litteratuur: Centralblatt f. Bakt. Abt. I Band 88, pag. 145.

Deze oplossingen zijn verkregen door trypsine te laten inwerken op peptonen en de eiwitten: tarwegluten, kippeneiwit en caseïne.

Uitgegaan werd van een 1%-ige peptonoplossing met $\frac{1}{2}$ % chloornatrium, welke verhit en gefiltreerd geweest is, zooals dit voor de peptonoplossingen is voorgeschreven. Nadat deze oplossingen gedurende een uur zacht zijn gekookt en t.o.v. lakmoespapier met sodaoplossing (10%) alkalisch zijn gemaakt, werden na afkoelen tot 40° C. per liter oplossing (eerst tot oorspronkelijk volumen aanvullen) toegevoegd:

- 200 mg Trypsine GRÜBLER.
- 200 „ Mono-kaliumphosphaat.
- 20 „ Magnesiumsulfaat.

Deze oplossingen werden dan gedurende 24 uur in een op 37° C. ingestelde thermostaat verwarmd, waardoor de trypsine haar inwerking deed op de peptonoplossing. Het conserveeren geschiedde met 20 cm³ mengsel van gelijke deelen toluol en chloroform, teneinde infectie tegen te gaan. De omzetting had plaats in bruine stopflesschen, om lichtinwerking buiten te sluiten. Nadat de inwerkings-tijd verlopen was, werd door een nat filter gefiltreerd en het filtraat gemeten en daarin zooveel chloornatrium opgelost, dat een eindconcentratie van 3% bereikt werd. Daarna werd voorverhit op 110° C. gedurende 10 minuten en na afkoelen gefiltreerd. Na de verdeling over buizen of kolven werd denzelfden tijd gesteriliseerd als voor het peptonwater gebruikelijk.

Het spreekt vanzelf, dat deze oplossingen, alsmede het peptonwater, zoowel als hunne resp. destillaten steeds vooraf op de aanwezigheid van indol worden gecontrôleerd met behulp van EHRLICH's reagens.

Voor getrypsiniseerde eiwitoplossingen werd gehandeld al naar gelang het gedrag van het eiwit bij verhitting:

A Trypsinisatie van Caseïne:

Het trypsiniseeren geschiedt als volgt: Hiervoor werd caseïne p.u.i. (zuurvrij) gebruikt, welke vooraf met aether van vet was bevrijd. Van de ontvette caseïne werd 10 gram opgelost in water onder verhitting tot koken, waarbij steeds zorg werd gedragen, dat de oplossing zwak alkalisch bleef, t.o.v. lakmoes-papier. Op deze wijze gelukte het, dit eiwit in oplossing te brengen. Nadat dit geschied was, werd afgekoeld tot 40° C., waarna weer tot het oorspronkelijke volumen werd aangevuld. Vervolgens werden per liter oplossing daarin nog de volgende stoffen in de daarachter vermelde hoeveelheden opgelost:

Chloornatrium 5.0 g Mono-kaliumphosfaat 0.4 g
 Trypsine GRÜBLER .. 0.4 „ Magnesiumsulfaat0.04 „

Daarna werd gedurende 48—60 uur getrypsiniseerd bij 37° C. in de thermostaat, zooals dit voor pepton-oplossingen het geval was. De verdere behandeling is dan precies aan die van de oplossingen volgens GERSBACH gelijk. Op de afwezigheid van melksuiker werd met behulp van *Bact. coli* in tegenwoordigheid van lakmoes gereageerd.

B Trypsinisatie van tarweglutenmeel (Tekal).

Dit meel werd, na vooraf ontvet te zijn met aether, op dezelfde wijze in oplossing gebracht.

De verdere behandeling geschiedde, zooals dit voor caseïne en peptonen werd beschreven.

C Trypsinisatie van kippeneiwit (albumen ovar. sicc.)

Omdat genoemd eiwit bij verhitting coaguleert, werd de oplossing koud gemaakt. De behandeling is gelijk aan die van caseïne enz.

Voor oplossing B en C werden dezelfde hoeveelheden eiwit resp. tarweglutenmeel opgelost per liter.

Bereiding van Vischpepton.

Hiervoor werd stokvisch gebruikt, omdat de pepton-opbrengst daarvan veel grooter is, dan van versche zeevisch. De stokvisch werd ontveld en geweekt en vervolgens gemalen. Uitgegaan werd van ongeveer 300 g droog ontveld materiaal. Na weeken en malen werd dit gesuspenderd in 1½ liter ½% HCl, waarin 30 g Pepsine Witte opgelost werden en vervolgens gedurende 7 dagen in een thermostaat bij 37° C. ingesteld, onder roeren van tijd tot tijd, gepeptoniseerd.

Na den inwerkingstijd werd afgezogen en de onopgeloste

substantie opnieuw op dezelfde wijze behandeld. De filtraten werden vereenigd en geneutraliseerd met vaste soda, op het laatst met soda-oplossing tot lakmoespapier zwak blauw kleurde. Daarna werd per liter ongeveer 50 g gekristalliseerd chloorcalcium toegevoegd en gekookt, en van het neerslag afgefiltreerd; in het verkregen filtraat werd het pepton neergeslagen met absoluten alkohol en afgezogen, waarna het onder zuigen met absoluten alkohol en aether werd gewasschen. Vervolgens werd het pepton in de paraffinestof op 55° C. gedroogd; door het in oplossing zijn van chloorcalcium sloeg het veel gemakkelijker neer, en was minder alkohol noodig. Bovendien was het pepton niet slijmerig.

Bereiding van Gistwater, Lakmoesgistwater, Neutraalrood-glucose-gistwater, enz.

Hiervoor werd gebruikt persgist, afkomstig van de Nieuwe Schiedammer Gistfabriek te Schiedam, waarvan 125 g persgist werd gebruikt op 1 l water.

De verkregen gistemulsie werd gedurende ½ uur in de autoclaaf verhit op 110° C. en na afkoelen gefiltreerd. Daarna werd in 1 l verkregen gistwater opgelost: 30 g chloornatrium en 1 g sec. natriumphosphaat exsicc., waarna nog 10 minuten op 110° C. verhit werd. Na afkoelen en filtreren werd aan het filtraat nog 10% Lackmuslösung Kahlbaum toegevoegd, wanneer in gistwater de vergistbaarheid van suikers en hiermee chemisch verwante stoffen werd onderzocht, zooals dit in tegenwoordigheid van peptonen het geval was.

De hoeveelheden vergistbare substantie zijn zooals bij lakmoespeptonwater gebruikelijk. Ook de sterilisatietemperatuur, verdeling enz. zijn geheel gelijk aan die voor peptonwater.

Neutraalrood-glucose-gistwater was gistwater, waarin ½% glucose en 0.025% neutraalrood waren opgelost. Het werd

op dezelfde wijze als neutraalrood-glucose-vischbouillon gemaakt.

Bereiding van voedingsbodems voor het bestudeeren van indolvorming uit tryptophaan.

Hiervoor werd vischextract gebruikt, dat bereid werd uit zeevisch (zie vischbouillon), en waarin de volgende stoffen werden opgelost volgens onderstaand voorschrift:

Vischextract, eerst aan-	Joodkalium	0.1 g
gezuurd met phosphor-	Asparagine.....	1 „
zuur, daarna met soda	Ammoniumlactaat (Melk-	
alk. gemaakt	zuur gen. met Am-	
Chloornatrium	monia 25 %)	2 ½ cm³
Magnesiumsulfaat crist..	0.1 „	

(Litt. BAUDET, Folia Microbiologica Band II 3 1914).

De verkregen oplossing werd geheel als vischbouillon behandeld, en daarin 0.03% tryptophaan opgelost, nadat de cultuurvloestof over kolfjes was verdeeld van 300 cm³, waarin 100 cm³ oplossing. Voor de eerste serie werd er geen glucose opgelost, voor de tweede serie echter wel. Het gehalte aan glucose was 1%. Voor details wordt verwezen naar de hoofdstukken VII en XI.

Bereiding van Pepton-aardappelbodem.

Genoemde bodem werd als volgt gemaakt: de hiervoor benoodigde aardappelstukjes werden met een grooten kurkboor uit een geschildte en goed gewasschen aardappel gestoken en deze stukjes in een 3%-ige keukenzoutoplossing zacht gekookt, terwijl de kokende vloestof met soda-oplossing alkalisch werd gemaakt en bij nazuren van deze, opnieuw met soda geneutraliseerd t.o.v. lakmoes, net zoo lang tot de reactie niet meer veranderde. Opgelet werd, dat de aardappelstukjes niet te gaar werden.

Dit laatste in verband met het tweemaal onder 1 atmosfeer druk steriliseeren van dezen aardappelbodem. Nadat de aardappelbuizen gevuld waren met een oplossing van 1%

pepton Brunnengräber en 3% chloornatrium (voorverhit en gefiltreerd) werden hierin de schuin doorgesneden stukjes aardappel gedaan, de buizen gesloten met hun bijbehorende wattenprop, waarna twee achtereenvolgende dagen gedurende 30 min. op 1 atmosfeer werd gesteriliseerd. Tenslotte werd nog bij 37° C. op steriliteit van dezen bodem gecontrôleerd.

Voorschriften van enkele gebruikte reagentia bij het onderzoek van lichtbacteriën.

A Ehrlich's reagens:

2 g para-dimethylaminobenzaldehyde „Kahlbaum” werden opgelost in 250 cm³ alcohol 96%, waarna 40 cm³ 25%-ig zuiver zoutzuur werd toegevoegd.

B Nitrophenylhydrazine-reagens.

Dit is een 4%-ige oplossing van p. nitrophenylhydrazine in 30%-ig azijnzuur.

C Methylrood-reagens.

Dit is een oplossing van 0.1% methylrood in een water-alkoholmengsel, bestaande uit 2 vol. alcohol 96% en 3 vol. gedestilleerd water.

D Phenolphtaleïne-reagens.

Dit is een oplossing van 0.1 g phenolphtaleïne in 100 cc alcohol 96%.

Proeven met *Bacterium phosphoreum*.

HOOFDSTUK V.

Vaststellen van de morphologische en culturiëele kenmerken van Bact. phosphoreum A, B en C.

In het hoofdstuk „Litteratuuroverzicht” werden reeds als culturiëele en morphologische kenmerken volgende vermeld:

Korte, aan beide uiteinden afgeronde staafjes, zonder eigen-beweging, welke niet gelatine-vervloeiend en niet sporenvormend zijn.

Glucose- en fructosehoudende voedingsbodems, onder zuur- en gasvorming, vergistend, aanvankelijk hierin lichtend.

In tegenstelling met *Bact. pflügeri* BEYERINCK ook in maltosehoudende voedingsbodems lichtend.

In tegenwoordigheid van manniet en glycerine zeer zwak lichtend, manniet niet onder zuurvorming vergistend.

Vanwege het feit, dat verdere opgaven in de litteratuur ontbreken, is er een uitgebreid culturiëel onderzoek ingesteld, om de eigenschappen van *Bact. phosphoreum* nader vast te stellen.

Alvorens echter tot bovengenoemd onderzoek over te gaan, werden eerst de morphologische en culturiëele eigenschappen van enkele stammen lichtbacteriën nagegaan, welke van zeevisch waren geïsoleerd.

Als morphologische kenmerken van laatstgenoemde bacteriën werden de volgende gevonden:

Korte, afgeronde staafjes, onbeweeglijk en gram-negatief.

Voor het vaststellen der culturiëele eigenschappen zijn de bacteriën op de volgende voedingsbodems gekweekt:

Peptonwater			geen indolv. na 8 dagen
Lakmoes peptonwater			lakmoes geen verkleuring
Glycerine	Lakm.	Peptonwater	zuur — gas —
Arabiet	„	„	„ — „ —
Manniet	„	„	„ — „ —
Dulciet	„	„	„ — „ —
Sorbiet	„	„	„ — „ —
Glycerin-			
aldehyde	„	„	„ — „ —
Glucose	„	„	„ + „ +
Mannose	„	„	„ + „ +
Galactose	„	„	„ + „ +
Fructose	„	„	„ + „ +
Maltose	„	„	„ + „ +
Saccharose	„	„	„ — „ —
Lactose	„	„	„ — „ —
Neutraalrood glucose vischbouill.			gasv. fluorescentie
Glucose lakmoes vischbouillon			zuur + gas +
Alkalische vischbouillon			troebel met ger. neerslag
Zure vischbouillon			zwak troebel

Het betrof in dit geval 10 stammen van lichtbacteriën, welke, alvorens tot dit onderzoek te worden gebezigd, eerst in reincultuur waren gebracht.

Het gebruikte pepton in bovengenoemde voedingsbodems is pepton Witte.

Het resultaat der cultuurproeven is reeds gedeeltelijk achter de resp. bodems gemeld. Het gas, dat zich in een EINHORN'S gistkolfje boven neutraalrood-glucose-vischbouillon had gevormd, bestond voor ongeveer 30% uit kooldioxyde, hetgeen met natron werd aangetoond, en voor de rest uit waterstof. Ook was de fluorescentie van het neutraalrood een aanwijzing op de aanwezigheid van organische zuren en van waterstof. Genoemde kleurstof geeft in tegenwoordigheid van organische zuren en bij gelijktijdige aanwezigheid van zink ook aanleiding tot fluorescentie (b.v. zinkstof + azijnzuur).

De maltose-lakmoes-peptonwater-culturen dezer licht-

bacteriën waren lichtend, terwijl vischbouillongelatine niet door deze werd vervloeid.

Genoemde proeven hadden dus tot resultaat, dat de 10 lichtbacteriestammen blijkbaar stammen van *Bact. phosphoreum* waren.

Als verdere kenmerken voor deze bacterie werden gevonden, dat alle hexosen, alsmede maltose, in tegenwoordigheid van pepton *Witte* onder zuur- en gasvorming vergist werden. In peptonwater werd, na cultiveeren dezer stammen na 8 dagen, geen indol aangetoond met het reagens van EHRLICH.

Uit den groei in zuren resp. alkalischen vischbouillon kan worden geconcludeerd, dat alle stammen van *Bact. phosphoreum* beter in alkalisch- dan in zuur milieu willen groeien.

Wat de gelatine- steek- en plaatculturen der diverse stammen betreft, waren de eerste spijskerculturen, terwijl de koloniën op de platen klein en zuiver rond waren, en voor het geval deze aan de oppervlakte lagen, kleine verhoogingen met een iet of wat grijsgele tint.

Het beslag op vischagar was dun, niet slijmerig en van dezelfde tint als de koloniën op de gelatine-platen.

Agarsteekculturen der onderzochte stammen der van zeevisch geïsoleerde *Bact. phosphoreum* zijn eveneens spijskerculturen.

Sporenvorming bij deze stammen is niet gevonden.

Bovendien werden behalve manniet, ook dulciet, sorbiet, arabiet, glycerine, alsmede glycerinaldehyde, lactose en saccharose niet door de onderzochte stammen vergist.

Het resultaat, hetwelke zooeven is genoemd, bleek na herhaalde plaatpassage der diverse stammen constant te zijn.

Vervolgens werd een dergelijk onderzoek met *Bact. phosphoreum* A en C gedaan. *Bact. phospho-*

reum B, welke ik van lichtend beendervleesch isoleerde was op dit oogenblik nog niet zuiver om voor dit onderzoek te worden gebezigd.

Daartoe werden Bact. phosphoreum A en C op de volgende voedingsbodems gecultiveerd:

Peptonwater (Pepton Brunnen-gräber)		spoor indol na 14 dagen
Lakmoes peptonwater		geen verkleuring
Glycerine	Lakm. Peptonwater	zuur — gas —
Sorbiet	„ „	„ — „ —
Manniet	„ „	„ — „ —
Dulciet	„ „	„ — „ —
Arabinose	„ „	„ — „ —
Xylose	„ „	„ — „ —
Glucose	„ „	„ + „ +
Mannose	„ „	„ + „ +
Galactose	„ „	„ + „ +
Fructose	„ „	„ + „ +
Maltose	„ „	„ + „ +
Lactose	Lakm. Peptonwater	zuur — gas —
Saccharose	„ „	„ — „ —
Natrium-pyrovinaat	„ „	„ + „ —
Vischpeptonwater		geen indolvorming na 14 dagen
Voedingsoplossing II volgens GERSBACH (Brunn.)		idem
Voedingsoplossing II volgens GERSBACH (Vischp.)		idem
Zure vischbouillon		zwak troebel
Alk. vischbouillon		troebel met ger. neerslag
Vischbouillonagar Steekc.		spijkercultuur
„ Plaatc.		kleine ronde vuilgele koloniën
„ Strijkc.		dun vuilgeel beslag
Vischbouillongelatine Steekc.		spijkercultuur
„ Plaatc.		als bij agarplaatcultuur
Neutraalrood-glucose-vischbouillon		gasv. fluorescentie

(Zie voor de samenstelling der voedingsbodems Hoofdstuk IV).

Agar-schudcultuur dezer bacteriën konden vanwege de hooge stoltemperatuur (37° C.) niet worden gemaakt, daar deze bij 37° C. afsterven.

Het pepton, voor deze onderzoeken gebruikt, is pepton BRUNNENGRÄBER.

Bij morphologisch onderzoek zijn beide stammen gram-negatieve, korte staafjes, welke aan de uiteinden zijn afgerond, dus geheel gelijk aan die stammen, welke voor het eerstgenoemde onderzoek zijn gebezigd.

Het culturiëel onderzoek leverde ten opzichte van de suikers glucose, mannose, galactose, fructose en maltose eveneens hetzelfde resultaat op; er treedt eveneens bij genoemde suikers zuur en gasvorming op. Ook lichten beide maltose-lakmoes-peptonwaterculturen.

Na 14 dagen is er in peptonwaterculturen, alsmede in de culturen in voedingsoplossingen volgens GERSBACH geen indol met behulp van EHRLICH's reagens aan te toonen. Na 14 dagen treedt er soms een geringe indolvorming op in peptonwater (Brunnengr.).

Bij het cultiveeren van *Bact. phosphoreum* A en C in natriumpyrovinaat-lakmoes-peptonwater treedt uitsluitend zuurvorming op. Lakmoes-peptonwater verkleurt niet en blijft violet.

De bouillon-, bouillonagar- en -gelatine-culturen hebben hetzelfde uiterlijk als bij de vorige proeven. Uit de overige suikers en meerw. alcoholen werd geen zuur gevormd.

Wat de gasvorming en fluorescentie bij de culturen in neutraalroodglucose-vischbouillon betreft, bestaat het gas uit ongeveer 25% kooldioxyde (aangetoond met natron) en de rest uit waterstof.

De samenstelling van dezen bouillon is niet geheel gelijk aan die der vorige, daar er 0.1% sec. natriumphosphaat in was opgelost. De samenstelling van het gas kan wisselen, omdat genoemde bouillon oorspronkelijk alkalisch is en er

dus een gedeelte van het gevormde kooldioxyde in oplossing blijft.

De verkregen resultaten der proeven tot vaststelling van morphologische en culturiëele eigenschappen van *Bact. phosphoreum* A en C zijn constant na plaatpassage der stammen.

Hoewel bij beide proevenserie's bacteriënpeptonen verschillend zijn geweest, is het resultaat ten opzichte van de vergistbare suikers hetzelfde.

Ook is de samenstelling van den vischbouillon van geen invloed op het kwalitatieve resultaat der gasvorming bij neutraalroodglucose-vischbouillon. Het sec. natrium-phosphaat (exsicc.) is in dit geval alleen als groeibevorderend agens toegevoegd.

Bact. phosphoreum A en C zijn dus gistende lichtbacteriën en komen, wat hun gedrag betreft, geheel met dat der peptonkoolstofbacteriën van BEYERINCK overeen, zoowel morphologisch als culturiëel.

Volgens de verkregen resultaten heeft de aard van het pepton op de gisting der bacteriën geen invloed. Wat de resp. gebezigde bacteriën betreft, is vergelijking geoorloofd, omdat *Bact. phosphoreum* C evenals de 10 stammen *Bact. phosphoreum* van het eerstgenoemde onderzoek van dezelfde soort zeevisch zijn geïsoleerd, n.l. *Gadus aeglefinus* L.

HOOFDSTUK VI.

Vaststellen van den invloed van de organische stikstofbron op de gisting, alsmede den invloed van enkele zouten. Identificatie-proeven van de lichtbacterie van lichtend vleesch afkomstig.

Nadat het intusschen gelukt was, de lichtende bacterie, van vleesch afkomstig, in reïncultuur te krijgen, werd deze

in seriecultuur gebracht op de voedingsbodems, welke in dit hoofdstuk zijn gebezigd.

Bij de eerste proevenserie werden als gistingsmilieu's vergeleken peptonwater, gemaakt van pepton Brunnengräber en gistwater, beide 0.1% sec. natriumphosphaat exsicc. bevattend.

Morphologisch was de vleeschphotobacterie geheel gelijk aan *Bact. phosphoreum* A en C, n.l. gram-negatief, een aan beide uiteinden afgerond, kort staafje, zonder eigen-beweging, gelatine niet vervloeiend en goed groeiend op vischbouillon en afgeleide bodems, welke 3% chloornatrium bevatten.

Volgens opgave van MOLISCH, welke eveneens had vastgesteld, dat *Bact. phosphoreum*, MOLISCH, welke hij van lichtend vleesch isoleerde, op genoemde bodems goed groeide, eveneens dezelfde morphologische eigenschappen had, n.l. een onbeweeglijk, kort, aan beide uiteinden afgerond staafje, gelatine niet vervloeiend, stemde deze bacterie geheel morphologisch en culturiëel met *Bact. phosphoreum* MOLISCH overeen, t.o.v. het Gram-kleuringsprocedé, met *Bact. phosphoreum* A en C.

Het moest nu nog culturiëel worden bevestigd, om te bewijzen, dat de van vleesch geïsoleerde bacteriënstam eveneens *Bact. phosphoreum* was.

Daartoe is genoemde lichtbacteriestam gekweekt op de volgende voedingsbodems:

Peptonwater (Brunnengräber)		spoor indol na 14 dagen			
Lakmoes peptonwater		violet			
Glycerine	Lakm. Peptonwater	zuur	—	gas	—
Manniet	" "	"	—	"	—
Arabinose	" "	"	—	"	—
Glucose	" "	"	+	"	+
Mannose	" "	"	+	"	+
Galactose	" "	"	+	"	+

Fructose	„	„	zuur + gas +
Maltose	„	„	„ + „ +
Natrium-			
pyrovinaat	„	„	„ + „ —
Neutraalrood glucose visch-			
bouillon			fluorescentie gas +
Alkalische vischbouillon			troebel met weinig neerslag
Zure vischbouillon			zwak troebel
Vischbouillonagar strijkc.			dun grijsgeel beslag
„ steekc.			spijkercultuur
Vischbouillongelatine plaatc.			kleine grijsgele koloniën, geen
			vervl.
„ steekc.			spijkercultuur

De samenstelling van het gasmengsel boven N. R. glucose-vischbouillon was hetzelfde als bij stam A en C.

De maltose-lakmoespeptonwatercultuur der bacterie is lichtend, zoodat de verkregen stam van lichtend vleesch morphologisch en culturiëel geheel met de stammen van C overeenstemt, alsmede met de opgegeven kenmerken van MOLISCH voor *Bact. phosphoreum* MOLISCH. In het verdere onderzoek is deze stam *Bact. phosphoreum* B genoemd.

Inmiddels was de groei van *Bact. phosphoreum* A, B en C zeer slecht geworden, hetgeen zich uitte in het gasvormend vermogen van de drie bacteriestammen. In verband hiermee werd de samenstelling van den vischbouillonagar gewijzigd. MOLISCH toch had vastgesteld, dat joodkalium en magnesiumsulfaat resp. het lichtend vermogen en den groei van *Bact. phosphoreum* MOLISCH gunstig beïnvloedden.

In verband met verdere proeven tot vaststelling van den invloed van de organische stikstofbron en enkele zouten op het gistend vermogen der onderzochte, A, B en C., moest eveneens de invloed van deze op den groei worden vastgesteld, zoodat de samenstelling van den kweekbodem ook werd gewijzigd en in plaats van pepton Brunnen-gräber pepton Poulenc werd gebruikt.

De samenstelling van den kweekbodem werd als volgt:

Vischwater afk. van <i>Gadus aeglefinus</i> , L. of <i>Pleuronectes platessa</i> , L., 200 g visch op 1 l water, aangezuurd met phosphorzuur (sg 1.7)... 1000 cm ³	Chloornatrium	30 g
Pepton Poulenc	Asparagine	1 „
	Glycerine	5 cm ³
	Joodkalium	0.25 g
	Magnesiumsulfaat	0.25 „

Deze oplossing werd met 10%-ige oplossing van natriumcarbonaat geneutraliseerd tot $\text{pH} = 7$ t.o.v. neutraalrood (0.1% in alcohol 96%).

(Zie voor behandeling enz. Hoofdstuk IV.)

De groei op vischbouillonagar, met bouillon van bovengenoemde samenstelling gemaakt, was veel beter, dan op vischbouillon-agar van de vorige samenstelling met pepton Brunnengraber en zonder deze zouten, zoodat overgegaan werd tot het gebruik van den kweekbodem van de gewijzigde samenstelling.

Tevens moest worden vastgesteld of asparagine invloed had op de reactie van het medium, wanneer *Bact. phosphoreum* A, B en C hierin werden gekweekt.

Asparagine ($\text{COOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$) biedt de mogelijkheid tot ammoniakafplitsing, wanneer bacteriën op deze stof inwerken, evenals alle α -aminozuren, daarom is het beter, dat men deze stof in glucosehoudenden vischbouillon weglaat.

Voor al bij culturen in alkalischen N. R. vischbouillon (glucosehoudend) kan asparagine door zijn ammoniakafplitsing een gedeelte van het kooldioxyde beletten te ontwijken. Daar het mengsel kooldioxyde-waterstof, dat bij inwerking van *Bact. phosphoreum* A, B, C, op glucose ontstaat, telkens wisselt, is het dus gewenscht geen asparagine in gistingsmedia te bezigen, aangezien men complicatie's als ammoniakafplitsing bij gisting in de voedingsbodems moet vermijden.

Teneinde te weten te komen of asparagine de oorzaak

was van verandering van de reactie t.o.v. neutraalrood, wanneer er in asparagine-neutraalrood-vischbouillon (alk.) *Bact. phosphoreum* A, B, of C werden gekweekt, werd een onderzoek daarna ingesteld.

Daartoe werd neutraalrood-asparagine-bouillon gebezigd, waarin resp. pepton POULENC en pepton BRUNNENGRÄBER waren opgelost, terwijl vischbouillon zonder glycerine werd genomen, het asparagine gehalte hierin bedroeg $\frac{1}{2}$ %.

Tevens werd lakmoes-glucose-vischbouillon onderzocht. Hierbij werd bouillon van dezelfde samenstelling als bij N. R. asparagine-vischbouillon gebruikt, waaraan bovendien $\frac{1}{2}$ % glucose en 10% lakmoesoplossing van KAHLBAUM werden toegevoegd.

In alle voor deze proeven gebruikte voedingsbodems waren joodkalium en magnesiumsulfaat in oplossing; zij zijn t.o.v. neutraalrood zwak alkalisch.

Onderstaande tabel geeft de reeks voedingsbodems weer:

Neutraalrood asparagine visch- bouillon (POULENC).	Lakmoes-glucose vischbouillon (POULENC).
Neutraalrood asparagine visch- bouillon (BRUNNENGRÄBER).	Lakmoes-glucose vischbouillon (BRUNNENGRÄBER).

Nadat de drie stammen van *Bact. phosphoreum* waren geënt, begonnen de culturen, waarin pepton POULENC aanwezig was, veel sneller te lichten dan die, waarin zich pepton BRUNNENGRÄBER bevond. Hetzelfde verschijnsel was eveneens bij vischbouillonagar gevonden, waarin joodkalium en magnesiumsulfaat, alsmede pepton POULENC waren opgelost.

Na vier dagen werden de resp. culturen nagegaan op hun reactie, t.o.v. van de gebruikte indicatoren. De glucosehoudende culturen waren zuur, alleen begon de gasontwikkeling in tegenwoordigheid van pepton POULENC binnen 24 uur, hetgeen niet het geval was in tegenwoordigheid van pepton BRUNNENGRÄBER.

De asparaginebouillonculturen waren niet veel ver-

anderd, wat hun resp. reacties t.o.v. neutraalrood betrof. Toch moet er voorzichtigheid worden betracht met het nemen van een conclusie, omdat in de voedingsbodems sec. natriumphosphaat in oplossing is, hetgeen bufferend werkt, zoodat men met het toevoegen van asparagine aan voedingsbodems voor deze bacteriën voorzichtig moet zijn.

Ook het toevoegen van glycerine late men liever na, wanneer men in vischbouillon de vergisting van glucose door *Bact. phosphoreum* wil bestudeeren: glycerine is in ieder geval een door bacteriën vergistbare stof.

Ten aanzien van het doen van contrôle-proeven, is het in ieder geval beter deze te veel te doen, dan een onzeker gistingsresultaat te verkrijgen. Daarom worden de suikervrije media, steeds blanco gecontrôleerd. Peptonen kunnen ook onder zuurvorming worden ontleed, evenals α -aminozuren. Daarom worden deze media met behulp van lakmoes op zuur- resp. alkalivorming door de daarin gecultiveerde bacteriën gecontrôleerd.

Bovendien wordt er als contrôle steeds in de steriele peptonoplossingen op de aanwezigheid van indol gereageerd met behulp van EHRLICH's reagens.

Door de passage van joodkalium- en magnesiumsulfaat-houdende bodems, alsmede door het gebruik van pepton POULENC in deze, was de groei der *Bact. phosphoreum* stammen aanmerkelijk verbeterd, zoodat overgegaan werd tot het nemen van proeven met diverse organische stikstofbronnen, welke als suikervrije gistingsmedia gebruikelijk zijn.

Genoemde proeven zijn steeds vergelijkenderwijze gedaan.

De eerste proevenreeks is die, waarbij peptonoplossing, gemaakt van pepton BRUNNENGRÄBER werd gebezigd, terwijl tevens is nagegaan, of sec. natriumphosphaat invloed heeft op de suikerontleding door *Bact. phosphoreum* A, B en C.

Daartoe zijn de volgende bodems gebruikt:

Lakmoes Peptonwater		zonder Na_2HPO_4			met Na_2HPO_4		
Glycerine	Lakm. Peptonwater	violet			violet		
		zuur	—	gas —	zuur	—	gas —
Manniet	" "	"	—	" —	"	—	" —
Arabinose	" "	"	—	" —	"	—	" —
Glucose	" "	"	+	" +	"	+	" +
Mannose	" "	"	+	" +	"	+	" +
Galactose	" "	"	+	" +	"	+	" +
Fructose	" "	"	+	" +	"	+	" +
Maltose	" "	"	+	" +	"	+	" +
Natrium-pyrovinaat	" "	"	+	" —	"	+	" —

De resultaten zijn voor en na plaatpassage geheel aan elkander gelijk, en stemmen onderling geheel overeen. De troebeling in de buizen was echter niet sterk. In bovengenoemde bodems is geen joodkalium of magnesiumsulfaat opgelost.

De tweede serie proeven zijn die, waarin pepton BRUNNENGRÄBER met pepton POULENC wordt vergeleken. Ook hier is gebruik gemaakt van de gistende eigenschappen van *Bact phosphoreum* A, B en C. De gebruikte voedingsbodems, waarin deze bacteriën gecultiveerd zijn, bevatten geen sec. natriumphosphaat in oplossing. Als vergistbare stoffen zijn genomen glucose en maltose.

De resultaten van deze vergelijkende proeven zijn in de volgende tabel weergegeven.

Lakmoes Peptonwater		Pepton POULENC	Pepton BRUNNENGRÄBER
Glycerine	Lakm. Peptonwater	violet	violet
Glucose	" "	zuur + gas +	zuur + gas +
Maltose	" "	" + " +	" + " +
		Culturen tamelijk sterk troebel	Culturen zwak troebel

De proeven, dienende om pepton POULENC met pepton BRUNNENGRÄBER te vergelijken, vielen evenals met vischbouillon, ook hier in het voordeel van eerstgenoemd pepton uit. Uit de waargenomen troebeling der culturen

der gebruikte microörganismen, hetgeen reeds in de tabel is gemeld, alsmede de gasvorming, welke bij het gebruik van pepton POULENC veel sterker was, blijkt een en ander.

De derde proevenreeks is gedaan om het peptonwater, gemaakt van pepton BRUNNENGRÄBER, met gistwater te vergelijken. Laatstgenoemd is ook als suikervrij milieu gebruikelijk. Echter is ook weer hier een blanco contrôle gedaan, omdat het mogelijk is, dat gistwater voor de *Bact. phosphoreum* A, B en C, vergistbare stoffen kan bevatten. In pepton-, zoowel als in gistwater is 0.1% sec. natrium-phosphaat exsicc. opgelost.

De resultaten der gistingsproeven met gist-, zoowel als met peptonwater zijn opgegeven in de volgende tabellen:

Lakmoesgistwater		violet			
Glycerine	Lakm. Gistwater	zuur	—	gas	—
Manniet	" "	"	—	"	—
Arabinose	" "	"	—	"	—
Glucose	" "	"	+	"	+
Mannose	" "	"	+	"	+
Galactose	" "	"	+	"	+
Fructose	" "	"	+	"	—
Maltose	" "	"	+	"	+
Natriumpyrovinaat	" "	"	+	"	—
Culturen zeer zwak troebel					

Lakmoespeptonwater		violet			
Glycerine	Lakm. Peptonwater	zuur	—	gas	—
Manniet	" "	"	—	"	—
Arabinose	" "	"	—	"	—
Glucose	" "	"	+	"	+
Mannose	" "	"	+	"	+
Galactose	" "	"	+	"	+
Fructose	" "	"	+	"	+
Maltose	" "	"	+	"	+
Natriumpyrovinaat	" "	"	+	"	—
Culturen zeer zwak troebel					

De resultaten der drie stammen *Bact. phospho-*

reum zijn in dit geval ook weer aan elkaar gelijk. Echter geeft fructose in gistwater opgelost, na cultiveeren geen gas, wel echter zuur, doch de groei in de gistwaterbodems was over het algemeen slecht, hetgeen uit de troebeling der culturen kon worden geconcludeerd, terwijl tevens de zure reactie van deze, voorzoover aanwezig, veel minder intens is.

Uit deze proeven blijkt eveneens, dat gistwater op zichzelf voor *Bact. phosphoreum* A, B en C geen vergistbare substanties bevat.

Voor samenstelling der gebruikte voedingsbodems zie Hoofdstuk IV.

De kweektemperatuur der bacteriën was bij deze proeven 19—22° C.

De contrôletijd der diverse proeven is 7 dagen.

Wat het resultaat van de vergelijkende gistingproeven betreft, is dit niet afhankelijk van het gebezigde stikstofmilieu. Ook de invloed van sec. natriumphosphaat op het gistend vermogen der onderzochte bacteriën, is voorzoover aanwezig, gering. Zuurvorming der microörganismen in de suikervrije voedingsbodems is niet gevonden. Wat den groei der bacteriën betreft, is deze in gistwater het slechtst iets beter in peptonwater, gemaakt van pepton BRUNNEN-GRÄBER, het best in de oplossing van pepton POULENC.

LITTERATUUR.

MOLISCH, Leuchtende Pflanzen, pag 55—66, 68—73, 87—89, 94—99.

BEYERINCK, Over lichtvoedsel en plastisch voedsel van lichtbacteriën
Verslagen der K. Ac. van Kunsten en Wetensch. Afd. Natuurkunde 2e reeks Deel VII 239—302.

MOLISCH, Ueber das Leuchten des Fleisches, insbesondere toter Schlachttiere, Bot. Zeitung 1903 pag. 7.

HOOFDSTUK VII.

Het gedrag van Bact. phosphoreum A, B en C, ten opzichte van polyosen, eiwitachtige stoffen en tryptophaan. Invloed van joodkalium en sec. ammoniumphosphaat op de gasvorming in neutraalrood-glucose-peptonwater. Vergelijking van neutraalrood-glucose-vischbouillon met neutraalrood-glucose-gistwater.

Bovengenoemde proevenreeks is gedaan naar aanleiding van de resultaten van het vorig hoofdstuk, dat n.l. pepton POULENC een geschikter voedsel is voor Bact. phosphoreum A, B en C dan pepton BRUNNENGRÄBER. Bovendien is tevens vischbouillon als stikstofbron voor genoemde bacteriën vergeleken met gistwater.

De eerste proeven zijn gedaan met vischbouillon van de oude samenstelling, n.l. waarin pepton BRUNNENGRÄBER werd gebruikt en magnesiumsulfaat en joodkalium niet in oplossing waren. Als tweede bodem werd gistwater genomen. Van beide stamvoedingsoplossingen werden neutraalroodglucose-bodems gemaakt, waarna bij het cultiveeren der bacteriën na afloop van de gisting der bodems verschillen in gasvorming en fluorescentie waren op te merken.

Gebruikt zijn voor deze proeven neutraalrood-glucose-gistwater (bev. 0.1% sec. natriumphosphaat en $\frac{1}{2}\%$ -ig glucose) en neutraalrood-glucose-vischbouillon (zonder asparagine en glycerine, maar 0.1% sec. natriumphosphaat exsicc, alsmede $\frac{1}{2}\%$ glucose bevattend).

Nahetentenderdriestammen Bact. phosphoreum in

gistkolfjes volgens EINHORN, waarin zich de bodems bevonden, werd, na afloop der gisting (4—5 dagen bij 21°), als resultaat verkregen, dat de fluorescentie in gistwater, zoowel als in bouillon optrad, al was deze in bouillon ook veel sterker. Het ontwikkelde gasquantum was bij gistwater gering, in tegenstelling met dat bij bouillon. Bovendien viel bij deze proeven op, dat het gasquantum dat *Bact. phosphoreum* B ontwikkelde, ongeveer de helft was, van hetgeen *Bact. phosphoreum* A en C ontwikkelden, welker hoeveelheden ongeveer gelijk waren.

Het kooldioxyde-gehalte van het gas, uit N.R. glucose-vischbouillon ontwikkeld, was ongeveer 30%, hetgeen met natron werd aangetoond, de rest was waterstof. In de samenstelling van het gas, dat door de drie stammen werd ontwikkeld, was geen verschil.

Het door *Bact. phosphoreum* A, B en C uit N. R. glucose-gistwater ontwikkelde gas is niet onderzocht, omdat de hoeveelheid te gering was om met zekerheid kooldioxyde te kunnen aantonen.

In ieder geval is het gebruik van gistwater voor het cultiveren van *Bact. phosphoreum* A, B en C, minder gewenscht, omdat de gasontwikkeling door den slechten groei veel geringer is.

Bij de volgende proeven worden de peptonen POULENC en BRUNNENGRÄBER met elkander vergeleken in de volgende voedingsbodems:

Neutraal-glucose-peptonwater

Neutraal-glucose-peptonwater met 0.01% sec. Ammoniumphosfaat

Neutraal-glucose-peptonwater met 0.01% sec. Ammoniumphosfaat + 0.025% Joodk.

Zie voor de samenstelling Hoofdstuk IV.

In bovengenoemde voedingsbodems, van de genoemde peptonen gemaakt, zijn de drie stammen A, B, C van *Bact. phosphoreum* geënt en gecultiveerd onder dezelfde omstandigheden als bij de vorige proeven.

Na het beëindigen der gisting was het resultaat, dat de fluorescentie in de drie oplossingen van pepton BRUNNENGRÄBER practisch niet was waar te nemen, terwijl in die van pepton POULENC fluorescentie in alle culturen optrad.

Het sterkst was deze bij de culturen, welke sec. ammoniumphosphaat en joodkalium in oplossing bevatten, het zwakst, bij de culturen, waarin deze zouten niet in oplossing waren. De culturen, waarin alleen sec. ammoniumphosphaat was opgelost, fluoresceerden iets sterker.

Wat de gasvorming betreft, is deze op de diverse bodems verschillend. Het geringst is deze in de culturen, waarin zich pepton BRUNNENGRÄBER in oplossing bevindt en toenemende naar mate er sec. ammoniumphosphaat, resp. sec. ammoniumphosphaat + joodkalium in oplossing aanwezig zijn.

Bij gebruik van pepton POULENC in plaats van pepton BRUNNENGRÄBER is de hoeveelheid gevormd gas door *Bact. phosphoreum* A, B en C veel grooter dan bij pepton BRUNNENGRÄBER.

De hoeveelheid gevormd gas is bij gebruik van pepton POULENC, zonder extra zouttoevoeging, grooter, dan bij pepton BRUNNENGRÄBER met de beide zouten joodkalium en ammoniumphosphaat (sec.).

Uit gemelde resultaten kan worden geconcludeerd, dat zouten als joodkalium en sec. ammoniumphosphaat, welke in het algemeen groeibevorderend werken op *Bact. phosphoreum*, deze werking in belangrijk mindere mate ontvouwen, indien een minder geschikt pepton aanwezig is.

Hetzelfde geldt voor gistwater en vischbouillon, welke eveneens, als suikervrije milieu's met elkander werden vergeleken. Hier wordt de invloed van sec. natriumphosphaat vrijwel tot nul gereduceerd.

Hetzelfde resultaat hadden de proeven met lakmoesgistwater en lakmoes-peptonwater uit het vorige hoofdstuk. Ook hier was de invloed van sec. natriumphosphaat practisch nihil.

Opmerkelijk was, dat de culturen, waarvan de bodems met ammoniak in plaats van met natriumcarbonaat waren geneutraliseerd, onder overigens gelijke omstandigheden, geen fluorescentie gaven.

Dat zelfde verschijnsel van niet willen fluoresceeren komt ook voor bij culturen van *Bact. coli* in neutraalrood-lactose-(glucose)-vleeschbouillon, vooral bij oudere culturen. Het gasmengsel, dat ook hier uit kooldioxyde en waterstof bestaat, gaat in volumen achteruit, terwijl de fluorescentie dan verdwijnt. Dit laatste is niet anders mogelijk, dan dat *Bact. coli* ammoniak uit de bouilloneiwitten maakt, hetgeen trouwens bekend is.

Als laatste gistingsproeven met *Bact. phosphoreum* A, B en C, zijn die ingesteld, welke ten doel hadden het gedrag dezer bacteriën t.o.v. dextrine, amyllum-solubile, ammoniumpyrovinaat en inuline vast te leggen.

Deze proeven zijn zoowel zonder, als met toevoeging van sec. ammoniumphosphaat geschied. Het gebruikte pepton hierbij is steeds dat van POULENC.

Ammoniumpyrovinaat is in dit geval genomen, om eventueele gasvorming gemakkelijker te maken. Om de reeks van deze bodems te completeeren is er later ook glucose en maltose aan toegevoegd. De concentratie dezer vergistbare stoffen was 1%.

Onderstaande tabellen geven het resultaat dezer proeven weer:

		met 0.1% sec Ammoniumphosphaat				idem zonder			
		violet				violet			
Lakmoes peptonwater (POULENC)	Lakm. Peptonwater	zuur	+	gas	+	zuur	+	gas	+
Glucose									
Maltose	" "	"	+	"	+	"	+	"	+
Dextrine	" "	"	—	"	—	"	—	"	—
Amylum Sol.	" "	"	—	"	—	"	—	"	—
Inuline	" "	"	—	"	—	"	—	"	—
Ammoniumpyrovinaat	Lakm.-peptonwater	"	+	"	—	"	+	"	—

Volgens nevenstaande tabel vormen *Bact. phosphoreum* A, B en C, zuur en gas uit glucose en maltose, zooals reeds bekend, echter geen zuur en gas uit dextrine, amyllum, solubile en inuline.

Uit ammoniumpyrovinaat maken *Bact. phosphoreum* A, B en C uitsluitend zuur, hetwelk eveneens het geval is met natriumpyrovinaat.

De culturen zijn na 5 dagen gecôntrôleerd, nadat deze gedurende dien tijd bij 20—22° C. zijn gecultiveerd; het verkregen gistingsbeeld is hetzelfde, hetzij er ammoniumphosphaat in de cultuurvloeistof aanwezig is, hetzij dit zout wordt weggelaten; dus ook dit zout heeft op de gisting een zeer geringen invloed.

Ook in dit laatste geval is het beeld der drie stammen *Bact. phosphoreum* A, B en C weer hetzelfde.

Het niet vergisten van dextrine en amyllum solubile is geheel in overeenstemming met de fermentproeven van BEYERINCK. Deze gebruikte *Bact. phosphoreum* (*Photobacterium phosphorescens* BEYERINCK) voor het aantoonen van maltose bij inwerking van diastase op zetmeel. Daartoe werd deze lichtbacterie op zetmeelhoudende vischgelatineplaten gecultiveerd, totdat de koloniën van *Bact. phosphoreum* verschenen. Wanneer op deze platen diastasehoudende vloeistofdruppels werden gedruppeld, nam de lichtintensiteit der koloniën in de omgeving der druppels sterk toe, hetgeen niet het geval was met *Bact. PFLÜGERI*, een met *Bact. phosphoreum* verwante lichtbacterie, welke in tegenwoordigheid van maltose niet licht.

Zooals bekend doet *Bact. phosphoreum* dit wel.

Vervolgens wordt het gedrag van *Bact. phosphoreum* nagegaan ten opzichte van tryptophaan, omdat *Bact. phosphoreum* in diverse peptonoplossingen gecultiveerd, alsmede in de voedingsoplossingen volgens GERSBACH (gemaakt van vischpepton resp. pepton BRUNNEN-

GRÄBER) practisch geen indol vormdt (een geringe roodkleuring met EHRLICH's reagens werd waargenomen na 14 dagen cultuurtijd).

Bact. phosphoreum groeit niet op een alk. gelatine tryptophaan-bodem met joodkalium en natriumphosphaat (vanzelfsprekend 3% keukenzout). Gelatine zou zeer geschikt geweest zijn, omdat dit een tryptophaanvrij eiwit is, echter bij contrôleeren met EHRLICH's reagens werd een sterke roodkleuring opgemerkt, zoodat verdere proeven met genoemden gelatine-tryptophaan-bodem werden gestaakt.

Voor onderstaande proeven werd dan ook vischwater gebruikt, dat eerst was aangezuurd met phosphorzuur en daarna alkalisch gemaakt met soda, waarin asparagine, ammoniumlactaat, joodkalium, mono-kaliumphosphaat en keukenzout waren opgelost volgens onderstaande samenstelling:

Vischwater, aangezuurd met phosphorzuur daarna alk. gemaakt met soda	500 cm ³	melkzuur met ammonia 24% te neutraliseeren) 2 ½ cm ³
Keukenzout	15 g	Mono-kaliumphosphaat 1 g
Ammoniumlactaat (sterke opl. verkregen door		Joodkalium 0.1 „
		Magnesiumsulfaat 0.1 „
		Asparagine..... 1 „

Na contrôleeren met behulp van neutraalrood werd in de bovengenoemde voedingsoplossing na voor-verhitten en filtreeren (zie hoofdstuk IV) 0.03% tryptophaan opgelost, en daarna gesteriliseerd.

De tryptophaanvrije oplossing werd met behulp van *Bact. splendidum* gecontrôleerd door deze bacterie hierin te enten en de cultuur na 8 dagen te destilleeren, waarna in het cultuurdestillaat met behulp van EHRLICH's reagens op de aanwezigheid van indol werd gereageerd. Met behulp van *Bact. splendidum* was op deze wijze vastgesteld, dat in de tryptophaanvrije cultuurvloeistof geen indolvorming had plaats gevonden, zoodat, een eventueel

positieve indolreactie in het cultuurdestillaat, indien tryptophaan in oplossing aanwezig is, althans op de ontleding van dit aminozuur wijst.

Genoemd onderzoek werd verricht met vischwater, afkomstig van *Pleuronectus platessa* L., aangezien bij onderzoek was gebleken, dat vischwater van *Pleuronectus flesus*, L. afkomstig, niet geschikt was, omdat *Bact. phosphoreum* A, B en C niet in een voedingsbodem met behulp van dit vischwater gemaakt, wenschten te groeien.

Bij nader onderzoek was in het destillaat van de cultuur van *Bact. phosphoreum* B een gering spoortje indol aanwezig na 8 dagen cultuurtijd echter niet in de cultuurdestillaten van *Bact. phosphoreum* A en C.

Aan de hand der verkregen resultaten van het culturiëel onderzoek bleek, dat *Bact. phosphoreum* B, zich behoudens kleine afwijkingen, verder culturiëel gedroeg als *Bact. phosphoreum* A en C.

Deze afwijkingen waren:

Een zeer geringe indolvorming uit pepton BRUNNENGRÄBER, getrypsineerd pepton (BRUNNENGRÄBER) en tryptophaan.

Geringere gasvorming bij het cultiveeren in neutraalrood-glucose-vischbouillon als *Bact. phosphoreum* A en C.

Langduriger en intenser lichten dan *Bact. phosphoreum* A en C.

In verband met het feit, dat natrium- zoowel als ammoniumpyrovinaat uitsluitend onder zuurvorming worden ontleed, is het de vraag of deze bacteriën bij het ontleden van pyrodruivenzuur acetaldehyde produceeren.

Uit het verkregen resultaat van het onderzoek der *Bact. phosphoreum* A, B en C blijkt, dat deze bacteriën tot BEYERINCK's peptonkoolstofbacteriën behooren, gezien het feit, dat glucose en fructose onder zuur- en gasvorming worden omgezet.

Voorts blijkt, dat genoemde bacteriën tot het bederf van vleesch en visch niet of in zeer geringe mate bijdragen,

omdat uit peptonen (WITTE, BRUNNENGRÄBER, POULENC en vischpepton) geen of ten hoogste een spoor indol wordt gevormd, terwijl er in het geheel geen zwavelwaterstofvorming is geconstateerd.

Evenmin is aangetoond, dat *Bact. phosphoreum* A, B en C, een diastatisch of invertierend ferment hebben, aangezien saccharose, lactose, alsmede dextrine en amyllum niet worden aangetast, hetgeen geheel met BEYERINCK's proeven en met BUCHANAN's opgegeven culturiëele kenmerken in overeenstemming is.

HOOFDSTUK VIII.

Sulfietgistingproeven met Bact. phosphoreum A, B en C.

In verband met het feit, dat bovengenoemde lichtbacteriën uit hexosen en maltose zuur en gas vormen, zijn proeven gedaan, om eenig inzicht te krijgen in het gistingsschema, wanneer *Bact. phosphoreum* in suikerhoudende media wordt gekweekt. Bovendien is nagegaan of pyrodruivenzuur, dat in NEUBERG's gistingsschema de bron van het aceetaldehyde is, ook bij deze bacteriën in tegenwoordigheid van sulfiet in aceetaldehyde wordt omgezet, evenals dit het geval is bij suikers of meerwaardige alkoholen, welke door bacteriën onder zuurvorming kunnen worden vergist.

Aangezien *Bact. phosphoreum* geen meerwaardige alkoholen, voorzoover deze onderzocht zijn, onder zuur- en gasvorming ontleedt, zijn deze proeven gedaan met glucose en pyrodruivenzuur; tevens is daarbij nagegaan, welke sulfiethoudende voedingsoplossing het beste resultaat waarborgt.

Als eerste sulfiethoudende voedingsbodem is een oplossing van onderstaande samenstelling gebezigd:

Pepton POULENC	10 g	Joodkalium	0.2 g
Chloornatrium	30 „	Magnesiumsulfaat	0.2 „
Natriumsulfiet cr. pr. an.	10 „	Water	1 l
Sec. natriumphosphaat exs.	1 „		

Bovengenoemde oplossing is na voorverhitten en filtreren over kolven van 400 cm³ verdeeld (100 cm³ per kolf) en gesteriliseerd onder toevoeging van 2 g geprecipiteerd calciumcarbonaat p.a. Na toevoeging van 1 g glucose is nogmaals gesteriliseerd.

Wanneer bovengenoemde oplossing voor het bestudeeren van de sulfietgisting van pyrodruivenzuur wordt gebruikt, wordt het natriumsulfiet toegevoegd, nadat het pyrodruivenzuur met natriumcarbonaat geneutraliseerd is. Het calciumcarbonaat is als laatste toevoeging gegeven, in dezelfde hoeveelheid als bij glucose.

Het steriliseeren der bodems (glucose- of pyrodruivenzuurhoudend) geschiedde bij 105° C. gedurende 20 minuten.

Na het cultiveeren der *Bact. phosphoreum* A, B en C in deze bodems gedurende 21 dagen bij 22° C., werd overgegaan tot het destilleeren der culturen, nadat aan deze 2½ g gekristalliseerd chloorbarium en 5 g zuiver calciumcarbonaat was toegevoegd.

De resp. destillaten werden met ijswater gekoeld en daarin op de aanwezigheid van aceetaldehyde gereageerd.

De reactie van RIMINI, met behulp van een 3%-ige piperidineoplossing en verd. nitroprussiednatriumoplossing was positief bij de destillaten der glucosehoudende culturen, echter zeer zwak bij die der pyrodruivenzuur-houdende.

Met behulp van nitrophenylhydrazine (para) was alleen in de destillaten van glucosehoudende culturen der *Bact. phosphoreum* aceetaldehyde aan te toonen, echter niet, bij die, waarbij oorspronkelijk pyrodruivenzuur in oplossing aanwezig was.

Daar echter de groei der bacteriën minder goed was, in verband met het aanwezig zijn van veel sulfietionen in

den voedingsbodem, werd overgegaan tot het gebruik van calciumsulfië, hetwelk door omzetting van chloorcalcium of calciumpyrovinaat met natriumsulfië in de te gebruiken voedingsbodems werd gemaakt, omdat dit zout, wanneer het uit de oplossing *ex tempore* ontstaat, een veel fijnere verdeeling heeft dan het handelsproduct. (Zie hoofdstuk IV.).

De voor deze proeven gebruikte voedingsbodem had de volgende samenstelling.

Water 1 l, pepton POULENC 10 g, keukenzout, 20 g voor glucosebodem, 30 g voor pyrodruivenzuurbodem.

Sec. natriumphosfaat $\frac{1}{2}$ g, joodkalium 0.2 g.

Voor de glucosehoudende oplossingen werd 1% natriumsulfië cr. p.a. toegevoegd en deze hoeveelheid met de berekende hoeveelheid calciumchlorideoplossing bedeed, waarbij het calciumsulfië neersloeg. De hoeveelheid chloornatrium is bij glucosehoudende oplossingen minder, omdat bij de omzetting van calciumchloride met natriumsulfië de ontbrekende hoeveelheid chloornatrium als reactieproduct wordt gevormd.

Daarna wordt $2\frac{1}{2}$ g zuiver calciumcarbonaat toegevoegd en gesteriliseerd op 110° C. gedurende 20 minuten; den daarop volgenden dag werd nog 1% glucose in den aldus verkregen voedingsbodem opgelost en nogmaals gesteriliseerd gedurende denzelfden tijd op 105° C.

De pyrodruivenzuurhoudende oplossing werd eenigszins anders gemaakt.

Nadat in sulfiëtvrij milieu pyrodruivenzuur door zuiver calciumcarbonaat was geneutraliseerd, werd 1% natriumsulfië in dit milieu opgelost. Hierdoor ontstond naast natriumpyrovinaat, calciumsulfië als reactieproducten dezer omzetting.

In dit geval was het chloornatriumgehalte 3%, in tegenstelling met het oorspr. gehalte in de stamoplossing, voor glucosehoudende vloeistoffen bestemd.

Er werd in tegenstelling met de vorige proeven 150 cm³ stamoplossing gebruikt,

Bact. phosphoreum A, B en C werden gedurende drie weken in de gebruikte voedingsbodem gecultiveerd bij 22° C. en daarna evenals de bij de vorige proeven het geval was, onder toevoeging van 2½ g bariumchloride en 5 g calciumcarbonaat de verkregen culturen gedestilleerd.

Bij het opvangen van de destillaten der resp. glucose-culturen in p. nitrophenylhydrazinereagens ontstond direct een dik neerslag van p. acetonitrophenylhydrazon terwijl de reactie van RIMINI, alsmede de reductie van een ammoniakale zilveroxydeoplossing zeer sterk waren.

Bij de destillaten van de pyrodruivenzuurhoudende culturen, was alleen de reactie van RIMINI positief, doch de vorming van nitrophenylhydrazon zeer gering, terwijl er bij het verwarmen van het destillaat met ammoniakale zilveroxyde-oplossing geen zilverspiegel gevormd werd, maar een geringe donkerkleuring optrad.

De verkregen resultaten der proeven wijzen er dus wel op, dat glucose door *Bact. phosphoreum* onder acetaldehydevorming wordt aangetast.

Aangezien echter onder dezelfde omstandigheden bij de ontleding van pyrodruivenzuur door deze bacteriën slechts een zeer geringe hoeveelheid acetaldehyde ontstaat, is voor dit feit geen andere verklaring mogelijk, dan dat deze stof volgens een ander gistingsschema zal worden ontleed dan glucose.

Uit deze proeven blijkt wel, dat men alvorens deze te beginnen, zich moet hebben overtuigd van de meest gunstige groeiconditie's der te onderzoeken bacteriën, alleen dan kunnen met de noodige zekerheid bepaalde culturiële eigenschappen worden vastgesteld. Dit laatste geldt vooral voor sulfietgistingproeven, waarbij altijd door de aanwezigheid van sulfiet, vooral als natriumsulfiet in de voedingsbodems is opgelost, de groei der bacteriën, zeer slecht kan zijn.

Het gebruik van in oplossing geprecipiteerd calciumsulfiet in plaats van natriumsulfiet heeft, vanwege de sterke alkalische reactie van dit laatste, bovendien voordeel, omdat vele suikers en meerwaardige alcoholen in alkalisch milieu bij verhitting verharsen.

De verkregen resultaten waren onderling geheel gelijk, zoowel bij gebruik van glucose, als van pyrodruivenzuur.

LITTERATUUR.

- A. J. LEFEVRE, Diss. Utrecht 1924, pag. 22—24.
V. H. v. D. BERG, Diss. Utrecht 1928, pag. 30—45.
RIMINI, Chem. Zentralblatt 1898 — II pag. 277.
C. NEUBERG, Biochemische Zeitschrift pag. 365 und 389.
-

Proeven met *Bacterium splendidum*.

HOOFDSTUK IX.

Vaststellen van de morphologische en culturiëele eigenschappen.

Bovengenoemde lichtbacterie is door BEYERINCK ontdekt, die hiervan de volgende morphologische en culturiëele eigenschappen heeft vastgesteld:

Eenigszins gekromd staafje, met sterke eigen-beweging (Vibrio).

Vervloeit gelatine aan de lucht, wordt in zijn groei door glucose belemmerd.

Vergist glucose onder zuurvorming, terwijl manniet de culturen sterker doet lichten. In suikervrije media zeer welig groeiend. (Zie hoofdstuk II).

Het onderzoek tot vaststellen der morphologische en culturiëele eigenschappen van *Bact. splendidum* is uitgevoerd met twee stammen A en B, welke beide welwillend waren afgestaan door Prof. Dr. A. J. KLUYVER te Delft, welke mij tevens een stam van *Bact. phosphoreum* ter beschikking stelde, waarvoor ik genoemden hoogleeraar nogmaals mijn welgemeenden dank betuig.

Ik kweekte daartoe beide stammen op de volgende voedingsbodems:

Peptonwater (BRUNNENGRÄBER)	Indolvorming na 4—5 dagen.
Lakmoes Peptonwater	blauw-violet
Glycerine Lakm. Peptonwater	zuur spoor gas —
Arabiet " "	" — " —
Sorbiet " "	" — " —
Manniet " "	" + " —
Arabinose " "	" — " —
Xylose " "	" — " —
Glucose " "	" + " —
Mannose " "	" + " —
Galactose " "	" + " —
Fructose " "	" + " —
Saccharose " "	" — " —
Lactose " "	" — " —
Maltose " "	" + " —
Natriumpyrovinaat-lakmoespeptonwater	" + " —
Zure vischbouillon (met pepton BRUNNENGRÄBER)	} Zoowel zure als alkalische vischbouillon, Opp. huidje, sterk troebel
Alk. vischbouillon (met pepton BRUNNENGRÄBER)	
Neutraalroodglucose vischbouillon (met pepton BRUNNENGR.)	} Geen gasvorming
Vischbouillonagar strijkcultuur	
" Plaatcultuur	Dik slijmig beslag
" Steekcultuur	Ronde koloniën, ong. 2 mm doorsnede
Vischbouillongelatine steekcultuur	Slijmerig
" plaatcultuur	Spijkercultuur
	Trechtersvormige vervloeiing na 4—5 dagen
	Schaalv. vervl. na 4—5 dagen. Kleine ronde Koloniën.
Voedingsoplossing volgens GERSBACH (pepton BRUNNENGRÄBER).	} Indol na 4—5 dagen
Voedingsoplossing volgens GERSBACH (vischpepton)	
Vischpeptonwater	
Peptonaardappel	
	Dik slijmerig beslag, sterk lichtend

Het resultaat dezer proeven is reeds voor het grootste deel vermeld.

Gelatinevervloeiing door deze bacteriën geschiedt alleen aan de lucht. De gelatine-plaatculturen van *Bact. splen-*

didum zijn kleine ronde koloniën, welke rondrijven in de vervloeiende gelatine. Deze is helder en slijmig van consistentie.

De koloniën op de vischagarplaten zijn veel grooter, doch ook slijmig.

In peptonwater resp. voedingsoplossing volgens GERSBACH, alsmede in zuren en alkalischen vischbouillon heeft de vorming van een oppervlaktehuidje plaats.

De kweektemperatuur, waarbij deze proeven zijn gedaan, is 19—21° C., waarbij de groei van beide stammen zeer weelderig is.

Morphologisch zijn de volgende eigenschappen vastgesteld:

Sterke eigen-beweging

Kort staafje, gekromd, hetgeen volgens GRAM gekleurd, bij het brengen in absoluten alkohol zijn kleurstof weer afstaat. (Gram-negatief).

Bij het kleuren van gefixeerde uitstrijkpreparaten van *Bact. splendidum* A en B met thionine en differentieeren met verdund azijnzuur (5%) zijn roode, gekromde staafjes te zien.

De resultaten blijken ook na plaatpassage constant te zijn.

Hoewel volgens opgave van BEYERINCK manniet als zogenaamde lichtstof kan fungeeren, wordt ook uit deze stof zuur gevormd door *Bact. splendidum*, zoodat de werking hiervan dezelfde is, als van glucose bij *Bact. phosphoreum*, die door beide bacteriën onder zuurvorming wordt vergist.

Het verschil dezer bacteriën in het gedrag t.o.v. glucose is, dat *Bact. phosphoreum* hieruit zuur en gas vormt, *Bact. splendidum* uitsluitend zuur.

HOOFDSTUK X.

Invloed van de organische stikstofbron op de gisting, van Bact. splendidum A en B, alsmede den invloed van enkele zouten hierop.

De eerste proeven, welke in die richting zijn gedaan, zijn die, waarbij als stikstofbron pepton BRUNNENGRÄBER is gebruikt, al of niet onder toevoeging van 0.1% sec. natriumphosphaat exsicc. Bij deze en volgende proeven is het organisch stikstofhoudende milieu steeds gecontrôleerd op eventueele zuurvorming met behulp van lakmoes. Hoewel bij pepton BRUNNENGRÄBER met behulp van dezen indicator geen omslag was waar te nemen, kan dit eventueel toch bij andere media geschieden, zoodat terwille van de zekerheid der resultaten steeds deze contrôle is toegepast.

Bij de zooeven genoemde proeven zijn de volgende voedingsbodems gebruikt:

		zonder Na_2HPO_4		met Na_2HPO_4	
		violet		ontkleurd	
Lakmoes peptonwater		zuur	+ gas —	Zuur na 4 dagen + na	10 dagen ontkleurd
Glycerine	Lakm. Peptonwater			zuur + gas —	
Manniet	" "	"	+ " —	" — " —	
Arabinose	" "	"	— " —	" — " —	
Glucose	" "	"	+ " —	" + " —	
Mannose	" "	"	+ " —	" + " —	
Galactose	" "	"	+ " —	" + " —	
Fructose	" "	"	+ " —	" + " —	
Maltose	" "	"	+ " —	" + " —	
Natriumpyrovinaat	Lkm.peptonwater	"	+ " —	" + " —	

Alle culturen zijn sterk troebel.

De zuurvorming uit glycerine is na 10 dagen +.

De kweektemperatuur is bij deze en volgende proeven van 22—24° C. geweest, terwijl de concentratie der overige opgeloste stoffen 1% is.

Vervolgens zijn gistwater en peptonwater (BRUNNENGRÄBER) aan een vergelijkend onderzoek onderworpen.

Bij deze proeven, welke in tegenwoordigheid van sec. natriumphosphaat zijn geschied, is echter gebleken, dat *Bact. splendidum* in blanco lakmoesgistwater zuur vormde, waardoor gistwater voor genoemde bacteriën als suikervrij medium geheel ongeschikt is gebleken.

Intusschen was de groeikracht van beide stammen erg verminderd. Aangezien uit de proeven met *Bact. phosphoreum* A, B en C, was gebleken, dat pepton POULENC in vischbouillonagar de ontwikkeling dezer bacteriën gunstig beïnvloedde, vooral in combinatie met joodkalium en magnesiumsulfaat.

Bij cultuurproeven met *Bact. splendidum* op de zoeven genoemden kweekbodem bleek, hetgeen bij *Bact. phosphoreum* het geval was, ook bij eerstgenoemde bacterie op te gaan.

Daarna werd een vergelijkende proef met pepton BRUNNENGRÄBER alleen en pepton POULENC gedaan, ten einde eventuele invloed op de gisting van *Bact. splendidum* te kunnen nagaan, waartoe de beide stammen A en B van deze bacterie in de volgende voedingbodems werden geënt:

		BRUNNENGRÄBER	POULENC
Lakmoes peptonwater		violet	violet
Glucose	Lakm. Peptonwater	zuur + gas —	zuur + gas —
Maltose	" "	" + " —	" + " —

Uit deze proeven blijkt, dat het stikstofmilieu een zeer geringen invloed heeft, maar vanwege het feit, dat de groei in de oplossingen van pepton POULENC een veel betere is dan in die van pepton BRUNNENGRÄBER, is eerstgenoemd pepton bij de volgende proeven gebruikt, waarbij tevens

is nagegaan of polyosen door *Bact. splendidum* onder zuurvorming worden ontleed.

Tevens is daarbij een gistingsproef gedaan met ammoniumpyrovinaat, omdat moest worden vastgesteld, of in tegenwoordigheid van ammoniak *Bact. splendidum* ook gas zou vormen. In verband hiermee is in plaats van sec. natriumphosphaat, sec. ammoniumphosphaat in dezelfde concentratie (0.1%) gebruikt.

Onderstaande tabel geeft de proeven met de daarbij behorende resultaten:

Lakmoes peptonwater (POULENC)		Zonder $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	met $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$
Glucose	Lakm. peptonwater	violet	ontkleurd
Maltose	" "	zuur + gas —	zuur + gas —
Dextrine	" "	" + " —	" + " —
Amylum	" "	" + " —	" + " —
(Solubile)	" "	" + " —	" + " —
Inuline	" "	" — " —	" — " —
Ammoniumpyrovinaat	Lakm. peptonwater	" + " —	" + " —

Uit deze tabel blijkt, dat *Bact. splendidum* A en B in staat zijn dextrine en amyllum solubile onder zuurvorming om te zetten, terwijl inuline niet wordt aangetast.

Verder doet het er niet toe, in welken vorm pyrodruivenzuur wordt gegeven, want ammoniumpyrovinaat wordt, evenals het natriumpyrovinaat, uitsluitend onder zuurvorming ontleed.

Bij de vorige proeven werd, in tegenwoordigheid van sec. natriumphosphaat, lakmoes-peptonwater (BRUNNENGRÄBER) en glycerine-lakmoes-peptonwater (idem) ontkleurd, evenals dit bij pepton POULENC bij aanwezigheid van sec. ammoniumphosphaat het geval was.

Bij het schudden van deze culturen met lucht, treedt na korten tijd weer de roode kleur op in de glycerinehouden-

de culturen, terwijl in de glycerinevrije een blauwvioletten kleur te voorschijn komt.

Dit ontkleuringsverschijnsel is als een bacteriële reductie van de lakmoeskleurstof op te vatten.

Het spreekt vanzelf, dat de in dit hoofdstuk beschreven proeven ook na plaatpassage steeds dezelfde resultaten hebben opgeleverd.

Wat het ontleden van amyllum solubile en dextrine door *Bact. splendidum* A en B betreft, moeten deze daarvoor een diastatisch enzym hebben.

BUCHANAN geeft in zijn *General Systematic Bacteriology* Vol. I op, dat geen der lichtbacteriën een dergelijk enzym zou afscheiden, dus m.a.w. niet in staat zou zijn, amyllum en dextrine te ontleden. Bij *Bact. splendidum* A en B blijkt echter het tegendeel.

In verband met BUCHANAN's publicatie zijn proeven gedaan om vast te stellen, of *Bact. splendidum* acetaldehyde maakt bij het ontleden van amyllum solubile. (Zie hiervoor het hoofdstuk XI.).

Conclusies:

In hoofdstuk IX en X is het gedrag van *Bact. splendidum* A en B ten opzichte van verschillende voedingsbodems beschreven. Uit deze proeven blijkt dat *Bact. splendidum* (A en B) de volgende stoffen onder zuurvorming vergist:

Glycerine, manniet, glucose, mannose, galactose, fructose, maltose, dextrine, amyllum solubile, natrium- en ammoniumpyrovinat.

Indol wordt gevormd uit vischpepton en pepton BRUNNEN-GRÄBER, terwijl dit bij nader onderzoek ook uit pepton POULENC het geval is, terwijl gelatine in tegenwoordigheid van zuurstof wordt vervloeid.

HOOFDSTUK XI.

Sulfietgistingsproeven met Bact. splendidum.

Dit onderzoek werd ter hand genomen, nadat bekend was van *Bact. splendidum*, dat deze uit verschillende suikers, meerwaardige alkoholen, alsmede uit dextrine, amyllum solubile en pyrodruivenzuur (als Na- of NH_4 -zout) in tegenwoordigheid van pepton- en lakmoesoplossing zuur vormde. Om na te kunnen gaan, in hoeverre deze bacterie in tegenwoordigheid van sulfieten in staat is genoemde stoffen onder vorming van aceetaldehyde te ontleden, werden de volgende gistingsproeven gedaan.

De samenstelling van het peptonmilieu was zoodanig, dat genoemde bacterie de kans werd gegeven om in tegenwoordigheid van natriumsulfiet, welk zout toch een sterk remmenden invloed heeft, in een dergelijken voedingsbodem, te groeien.

De peptonhoudende stamoplossing werd naar aanleiding van de voorafgaande proeven als volgt samengesteld:

Pepton POULENC	10 g	Joodkalium	0.2 g
Chloornatrium	30 „	Magnesiumsulfaat cr. ...	0.2 „
Natriumsulfiet cr. pr. an.	10 „	Water	1 L
Dinatriumphosphaat exs.	1 „		

Na voorverhitten en filtreeren van deze oplossing, werd in de kolven van 400 cm^3 inhoud, 100 cm^3 van genoemde stamoplossing gedaan en onder toevoeging van 2 g zuiver calciumcarbonaat gesteriliseerd. Naderhand werd in deze kolven 1 gram glucose opgelost en nogmaals gesteriliseerd (stamoplossing I).

Hierin werden *Bact. splendidum* A en B geënt, maar al spoedig bleek dat één der stammen niet groeide, terwijl er in de andere cultuur een sterke zwavelwaterstof-vorming plaats vond. Hoewel er na 21 dagen bij een temperatuur van 22–24° C. in deze cultuur aceetaldehyde was gevormd,

hetgeen werd geconstateerd door laatstgenoemde onder toevoeging van een 25%-ige chloorbariumoplossing, voor het neerslaan van sulfiet (en sulfaat) en 5 g calciumcarbonaat om de aldehyde-bisulfietverbinding te ontleden, te destilleeren en het verkregen destillaat met aldehyde-reagentia te bedeele; p. nitrophenylhydrazine, opgelost in 30%-ig azijnzuur, gaf met dit destillaat een neerslag van nitrophenylhydrazon, terwijl volgens RIMINI gereageerd met een 3%-ige piperidineoplossing + verd. nitroprussied-natriumoplossing de donkerbl. verkleuring, welke aceetaldehyde geeft, op vorming hiervan wees. Echter waren de reactie's niet zeer sterk, zoodat er gezocht werd naar een ander bodemsamenstelling, waarbij het sulfiet als calciumsulfiet aanwezig was, omdat dit een veel geringere oplosbaarheid heeft en dus op den bacteriëngroei niet zoo schadelijk is als het natriumsulfiet. De voedingsbodem hiervoor gebruikt had de volgende samenstelling:

Pepton POULENC	10 g	Dinatriumphosphaat exs.	$\frac{1}{2}$ g
Chloornatrium	20 „	Joodkalium	0.2 „
Natriumsulfiet p. a.	15 „	Water	1 L.

Genoemde stamoplossing II voor sulfietgisting bevat 1% chloornatrium minder, omdat bij het bedeele met chloorcalciumoplossing (5 cm³ eener 45%-ige oplossing van gekristalliseerd chloorcalcium per 150 cm³ stamoplossing II) er het ontbrekende chloornatrium bij de omzetting van natriumsulfiet met chloorcalcium ontstond.

Alleen bij het maken van pyrodruivenzuur-sulfiet-bodem, werd het genoemde zuur eerst met calciumcarbonaat ge-neutraliseerd in een sulfietvrije peptonoplossing, waarna na het ophouden van de kooldioxyde-ontwikkeling, 1 g natriumsulfiet aan de zoo verkregen pyrodruivenzuuroplossing werd toegevoegd. Ook op deze wijze ontstond calciumsulfiet, waardoor het pyrodruivenzuur als natriumzout in oplossing was. Het chloornatriumgehalte was bij de stamoplossing voor pyrodruivenzuurgisting 3%.

Wat het gedrag der *Bact. splendidum* A en B in dezen sulfietgistingsbodem II betreft, groeiden beide stammen hierin zeer vlot, zoowel op dien met pyrodruivenzuur als dien met glucose, glycerine, manniet en amyllum solubile, welke in sulfiethoudend milieu aan de inwerking van *Bact. splendidum* A en B zijn blootgesteld.

Dit laatste betreft alleen stamoplossing II. Bij stamoplossing I zijn alleen glucose en pyrodruivenzuur gebezigd, waarbij dit laatste als natriumzout in oplossing was gegeven. (Van te voren was dit zuur met sodaoplossing t.o.v. lakmoes geneutraliseerd).

Wat de aceetaldehyde-vorming betreft, blijkt bij nader onderzoek, dat pyrodruivenzuur in beide oplossingen slechts een spoor aldehyde doet ontstaan, wanneer deze met *Bact. splendidum* A en B zijn geënt.

Ook glycerine leverde hetzelfde resultaat op.

In beide gevallen was de reactie van RIMINI zwak positief.

De stoffen glucose, amyllum en manniet leverden, wanneer deze in de calciumsulfiethoudende stamoplossing II aan de inwerking van *Bact. splendidum* A en B waren blootgesteld rijkelijk aceetaldehyde. De bacteriën zijn, alvorens tot nader onderzoek der culturen is overgegaan, 21 dagen in oplossing I zoowel als in II gecultiveerd bij 22—24° C.

Laatstgenoemde culturen werden, alvorens deze werden gedestilleerd, bedeed met 2½ g gekristalliseerd bariumchloride en 10 g calciumcarbonaat p.a.

Bij het destilleeren dezer culturen leverden de glucose-, de amyllum- en de manniethoudende culturen rijkelijk aceetaldehyde, zoo zelfs, dat enkele druppels destillaat, in een oplossing van p. nitrophenylhydrazine direct een neerslag gaven van het acetonitrophenylhydrazon. De reactie van RIMINI was zeer intens.

Uit bovengenoemde proeven blijkt, dat *Bact. splendidum* in staat is om in sulfiethoudende peptonoplossingen, glucose, manniet en amyllum onder vorming van aceetalde-

hyde te vergisten, terwijl pyrodruivenzuur en glycerine slechts een geringe hoeveelheid aceetaldehyde geven. Daaruit kan dus worden geconcludeerd, dat stoffen als glycerine en pyrodruivenzuur door deze bacterie volgens een ander gistingsschema worden omgezet, als de stoffen glucose, amyllum solubile en manniet.

Bovendien is *Bact. splendidum* in sulfiethoudende peptonoplossingen moeilijk te cultiveeren, wanneer het sulfiet als natriumzout is gegeven.

Wat de indolvorming dezer beide stammen in sulfiethoudende milieu's betreft, is deze een zeer geringe, doch na 21 dagen wel in het destillaat der glucose-houdende cultuur aan te toonen. Wanneer echter een calciumsulfiethoudende peptonbodem met *Bact. splendidum* A werd geënt en na 8 dagen het destillaat der verkregen cultuur op indol werd onderzocht met EHRLICH's reagens, was deze reactie sterk positief, en het destillaat op methylood en phenolphthaleïne alkalisch, even als dit het geval was bij de peptoncultuurdestillaten van dezen stam. Calciumsulfiet heeft dus op de indolvorming geen invloed, echter wel op het verloop der bacteriële gisting; in dit geval moeten deze tenminste zes C-atomen bevatten, willen vergistbare stoffen door *Bact. splendidum* onder aceetaldehydevorming in tegenwoordigheid van calciumsulfiet worden aangetast.

De sulfietgistingssproeven zijn met beide stammen A en B gedaan, welke beide geheel hetzelfde resultaat hebben gegeven.

LITTERATUUR.

- A. J. LEFEVRE, Dissertatie Utrecht 1924, pag. 22—32.
 V. H. VAN DEN BERG, Dissertatie Utrecht 1928, pag. 30—45.
 RIMINI, Chem. Centralblatt 1898 — II, pag. 277.
 C. NEUBERG, Biochem. Zeitschrift 89, pag. 365 en 389.
-

HOOFDSTUK XII.

Het gedrag van Bact. splendidum A en B, ten opzichte van eiwitachtige stoffen. Vaststellen van den invloed van suiker en zouten op de indolvorming.

Bij het bestudeeren van de morphologische en culturiëele eigenschappen van *Bact. splendidum* bleek deze bacterie peptoniseerende eigenschappen te hebben, n.l. gelatine te vervloeien en uit enkele peptonen indol te vormen.

Er werd besloten een nader onderzoek naar de indolvorming in te stellen, daarbij lettende op den aard van de gebruikte eiwitachtige stoffen (eiwitten resp. peptonen), alsmede op den invloed van suiker en van toegevoegde zouten.

Als suiker werd bij deze proeven glucose genomen, terwijl als toegevoegde zouten eerst sec. ammoniumphosphaat en joodkalium werden gebruikt; later werden ook sec. natriumphosphaat, prim. kaliumphosphaat, magnesiumsulfaat en kaliumnitraat toegevoegd.

Als eiwitten werden caseïne, gedroogd kippeneiwit en tarweglutenmeel genomen, terwijl de handelspeptonen POULENC, WITTE, BRUNNENGRÄBER, CHAPEAUTÔT, DIEST en het zelf gemaakte vischpepton voor dit onderzoek zijn gebezigd.

Voor het bestudeeren van de indolvorming uit de drie genoemde eiwitten, moesten deze worden omgezet in oplosbare verbindingen, welke door een gehalte aan chloornatrium van 3% niet worden neergeslagen of bij sterilisatie bij hooge temperatuur niet worden gecoaguleerd.

Caseïne werd in een zwak alkalische $\frac{1}{2}\%$ chloornatriumoplossing door verwarmen tot kookhitte opgelost, terwijl de reactie dezer oplossing op lakmoespapier werd gecontrôleerd. Het alkalisch maken geschiedde in dit geval met natrium-

carbonaatoplossing. Na oplossen van de caseïne, hetgeen meestal ongeveer een uur duurde, werd, na afkoelen op 40° C. en aanvullen tot het oorspronkelijke volumen, aan de verkregen caseïneoplossing nog 0.04% trypsine GRÜBLER, 0.04% mono-kaliumphosfaat en 0.004% magnesiumsulfaat toegevoegd, de zoo verkregen trypsine-caseïne-oplossing werd onder bijvoegen van een mengsel van 10 cm³ toluol + 10 cm³ chloroform in een thermostaat bij 37° C. geplaatst.

Tarweglutenmeel werd op dezelfde wijze als caseïne behandeld; kippeneiwit echter werd, vanwege het feit, dat dit bij kookhitte neersloeg en zeker dit zou doen indien het chloornatriumgehalte opgevoerd werd tot 3%, hetgeen voor *Bact. splendidum* noodzakelijk was, geheel in de koude opgelost en ten slotte aan deze eiwitoplossing, na zwak alkalisch maken met natriumcarbonaat-oplossing en toevoeging van dezelfde hoeveelheden trypsine GRÜBLER, mono-kaliumphosfaat en magnesiumsulfaat als bij de caseïne-oplossing werden gebruikt, verder op geheel dezelfde wijze behandeld als deze. (Zie verder voor behandeling Hoofdstuk IV).

Alvorens tot een onderzoek van handelspeptonen over te gaan, werden eerst enkele hiervan, alsmede het zelfgemaakte vischpepton aan de inwerking van *Bact. splendidum* A en B blootgesteld, teneinde te kunnen vaststellen, of genoemde bacteriën uit deze stoffen indol vormden.

Ook werden proeven genomen met getrypsineerde caseïne, welke op de zooeven genoemde wijze is gemaakt.

A Voorproeven met de peptonen Poulenc, Witte, Brunnengräber en vischpepton, tevens met en zonder glucose-toevoeging, met en zonder sec. ammoniumphosfaat, alsmede al of niet in combinatie met kaliumjodide.

Uitgegaan werd bij deze proeven van een 1%-ige oplossing der genoemde peptonen, welke 3% chloornatrium

bevatte. Toegevoegd werden resp. $\frac{1}{2}\%$ glucose 0.01% sec. ammoniumphosfaat al of niet in combinatie met 0.025% kaliumjodide.

De volgende reeksen werden samengesteld:

Peptonwater

"	+	$\frac{1}{2}\%$ glucose		
"	+	0.01% sec. Ammoniumphosfaat		
"	+	0.01% "	"	+ $\frac{1}{2}\%$ glucose
"	+	0.01% "	"	+ 0.025% Kaliumjodide
"	+	0.01% "	"	+ 0.025 % Kaliumjodide + $\frac{1}{2}\%$ glucose.

In deze oplossingen werden *Bact. splendidum* A en B geënt en na een cultuurtijd van 5 dagen bij 22—24° C. in de culturen met behulp van EHRLICH's reagens op indol gereageerd.

De indolreactie in de glucosehoudende culturen was negatief. In de glucosevrije culturen was deze het sterkst in de oplossingen van pepton POULENC, het zwakst in vischpeptonoplossingen. In de overige culturen was de indolreactie sterker als die in vischpeptonoplossingen, zwakker als in die van pepton POULENC.

De intensiteit der indolreactie in de resp. peptonoplossingen wordt iets versterkt door de toevoeging van sec. ammoniumphosfaat, alsmede door de gecombineerde toevoeging van het zoeven genoemde zout en kaliumjodide.

De volgorde, waarin de intensiteit der indolreactie werd waargenomen, is die, waarin de peptonen in het opschrift zijn geplaatst.

De contrôle met EHRLICH's reagens van de steriele blanco pepton-oplossingen leverde geen resultaat op, zoodat de aanwezigheid van indol na enten met *Bact. splendidum* A en B, dit door deze bacteriën uit de resp. peptonen moet zijn gevormd.

De aanwezigheid van glucose belet indolvorming uit pepton door *Bact. splendidum*, hetgeen uit de af-

wezigheid van indol in de glucosehoudende culturen kan worden geconcludeerd.

De toegevoegde zouten hadden in het geheel geen invloed in de glucosehoudende oplossingen, slechts een zeer geringe in de glucosevrije oplossingen.

B Voorproeven met Caseïne.

Voor de proeven werd een 1.2%-ige caseïneoplossing gebruikt, welke na trypsinisatie en filtreren onder toevoeging van 2½% chloornatrium, was bedield resp. met 0.11% sec. natrium- of ammoniumphosfaat en daarna voorverhit was gedurende 10 minuten op 110° C. in de autoclaaf. (Zie hoofdstuk IV).

Na afkoeling werden de oplossingen gefiltreerd en aan die oplossing, welke natriumphosfaat bevatte nog 2 g calciumcarbonaat per 100 cm³ toegevoegd.

Beide stammen A en B werden in de resp. bodems geënt en na een cultuurtijd van 30 dagen bij kamertemperatuur onderzocht.

Daartoe werden de resp. cultuurvloeistoffen met aether geperforeerd, eerst alkalisch en daarna nog eens, na aanzuren met HCl tot zwak zuur op lakmoes.

De resp. alkalische perforaten gaven alle met EHRLICH's reagens een zeer sterke indolreactie, terwijl de zure perforaten dit in het geheel niet deden.

Genoemde perforaten bleken na indampen hogere vetzuren te bevatten, hetgeen werd aangetoond, door de indamprest dezer aetherische perforaten in 0.1 N natronloog op te lossen en met koperacetaat in de verkregen oplossingen te reageeren. Dit laatste geschiedde in de koude. Na zacht verwarmen, werd het met koperacetaat verkregen neerslag afgecentrifugeerd en vervolgens onder het microscoop bekeken, het bleek uit kristalletjes van koperacronaat en -caprylaat te bestaan.

Capron- en caprylzuur komen echter ook in het melkvet voor. Aangezien caseïne p.u.i. door de bereiding altijd melkvet bevat, is het moeilijk vast te stellen of genoemde zuren uit de caseïne dan wel uit het melkvet afkomstig zijn, omdat de caseïne gedurende langere tijd bij hoge temperatuur verhit is geweest met verdunde natriumcarbonaat-oplossing, waardoor een geringe verzeeping van het melkvet altijd mogelijk is.

Vanwege het feit, dat dit vet eveneens tot ongewenste troebeling in de resp. oplossingen aanleiding geeft, zijn deze proeven met ontvette caseïne herhaald.

De invloed van extra toegevoegde fosphaten was geheel gelijk. Het maakte niet uit, of er sec. natriumphosfaat of ammoniumphosfaat werd gebruikt.

Daar extra toevoeging van fosfaat een sterke bruinkleuring der getrypsiniseerde caseïneoplossing bewerkte, werd dit in het vervolg nagelaten.

Bij het overdoen der proeven, zooeven gemeld, echter zonder extra toevoeging van fosphaten, werd na den zelfden cultuurtijd (30 dagen) bij destillatie dezer culturen hetzelfde verkregen, als bij perforatie. Naar de verdere ontledingsproducten der caseïne werd geen nader onderzoek ingesteld, omdat in verband met deze proeven tot vaststelling van indolvorming door *Bact. splendidum* uit verschillende peptonen en getrypsiniseerde eiwitstoffen het alleen om deze ging.

Ten slotte zijn deze proeven nog met ontvette caseïne gedaan, zonder extra fosfaat-toevoeging en de cultuurtijd tot 10 dagen verminderd, omdat reeds na korteren cultuurtijd indol in de peptonwaterculturen werd aangetoond. Hierbij zijn de culturen alleen gedestilleerd. De destillaten der twee culturen resp. van *Bact. splendidum* A en B gaven onderling geen verschillen. Beide gaven met EHRLICH's reagens een zeer sterke indolreactie, en reageerden t.o.v. methyloord, lakmoes en phenol-

phtaleïne alkalisch. Ook de cultuur-vloeistoffen reageerden op phenolphtaleïne en methylrood alkalisch, terwijl bij het aanzuren met zoutzuur der resp. destillaten der culturen een sterke nevel werd waargenomen. Dit verschijnsel zou eventueel op ammoniak kunnen wijzen, het is echter niet nader onderzocht.

Bij contrôle gaf de steriele, getrypsineerde caseïneoplossing een zwak positieve indolreactie, echter niet het daaruit verkregen destillaat. Daarom werd in het vervolg uitsluitend in de destillaten der verdere culturen op indol gereageerd, terwijl er steeds een contrôle met EHRLICH's reagens op de resp. onderzochte voedingsbodems, alsmede op de destillaten ervan, is gedaan.

C *Proeven met tryptophaan.*

De eerste proeven met behulp van *Bact. splendidum* uit tryptophaan indol te maken zijn in een gelatineoplossing geschied. De samenstelling van deze gelatineoplossing was de volgende:

Gelatine Delft	20 g	Sec. Natriumphosfaat .	1 g
Chloornatrium	30 „	Water.....	1000 cm ³
Joodkalium	0.1 „		

Deze oplossing werd na geneutraliseerd te zijn t.o.v. neutraalrood met een 10%-ige sodaoplossing 10 min. op 110° C. verhit, na afkoelen gefiltreerd en hieruit twee oplossingen gemaakt, n.l. een met 0.1% tryptophaan en een met 0.1% tryptophaan + ½% glucose. Deze oplossingen werden over buizen verdeeld, terwijl ook een aantal buizen met de gelatineoplossing werd gemaakt. Toen *Bact. splendidum* A en B in deze media werden geënt, bleek, dat deze niet wilden groeien, terwijl bovendien de tryptophaanhoudende oplossingen zonder geënt te zijn, met EHRLICH's reagens een zeer sterke reactie gaven, zoodat naar andere media moest worden gezocht. Hiervoor werd genomen het vischextract, afkomstig van schol, omdat

ook gebleken was, dat het extract van bot niet het meest gewenschte medium hiervoor was, ofschoon *Bact. splendidum* zich niet als een zeer kieskeurige bacterie had voorgedaan. Deze bacterie bleek in vischextract, waarin asparagine, ammoniumlactaat, alsmede magnesiumsulfaat, joodkalium en mono-kaliumphosphaat waren opgelost, zeer goed te groeien. Onderzocht werden in deze richting het extract van bot (*Pleuronectus flesus* L.) schol (*Pleuronectus platessa* L.) en tenslotte dat van schelvisch (*Gadus aeglifinus* L.). Het extract, afkomstig van *Pleuronectus platessa* L. werd eerst gebruikt en werd op dezelfde wijze gemaakt en verwerkt als het voor alkalischen vischbouillon gebruikt extract. Hetzelfde geldt voor extract, gemaakt van *Gadus aeglifinus* L. (Zie hoofdstuk IV). Het aangezuurde extract werd na verhitten en filtreeren met soda geneutraliseerd met 10%-ige sodaoplossing en daarin asparagine, ammoniumlactaat, magnesiumsulfaat, monokaliumphosphaat en joodkalium opgelost. Het gehalte aan tryptophaan dezer oplossingen was 0.03%.

Eerst werden proeven gedaan met het extract van *Pleuronectus platessa*, met en zonder tryptophaan. Beide stammen A en B van *Bact. splendidum* werden in de resp. oplossingen geënt, waarbij bleek, dat de cultuurvloeistof, der tryptophaanhoudende oplossingen na 36 uur reeds indol bevatte, hetgeen met EHRLICH's reagens werd aangetoond. De tryptophaanvrije cultuur gaf deze reactie niet, althans na 36 uur. Toen na zes dagen alle culturen werden gedestilleerd, was er in de destillaten der tryptophaanculturen een zoodanige reactie met EHRLICH's reagens, dat in de koude na aanzuren met zoutzuur het opgeschonken reagens direct rood kleurde, terwijl er bij de destillaten der tryptophaanvrije culturen eerst bij verwarming, na aanzuren en het opschenken van het zooeven genoemde reagens een lichtrose verkleuring hiervan was te zien. Hiermee is dus wel aangetoond, dat *Bact. splendidum* A zoowel als

B ook uit tryptophaan indol maakten, hetgeen met de verwachting geheel overeenstemde. Verder moest worden nagegaan of glucose de indolproductie verminderde of verhinderde onder dezelfde omstandigheden. Niet geënte vischextract-tryptophaan oplossing bleek bij contrôle met EHRLICH's reagens geen verkleuring te geven.

Voor de proeven, waarbij den invloed van glucose op de indolvorming uit tryptophaan is nagegaan, werd extract van *Gadus aeglifinus* L. gebruikt. In genoemd extract zijn dezelfde stoffen opgelost als bij de vorige proef, maar deze oplossing gaf een zwakke indolreactie met EHRLICH's reagens, het destillaat ervan niet. *Bact. splendidum* A werd in dit geval gebezigd, en gezet op de volgende serie:

- 1 Bodem, samengesteld als vorige proef
- 2 Bodem, samengesteld als vorige proef, met 1% glucose
- 3 Bodem als bij 1, echter met 0.03% tryptophaan
- 4 Bodem als bij 3, echter + 1% glucose.

De cultuurtijd was 8 dagen, de kweektemperatuur 22—24° C. Na dezen tijd werden alle culturen aan destillatie onderworpen. Alle destillaten reageerden t.o.v. phenolphthaleïne alkalisch, hetgeen niet te verwonderen is, omdat zoowel asparagine als ammoniumlactaat metalkali gekookt, ammoniak afsplitsen. De indolreactie t.o.v. EHRLICH's reagens was echter geheel verschillend. Het destillaat van culture 1 en 2 gaf in het geheel geen indolreactie, hetzelfde van culture 4 gaf een zwak positieve indolreactie, maar dat van culture 3 gaf een zeer sterke indolreactie. Hieruit is dus te concludeeren, dat glucose het indolvormend vermogen van *Bact. splendidum* vermindert, maar niet geheel belet. Echter moest bij het destillaat der glucosehoudende cultuur een kristalletje ammoniumpersulfaat worden toegevoegd, alvorens er kleuring optreedt, hetgeen bij het destillaat der glucosevrije cultuur van genoemde bacterie niet noodig is. Ook was het verwarmen in het laatste geval geheel overbodig.

D *Proeven met getrypsineerd kippeneiwit (Albumen ovor. sicc.) en geëxtraheerd tarweglutenmeel (Tekal).*

Bovengenoemde eiwitten, het eerste dierlijk, het laatste plantaardig eiwit, werden getrypsineerd, omdat het eerste bij verhitting coaguleert en het laatste in water niet oplosbaar is. (Over de bereiding dezer oplossingen zie hoofdstuk IV). Beide oplossingen reageerden met EHRLICH's reagens, maar het destillaat van getryps. kippeneiwitoplossing deed dit niet; echter reageerde het destillaat van het getrypsineerde tarweglutenmeel wel. Beide eiwitoplossingen gaven, na geënt te zijn met *Bact. splendidum* A na 6 dagen cultuurtijd, een positieve indolreactie. De kweektemperatuur was ook hier 22—24° C. In verband met het feit, dat de steriele oplossing van het tarweglutenmeel een met EHRLICH's vloeistof reageerend destillaat gaf, was het verkregen resultaat, n.l. dat *Bact. splendidum* in genoemden bodem geënt, indol zou leveren, niet geheel betrouwbaar. Voorts waren beide destillaten t.o.v. methylrood alkalisch, maar zuur t.o.v. phenolphtaleïne, in tegenstelling met die der culturen in de oplossingen van getrypsiniseerde caseïne, waaruit dus bleek, dat *Bact. splendidum* in eerstgenoemde oplossingen niet zoo goed groeide. De destillaten van de caseïenculturen waren alkalisch t.o.v. phenolphtaleïne en methylrood.

Uit de cultuurproeven, welke met peptonen, getrypsineerde eiwitten en tryptophaan zijn gedaan, is een overzicht verkregen eenerzijds van de indolvorming van *Bact. splendidum* uit genoemde stoffen, terwijl anderzijds gebleken is, dat in tegenwoordigheid van glucose het indolvormend vermogen dezer bacterie in de onderzochte gevallen soms geheel is verdwenen, althans sterk achteruitgegaan. Naar aanleiding van de in dit hoofdstuk verkregen resultaten werd overgegaan tot het onderzoek van handelspeptonen.

HOOFDSTUK XIII.

Onderzoek van handelspeptonen en vischpepton met behulp van Bact. splendidum.

Ofschoon er in het vorige hoofdstuk reeds gedeeltelijk een onderzoek is gedaan met enkele handelspeptonen, is het onderzoek hiervan in dit hoofdstuk meer uitgebreid, teneinde te weten te komen, in hoeverre handelspeptonen in het algemeen geschikt zijn voor het vaststellen van indolvorming van bacteriën. In verband met de verschillende afkomst der handelspeptonen is het noodzakelijk, deze op al of niet indolvorming te contrôleeren.

Genoemd onderzoek is hier gedaan met *Bact. splendidum*, maar kan echter met iedere bacterie geschieden, waarvan met zekerheid bekend is, dat deze uit pepton indol maakt en wanneer dit niet met zekerheid is vastgesteld, kan men dit met behulp van een getrypsiniseerde caseïneoplossing vaststellen, omdat van dit eiwit met zekerheid bekend is, dat het tryptophaanhoudende complexen bevat.

De werkmethode, waarmee eventueele indolvorming uit verschillende peptonen kan worden vastgesteld, is zeer eenvoudig.

Daartoe wordt een 1%-ige oplossing van een handelspepton gemaakt en deze eerst met behulp van EHRLICH's reagens op de aanwezigheid van indol gecontrôleerd. Is de reactie positief, dan contrôleert men het destillaat van deze oplossing op de aanwezigheid van indol. Wanneer de reactie in het destillaat ook positief is, gebruikt men dat pepton niet.

Wanneer men vanwege de snellere diagnose, liever niet tot destillatie overgaat, is een pepton, dat in steriele oplossing deze reactie geeft, evenmin bruikbaar.

Wanneer men met behulp van indolvormende bacteriën

vast wil stellen, of een pepton hiervoor geschikt is, kiest men een bepaaldesoort en onderzoekt met deze de peptonopl.

Voor *Bact. splendidum* is een gehalte van 3% chloornatrium noodzakelijk, voor andere bacteriën zal meestal een andere concentratie van keukenzout dienen te worden gebezigd.

De concentratie van het pepton kiest men zoodanig, dat de groei eveneens is gewaarborgd. Eventueel voegt men nog een kleine hoeveelheid sec. natriumphosphaat toe.

Wanneer men neemt een grootere hoeveelheid peptonoplossing (100—150 cm³) en ent hierin een indolvormende bacterie. Na 8 dagen cultuurtijd (of zooveel langer als dit noodig mocht zijn) wordt de bacteriëncultuur gedestilleerd, nadat eerst op indol is gereageerd.

Mocht de indolreactie in de cultuurvloeistof zoowel als in het destillaat daarvan negatief zijn, dan is het pepton niet geschikt om te worden gebezigd. Het beste doet men met EHRLICH's reagens de aanwezigheid van indol vast te stellen, omdat hierdoor indol, alsmede α - en β -methyliindol worden aangetoond, maar indolcarbonzuur en -azijnzuur niet.

De nitroprussiednatriumreactie op indol is specifiek, maar weinig gevoelig. Omtrent het aantoonen van indol in de cultuurdestillaten wordt verwezen naar het slot van dit hoofdstuk, waar de genoemde methoden zullen worden besproken.

Het verwijderen van indol uit bacteriën-culturen kan behalve door de destillatiemethode eveneens door perforatie met aether geschieden.

Wanneer men snel wil werken, komt laatste methode niet in aanmerking, wel, wanneer men een eventueel aanwezig zijn van indolcarbonzuur of indolazijnzuur naast indol in een bacteriëncultuur wil vaststellen.

Aangezien bij literatuuronderzoek is gebleken, dat indolcarbonzuur en indolazijnzuur (β) met stoom niet vluch-

tig zijn, is vooral, wanneer de cultuur alkalisch is of na natriumcarbonaat-toevoeging wordt gedestilleerd, alleen indol en eventueel zijn twee derivaten α - en β -methylindol in het destillaat aanwezig.

Het blijkt echter, dat bij vergelijking der uitkomsten bij een onderzoek met pepton POULENC, dat culturen al of niet zonder toevoeging van natriumcarbonaat gedestilleerd, geheel dezelfde resultaten geven; daarom is het toevoegen van soda-oplossing aan de culturen in het vervolg geheel achterwege gelaten.

Genoemde proef is gedaan, om de mogelijkheid van het ontleden van eventueel gevormd β -indolcarbonzuur te verhinderen, dat bij kookhitte kooldioxyde afsplitst en dan met stoom vluchtig indol levert.

Is in een destillaat van een aangezuurde bacteriëncultuur indol aanwezig, wanneer van te voren in alkalische oplossing al het aanwezige indol is verwijderd, hetzij door perforatie of destillatie, dan wijst dit op β -indolcarbonzuur in de cultuur.

Genoemd zuur wordt door *Bact. splendidum* echter zeer weinig gevormd, hetgeen blijkt uit het feit, dat, wanneer een peptonwatercultuur dezer bacterie, na alkalisch gemaakt te zijn met natriumcarbonaat, na 5 dagen bijna geen β -indolcarbonzuur in de cultuur aanwezig is. Dit werd aangetoond, door na 5 dagen bij 22—24°C. *Bact. splendidum* in een oplossing van pepton POULENC te kweken, daarna te perforeren (de cultuurreactie is hier altijd alkalisch) en na contrôle op de algeheele verwijdering van indol, de uitgeperforeerde cultuurvloeistof na aanzuren te destilleeren. Het destillaat, op deze wijze verkregen, geeft een zéér geringe indolreactie met EHRLICH's reagens.

De indolreactie der destillaten van glucosehoudende culturen van *Bact. splendidum* is eveneens een zeer geringe. In hoeverre deze bacterie indolverbin-

dingen vormt, welke geen reactie geven met EHRLICH's reagens, is niet nagegaan.

Bij het onderzoek van handelspeptonen met behulp van *Bact. splendidum* gaat het erom, vast te stellen, of een pepton geschikt is, om de indolvorming der bacteriën te bestudeeren. Zoolang de destillaten der onderzochte culturen met EHRLICH's reagens reactie geven, kan alles, wat het aantoonen van zure indolderivaten betreft, geheel achterwege blijven.

A *Onderzoek van Pepton Diest.*

Genoemd pepton werd meegebracht uit Brussel en is afkomstig van de Pharmacie Centrale de la Belgique en wordt door het Hospitaal te Diest gefabriceerd.

Dit pepton gaf in oplossing reeds met EHRLICH's reagens een kleuring, maar het destillaat der oplossing niet. Tevens werd nagegaan, wat de invloed van enkele zouten op de indolvorming van *Bact. splendidum* was, alsmede die, welke glucose op deze eigenschap uitoefende.

Daartoe werd de volgende serie ingezet:

- 1 Peptonwater zonder extra toevoeging
- 2 „ met Magnesiumsulfaat + (Calciumcarbonaat)
- 3 „ „ Joodkalium
- 4 „ „ Monokaliumphosphaat
- 5 „ „ Dinatriumphosphaat
- 6 „ „ Kaliumnitraat
- 7 „ „ Kaliumsulfaat + (Calciumcarbonaat)
- 8 Glucosepeptonwater zonder extra toevoeging
- 9 „ met Calciumcarbonaat
- 10 „ „ Natriumphosphaat (Di-)

Toegevoegd werden 100 mg zout op 150 cm³ oplossing, zoowel aan peptonwater als aan glucose-peptonwater. Dit

bevatte 1% glucose, terwijl er van calciumcarbonaat ook 1% werd toegevoegd.

Naderhand werd deze serie nog uitgebreid met 2 oplossingen, waaraan eveneens calciumcarbonaat werd toegevoegd, hetgeen resp. achter deze is vermeld.

Alvorens tot enten der diverse voedingsoplossingen over te gaan, werd gereageerd op nitriet in de blanco-oplossing, en in de kaliumnitraathoudende, welke beide geen resultaat opleverden. Deze reactie's werden gedaan met behulp van joodkalium en azijnzuur in tegenwoordigheid van amylumoplossing. Ook werd op sulfide gereageerd door de peptonoplossing, na zuur maken met zoutzuur, te koken en een loodacetaatpapier in de damp te houden, hetgeen eveneens niets opleverde. Het resultaat der indolreactie was positief, hetgeen reeds werd vermeld, alsmede het resultaat van het onderzoek van het destillaat dezer oplossing.

Genoemde voedingsbodems werden daarna geënt en daarbij het volgende resultaat verkregen.

Na zes dagen cultuurtijd bij 22—24° C. gaven *Bact. splendidum* A en B hetzelfde resultaat. Zwavelwaterstof werd gevormd in alle oplossingen, behalve in de glucose-, resp. de kaliumnitraat-houdende. De destillaten der culturen, welke geen glucose bevatten, reageerden alle op methylrood en phenolphthaleïne alkalisch, terwijl de indolreactie met EHRLICH's reagens een sterk positieve was. In de kaliumnitraat-houdende cultuur werd nitriet, zoowel met joodkalium-stijfseloplossing, na aanzuren met azijnzuur, als met GRIESS-ROMEYN-reagens aangetoond. De glucoshoudende culturen gaven een positieve methylroodproef, wanneer er geen calciumcarbonaat in aanwezig was. In tegenwoordigheid van calciumcarbonaat reageerde cultuurvloeistof zoowel als haar destillaat, op methylrood zeer zwak zuur. De destillaten der andere glucose-houdende culturen waren eveneens zuur t.o.v. methylrood en gaven een zeer zwakke indolreactie met EHRLICH's reagens.

Zwavelwaterstof werd aangetoond met behulp van lood-acetaatpapier. Op de indolreactie's der destillaten der resp. culturen maakt de kaliumnitraatcultuur een uitzondering; in het destillaat dezer cultuur was geen indol aan te toonen, terwijl de phenolphtaleïne-proef eveneens negatief was. Er blijkt uit deze proeven wel, dat de zwavelwaterstofvorming toeneemt bij de resp. aanwezigheid der zouten, magnesiumsulfaat, kaliumsulfaat, kaliumjodide, mono-kaliumphosphaat, dinatriumphosphaat, indien geen glucose aanwezig is, verder geeft de phenolphtaleïne-proef onder de zoo even genoemde omstandigheid het resultaat, dat er steeds ammoniak in de destillaten wordt gevonden.

Kaliumnitraat remt door de nitrietvorming den groei zoodanig, dat er geen of hoogstens een spoortje indol door *Bact. splendidum* wordt gevormd. Niettegenstaande het feit, dat geen zwavelwaterstof werd aangetoond boven de kaliumnitraatcultuur, is het geenszins buitengesloten, dat deze stof het in oplossing zijnde kaliumnitraat tot nitriet reduceert.

Tevens valt uit de verkregen resultaten te concludeeren t.o.v. de geschiktheid voor het determineeren van micro-organismen, wat indolvorming uit peptonen in het algemeen betreft, dat dit pepton geschikt is, wanneer destillatie der culturen wordt toegepast. Ofschoon het reageeren op indol in de cultuurbuis minder omslachtig is, is het destilleeren der culturen onder alle omstandigheden het meest zeker.

B *Onderzoek van Pepton Poulenc.*

Vervolgens werd pepton POULENC onderzocht met behulp van *Bact. splendidum*. In dit geval werd dezelfde bodemreeks ingezet als bij pepton DIEST. Echter werden van iedere gebruikte oplossing twee kolven geënt met *Bact. splendidum* en na 6 dagen cultuurtijd bij 22—24° C. een cultuur zonder extra soda-oplossing gedestilleerd,

terwijl de andere met sodaoplossing alkalisch werd gemaakt, alvorens tot destillatie werd over gegaan. Als indicator werd phenolphtaleïne gebruikt. Bij het destilleeren der resp. culturen zonder extra sodatoevoeging werd in tegenstelling met die in oplossingen van pepton DIEST ook zwavelwaterstof gevormd in de kaliumnitraathoudende oplossing. Ook reageerden beide culturen positief met GRIESS-ROMEYN-reagens, zoodat hetgeen bij het gelijknamige milieu, met pepton DIEST bereid, verondersteld werd, n.l. reductie van het nitraat door zwavelwaterstof tot nitriet, op deze wijze werd bevestigd. Wat de reactie der destillaten betrof, waren hier de resultaten verder geheel gelijk aan die van pepton DIEST, n.l. alkalisch ten opzichte van methylrood en phenolphtaleïne en met positieve indolreactie, voorzoover deze afkomstig waren van glucosevrije culturen. Dit geldt zoowel voor destillaten van de culturen, welke direct zijn gedestilleerd als voor de destillaten van deze, die met soda alkalisch zijn gemaakt. Bij de glucosehoudende culturen gaven de resp. destillaten zonder extra toevoeging van soda alle een zeer zwakke indolreactie: de reactie op methylrood was zuur, wanneer er geen calciumcarbonaat aan de glucosehoudende voedingsvloeistof voor het enten van *Bact. splendidum* was toegevoegd. De reactie van dit laatste destillaat was alleen t.o.v. methylrood alkalisch. De phenolphtaleïne-proef was bij deze cultuurdestillaten negatief. Wat de methylroodproef op de drie glucosehoudende culturen betrof, reageerden deze zuur, wanneer er geen calciumcarbonaat was toegevoegd. In het laatste geval was er een overgangstint van dezen indicator waar te nemen. Afwijkende reactie's gaven de resp. destillaten der glucosehoudende culturen op phenolphtaleïne en methylrood, waarvan te voren de resp. culturen met soda alkalisch waren gemaakt t.o.v. phenolphtaleïne. De destillaten van de glucose- alsmede die van glucose-calciumcarbonaatcultuur waren alleen alkalisch op methylrood, terwijl de glucose-

cultuur met sec. natriumphosphaat een destillaat gaf, dat ook met phenolphthaleïne zwak reageerde. De indolreactie der drie destillaten van de zooeven genoemde culturen, al of niet gedestilleerd met soda, was eveneens zeer zwak, zoodat de verschillen, wat betreft de diverse reactie's, niet erg groot zijn. Het eenige verschil is een geringe phenolphthaleïne-reactie van het destillaat der natriumphosphaathoudende glucoseculturen.

Wat resultaten in het algemeen betreft, is er geen verschil tusschen de eigenschappen van pepton DIEST en pepton POULENC, als geschikte stof voor het vaststellen van indolvorming door microorganismen in het algemeen. Een belangrijk verschil evenwel is, dat de indolreactie van de blanco (steriele) peptonoplossing bij POULENC niet optreedt, noch in het destillaat hiervan, terwijl bovendien de groei in deze peptonoplossingen gemakkelijker en rijker is dan in die van pepton DIEST.

C *Onderzoek van Pepton Brunnengräber.*

Daar bij de vorige proeven is gebleken, dat de verschillen in intensiteit der indolreactie, uitgevoerd met het reagens van EHRLICH, niet groot waren, wanneer er extra zout in de diverse peptonoplossingen aanwezig is, zijn bij dit onderzoek, alsmede die van vischpepton en de peptonen WITTE en CHAPEAUTÔT, welke nog volgen, de volgende voedingsbodems gebruikt:

Peptonwater zonder extra zouttoevoeging	
„ met Magnesiumsulfaat	
„ „ mono-Kaliumphosfaat	
„ „ Kaliumnitraat	
„ „ Joodkalium	
Glucosepeptonwater zonder extra zouttoevoeging	
„ met 1% Calciumcarbonaat	
„ „ sec. Natriumphosfaat	

In glucosepeptonwater is het gehalte aan glucose 1%;

het gehalte van de toegevoegde zouten is 0.075%. Bij controle der stamoplossing van bovengenoemd pepton, bleek, dat er een zeer zwakke verkleuring met EHRLICH's reagens optrad, in het destillaat van deze oplossing echter niet. Het verkleuren was evenwel zóó gering, dat het practisch geen beteekenis had. Daar intusschen gebleken is, dat de beide stammen A en B van *Bact. splendidum* geen cultuurverschillen te zien gaven, is dit onderzoek, alsmede het volgende, alleen met *Bact. splendidum* A verricht. De cultuurtijd is tot 8 dagen verlengd, maar de kweektemperatuur hetzelfde gebleven. Reeds in het begin van de culturiëele onderzoekingen is gebleken, dat pepton BRUNNENGRÄBER op den duur voor *Bact. splendidum* minder geschikt is. Dat deze pepton een goedkooper surrogaat is van de echte pepton WITTE, blijkt wel uit het opschrift der etiketten, welke op de bussen zijn geplakt, waarop als soortnaam eveneens „witte” is vermeld. Deze pepton is echter niet uit de fabriek van WITTE afkomstig; om geen verwarring van namen te krijgen, is deze pepton onder den naam van den fabrikant in deze beschrijving opgenomen.

Tijdens den cultuurtijd geven de glucosehoudende culturen geen zwavelwaterstofontwikkeling; een zeer geringe spoor zwavelwaterstof wordt gevormd uit de peptonoplossing zonder zouttoevoeging, alsmede uit de magnesiumsulfaathoudende. Wanneer echter de culturen joodkalium-, mono-kaliumphosfaat- en kaliumnitraathoudend zijn, is er een goede zwavelwaterstofontwikkeling te zien. De destillaten der resp. culturen geven een alkalische reactie t.o.v. phenolphthaleïne en methyloord, terwijl de indolreactie's hiervan sterk positief zijn, wanneer de oorspronkelijke culturen niet glucose-houdend zijn. Verder reageert het verkregen destillaat van de glucosepeptonwatercultuur, waarin zich calciumcarbonaat bevindt, alkalisch op methyloord.

De overige glucosehoudende culturen, alsmede de hier-

uit verkregen destillaten, reageeren zuur op methylood. Deze geven, evenals die der overeenkomstige glucose-peptonwaterculturen gemaakt van resp. de peptonen DIEST en POULENC, een zeer zwakke indolreactie, zoodat ook bij het gebruik van pepton BRUNNENGRÄBER weer blijkt, dat ten aanzien van de indolvorming, deze door glucose geweldig wordt verminderd.

De kaliumnitraat-houdende cultuur reageert weer met GRIESS-ROMEYN-reagens, zoodat mede in verband met de sterke zwavelwaterstofontwikkeling, zooals dit bij pepton POULENC het geval is, de reductie van het nitraat tot nitriet door zwavelwaterstofvorming is te verklaren.

D. *Onderzoek van Pepton Witte.*

In tegenstelling met het vorige pepton is dit afkomstig van de fabrieken FRIEDRICH WITTE.

De onderzoekingen van bovengenoemd pepton zijn geheel gelijk aan die van het voorafgaande. Bij contrôle der steriele peptonoplossing was een zeer geringe kleuring van het EHRLICH's reagens waar te nemen; het destillaat dezer oplossing reageerde niet. Dezelfde voedingsbodems, echter nu met behulp van pepton WITTE gemaakt, werden voor onderzoek gebezigd. Voor het onderzoek werden 8 dagen oude culturen op de diverse bodems gebezigd, terwijl er op dezelfde wijze op de verschillende reactie-producten werd onderzocht. Tijdens het cultiveeren werd zwavelwaterstof aangetoond boven de culturen, welke joodkalium resp. mono-kaliumphosphaat, bevatten. Boven de andere culturen verkleurde het loodacetaat-papier niet, alleen boven die, welke kaliumnitraat bevatte, verkleurde het loodacetaatpapier iets.

Het eenige verschil, dat optreedt, is, dat bij gebruik van pepton BRUNNENGRÄBER in plaats van pepton WITTE er bij aanwezigheid van kaliumnitraat wel zwavelwaterstof optreedt. Verder zijn de verkregen resultaten met pepton

WITTE geheel gelijk aan die der reeds onderzochte peptonen onder gelijknamige omstandigheden.

De destillaten der glucosevrije culturen waren op phenolphthaleïne en methylrood alkalisch, gaven in tegenstelling met die der glucosehoudende culturen een zeer sterke indolreactie. Laatstgenoemde culturen en hunne resp. destillaten waren zuur t.o.v. methylrood bij afwezigheid van calciumcarbonaat.

De kaliumnitraatpeptoncultuur gaf met GRIESS-ROMEYN-reagens nitrietreactie. Alleen alkalisch op methylrood was het destillaat van de glucosepeptonwatercultuur in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat, echter niet phenolphthaleïne.

De zouten mono-kaliumphosfaat en kaliumnitraat hebben dus invloed op de zwavelwaterstofvorming, maar hun invloed op de indolvorming is evenals die der andere met name magnesiumsulfaat en kaliumnitraat gering, omdat de peptonwatercultuur van *Bact. splendidum* na 8 dagen een destillaat levert, welk een sterke indolreactie geeft.

E *Onderzoek van pepton Chapeautôt.*

Bovengenoemd pepton is evenals de pepton POULENC een Fransch product. De steriele oplossing hiervan reageerde zwak op EHRLICH's reagens, maar het destillaat ervan echter niet. Het onderzoek is geheel volgens het reeds bekende schema verricht. Het resultaat van het onderzoek is geheel aan die der vorige onderzoeken gelijk, aangezien alleen het pepton is veranderd, maar de overige stoffen als de oplosbare zouten, glucose en calciumcarbonaat in dezelfde concentratie zijn gebleven. Zwavelwaterstofvorming der peptonwatercultuur bleef uit, zonder extra zouttoevoeging; evenmin werd zwavelwaterstof gevormd in tegenwoordigheid van glucose. Ook de kaliumnitraathoudende cultuur gaf zwavelwaterstofvorming, als-

mede die resp. joodkalium, mono-kaliumphosphaat en magnesiumsulfaat bevatten.

De nitrietreactie met GRIESS-ROMEYN-reagens in de kaliumhoudende cultuur was positief. De destillaten der glucosevrije culturen, gaven alle een alkalische reactie op methylrood en phenolphtaleïne, alsmede een sterke indolreactie met EHRLICH's reagens. De indolreactie's der glucosehoudende culturen waren met uitzondering van het destillaat der glucose-calciumcarbonaat-cultuur negatief. De reactie van laatstgenoemd was op methylrood alkalisch, terwijl de indolreactie ervan zeer zwak, doch waarneembaar was. De reactie der andere glucosehoudende culturen was zuur op methylrood, alsmede hunne bijbehorende destillaten.

F *Onderzoek van Vischpepton.*

Genoemde pepton werd gemaakt van stokvisch. (Zie voor de bereiding hoofdstuk IV). De oplossing ervan gaf een lichtrose verkleuring met het reagens van EHRLICH, echter ternauwernood waarneembaar, terwijl het destillaat ervan in het geheel geen kleuring gaf. Tenslotte werd ook het vischpepton onder dezelfde reeds genoemde omstandigheden onderzocht. Tijdens den cultuurtijd werd door *Bact. splendidum* zwavelwaterstof gevormd uit alle glucosevrije oplossingen; echter kleurden de loodacetaat-papiertjes niet zoo sterk als bij de reeds onderzochte peptonen. Alleen maakte de kaliumnitraathoudende cultuur een uitzondering.

Uit deze laatste oplossing werd door genoemde bacterie geen zwavelwaterstof gevormd, evenals uit de glucosehoudende oplossingen. Deze gaven met uitzondering van de cultuur met calciumcarbonaat een zure reactie op methylrood, terwijl de indolreactie der overeenkomstige destillaten een zeer geringe was; deze waren alle drie zuur op methylrood, echter dat van de calciumcarbonaat-glucose-

cultuur vergeleken met de andere twee zeer weinig. De overige destillaten zijn op methylrood en phenolphaleïne-alkalisch en geven alle positieve indolproef, doch de kleuring van het reagens is een veel geringere. Dit is een bevestiging van hetgeen in hoofdstuk XI van vischpepton is gevonden. Ook de nitrietreactie van de kaliumnitraathoudende cultuur met GRIESS-ROMEYN-reagens treedt eveneens op.

Wanneer de verkregen resultaten uit het zooeven beschreven onderzoek met elkander worden vergeleken, dan blijkt het volgende:

Alle onderzochte peptonen geven bij het cultiveeren van *Bact. splendidum* in hun resp. oplossingen ten allentijde indol, wanneer geen glucose in oplossing is. Glucose vermindert het indolvormend vermogen van *Bact. splendidum*, ook zelfs, wanneer inplaats van pepton, tryptophaan wordt gegeven.

Vischpepton is het minst tryptophaanhoudend, terwijl de peptonen POULENC, CHAPEAUTÔT, WITTE, BRUNNENGRÄBER en DIEST, veel meer tryptophaan bevatten, te oordeelen naar de reactie met EHRLICH's indolreagens na het cultiveeren van *Bact. splendidum* in hunne resp. oplossingen, of de hieruit verkregen destillaten.

Toevoeging van zouten heeft oogenschijnlijk weinig invloed op de indolvorming.

Kaliumnitraat wordt in elke peptonoplossing door *Bact. splendidum* tot nitriet gereduceerd, omdat genoemd microorganisme uit al der onderzochte peptonen zwavelwaterstof kan vormen en deze stof reduceerend op kaliumnitraat werkt.

Nitraathoudende culturen geven bij alle peptonen met zoutzuur aangezuurd tengevolge der nitrietvorming roodkleuring (nitroso-indolreactie), er heeft met EHRLICH's reagens slechts een geringe kleurverandering plaats. De

destillaten dezer culturen reageeren vlot met EHRLICH's reagens. Tevens is in alle destillaten van kaliumnitraathoudende culturen met GRIESS-ROMEYN-reagens gereageerd. waarbij zij het ook soms zwak, een spoortje nitriet is aangetoond. Dit moet de oorzaak zijn, dat bij aanzuren met zoutzuur na even staan roodkleurig optreedt, omdat ook indol in het destillaat aanwezig is; bij het opschenken van EHRLICH's reagens wordt deze roodkleuring versterkt. Daar het gehalte aan in oplossing aanwezig nitriet te groot is, treedt er om die reden hierin geen kleuring met EHRLICH's reagens op. *Hetzelfde* wordt gevonden, wanneer men EHRLICH's reagens indol heeft aangetoond en daarna kaliumnitriet in de roode oplossing brengt; de kleur vermindert direct en verdwijnt soms geheel. Dit verschijnsel is bekend uit het onderzoek van DE WOLFF (Litt. Diss. DE WOLFF, Utrecht 1927, pag. 119—150).

De destillaten, uit glucosevrije culturen verkregen, zijn zonder uitzondering alkalisch, die der (glucosehoudende) alleen alkalisch op methylrood, wanneer calciumcarbonaat als zuurbindend middel is toegevoegd, een enkele maal slechts zwak zuur. Die der andere, (glucosehoudende) culturen waren zonder uitzondering zuur op methylrood. Laatstgenoemde culturen waren ook in tegenwoordigheid van natriumphosphaat zuur op methylrood.

De glucosevrije culturen waren alle alkalisch op methylrood, echter niet op phenolphtaleïne.

De onderzochte peptonen, DIEST, POULENC, BRUNNENGRÄBER, WITTE, CHAPEAUTÔT, alsmede vischpepton zijn uitstekend bruikbaar voor het vaststellen der indolvorming van microorganismen, indien deze in de resp. oplossingen dezer peptonen willen groeien. Alleen kan niet genoeg de nadruk gevestigd worden op de contrôle, wanneer er tot gebruik van een bepaald handelspepton wordt overgegaan of van een bekend pepton nieuwe voorraad in gebruik wordt genomen.

Het verdient evenwel aanbeveling, zoo mogelijk, destillatie der culturen toe te passen, aangezien deze methode het meest zekere resultaten t.o.v. eventueele indolvorming heeft. (Litt. BAUDET, Indolreaktionen bei Proteusbacillen, Folia-Microb. II—3 (1914) 1—9.

FRIEBER geeft als resultaat zijner onderzoekingen op, dat EHRLICH's reagens voor indol en enkele methylderivaten van indol specifiek is.

PORCHER geeft omtrent de bruikbaarheid van genoemd reagens op, dat bij diens onderzoekingen zich enkele gevallen hebben voorgedaan, dat ook tryptophaan-houdende eiwitachtige stoffen op zich zelf reeds met EHRLICH's reagens kleuring geven. In verband hiermede geeft hij de voorkeur eraan om het eventueel gevormde indol aan een bacteriëncultuur te onttrekken door deze uit te schudden met aether, daarna onder toevoeging van enkele druppels alcohol 96% te centrifugeeren, om tenslotte in de aetherische oplossing op indol te reageeren. Als tweede methode beveelt hij stoomdestillatie of directe destillatie der bacteriënculturen aan.

Volgens FRIEBER is de reactie van SALKOWSKY met behulp van natriumnitriet en 50% zwavelzuur voor indol niet specifiek, maar geeft met bepaalde indolderivaten eveneens een reactie.

Er volgt uit de proeven van FRIEBER en PORCHER, dat slechts met zekerheid indolvorming kan worden vastgesteld, indien de indolreactie in de destillaten der cultuurvloeistoffen wordt uitgevoerd.

Toch blijft het ook in dit geval noodzakelijk, het destillaat of het aetherisch extract van den sterielen voedingsbodem vooraf op de aanwezigheid van indol te onderzoeken.

Conclusie's:

Naar aanleiding der proeven, welke gedaan zijn om met zekerheid vast te stellen, of er uit bepaalde peptonen indol door *Bact. splendidum* wordt gevormd, is gebleken, dat deze bacterie na een cultuurtijd van 8 dagen bij 22—24° C. in de oplossingen der onderzochte peptonen indol en ammoniak heeft gevormd.

Glucose vermindert het indolvormend vermogen van *Bact. splendidum* zoodanig, dat slechts een geringe indolreactie in de destillaten der glucosehoudende culturen valt waar te nemen.

Zoowel de proeven van FRIEBER en PORCHER, als eigen waarnemingen geven tot resultaat, dat de indolvorming van microörganismen het beste kan worden vastgesteld, indien met EHRLICH's reagens in de cultuurdestillaten wordt gereageerd.

De toegevoegde zouten hebben met uitzondering van kaliumnitraat in bepaalde gevallen, kwalitatief geen invloed op de indolvorming.

LITTERATUUR.

- H. H. DE WOLFF, Diss. Utrecht 1927 pag. 119—150.
 BAUDET, Indolreaktionen bei Proteusbacillen, *Folia Microbiologica* II—3 (1914) pag. 1—9.
 FRIEBER, Zentralblatt f. Bakt. Abt. I (Orig.) 87 (1922) pag. 254—277.
 EHRLICH, D. Med. Wochenschrift 1901.
 GORTER en DE GRAAFF, C. R. d. l. Soc. de Biol. 64 (1908) pag. 402.
 PORCHER en PASSINET, idem 66 (1909) pag. 624—626.
 PORCHER en PASSINET, C. R. de L'Ac. des Sc. (Paris) 148 (1909) 1336—1338.
-

HOOFDSTUK XIV.

Indolvorming in de oplossingen van getrypsiniseerde peptonen.

Bovengenoemd onderzoek werd verricht met de volgende peptonen: CHAPEAUTÔT, POULENC, BRUNNENGRÄBER, WITTE en vischpepton. Van de peptonen werd een 1%-ige oplossing, welke gefiltreerd is na voorverhitting, hetgeen voor de bereiding van peptonwater in het algemeen gebruikelijk is volgens het voorschrift van GERSBACH met trypsine behandeld. Nadere bijzonderheden hieromtrent worden in het hoofdstuk voedingsbodems beschreven. De verkregen oplossing wordt na het brengen op een gehalte van 3% chloornatrium en steriliseeren als voedingsbodem gebruikt. Ook in dit geval is de invloed van glucose op de indolvorming van *Bact. splendidum* nagegaan volgens dezelfde methode, welke bij het onderzoek van handelspeptonen is gebruikt.

Nadat een indolvorming in de oplossingen, verkregen uit pepton BRUNNENGRÄBER en vischpepton was gevonden (zie hoofdstuk IX en XII), werd vanwege het feit, dat de reactie beter in het cultuurdestillaat als in de cultuur zelf kon worden uitgevoerd (zie hoofdstuk XIII), ook dit onderzoek geheel volgens hetzelfde schema gedaan. Wat de resultaten van het onderzoek van de oplossingen der getrypsiniseerde peptonen in het algemeen betreft, zijn deze geheel gelijk aan die der oorspronkelijke peptonen.

Nadat de verkregen steriele oplossingen gecontrôleerd waren met EHRLICH's reagens, bleek, dat alle een spoor indol bevatten, met uitzondering van die van het vischpepton. De resp. destillaten ervan gaven practisch geen kleuring met genoemd reagens.

De oplossingen zijn alle geënt met *Bact. splendidum* A en na 8 dagen cultuurtijd bij 22—24° C. gestedilleerd. De glucosevrije culturen gaven geen zwavel-

waterstofontwikkeling bij de oplossingen van vischpepton, pepton WITTE en pepton BRUNNENGRÄBER, wel echter bij die der peptonen POULENC en CHAPEAUTÔT. De destillaten dezer culturen reageerden op methylrood en phenolphthaleïne alkalisch en gaven een sterk positieve indolreactie.

Bij de glucosehoudende culturen werd geen zwavelwaterstof ontwikkeld; zoowel culturen als hunne resp. destillaten gaven een zure reactie op methylrood, terwijl slechts een spoor indol hierin kon worden aangetoond.

Uit bovenstaande gegevens kan dus worden geconcludeerd, dat men ook deze vooraf getrypsiniseerde peptonoplossingen eerst dient te contrôleren alvorens deze oplossingen voor bacteriële doeleinden te bezigen. Verder, dat het voor het cultiveeren van *Bact. splendidum* niet uitmaakt, of deze in de al of niet getrypsineerde oplossingen van peptonen wordt gecultiveerd. Ook blijkt bij dit onderzoek weer, dat men van het destillaat der bacteriënculturen een veel betrouwbaarder resultaat krijgt, wanneer men hierin op indol reageert.

LITTERATUUR.

GERSBACH, Centralblatt f. Bakteriologie Abt. I Orig., Band 88 pag. 145—151.

HOOFDSTUK XV.

Dier- en Agglutinatieproeven met lichtbacteriën.

Inleiding:

Het is een bekend verschijnsel, dat vreemd eiwit, evenals gedoode of levende microörganismen, bij proefdieren ingespoten, in het bloed dezer dieren antistoffen doen ontstaan, welke met het ingespoten antigeen reactie geven. In vitro uitgevoerd, geven antigenen met verdunningen van hun antiserum of verdunningen van het antigeen met onverdund antiserum o.a. aanleiding tot agglutinatie, resp. precipitatie. Als contrôle bij deze proeven dienen blanco te worden onderzocht het normaalserum van het proefdier afkomstig, voordat het is ingespoten, alsmede de physiologische chloornatriumoplossing, welke als verdunningsvloeistof wordt gebruikt, evenals een mengsel van physiol. NaCl-oplossing en normaalserum; geen van alle mogen aanleiding geven tot vlokvorming. Bij omschudden moet het antigeen, wanneer het microörganismen zijn, weer gemakkelijk homogeen suspendeeren.

Daar er tot nog toe in de bacteriologie de meening heerscht, dat saprophyten bij proefdieren ingespoten, niet tot het vormen van agglutinen aanleiding geven, is de nieuwere litteratuur geraadpleegd, waarbij bleek, dat ook saprophytische lichtbacteriën, bij proefdieren ingespoten, aanleiding tot de vorming van specifieke agglutinen gaven.

Dit betrof een onderzoek van *Sepia*-lichtbacteriën, welke bij konijnen ingespoten, de vorming van agglutinenen te voorschijn riepen.

(Litt. GERTRUD MEISZNER, Centralblatt f. Bact., Abt. II, Band 67, (1926), pag. 210—221.

In de oudere litteratuur komt nog een dergelijk onderzoek van lichtvibrionen voor, waarin hetzelfde wordt gevonden (Litt. BALLNER, Centralblatt f. Bakt. Abt. II 19—1907, pag. 572—576). Deze proeven zijn gedaan met lichtbacteriën, als *Vibrio DUNBARI*, welke pathogene eigenschappen heeten te bezitten.

In verband met de gevonden morphologische en biochemische eigenschappen van *Bact. phosphoreum* A, B en C, welke geheel identiek waren, echter van *Bact. splendidum* A en B verschilden, zijn deze proeven gedaan, om te weten te komen, of de onderzochte stammen bij inspuiten van konijnen pathogeen waren, en voor het geval, dit niet zoo was, of toch zich in het bloed dezer dieren specifieke agglutinenen hadden gevormd.

Beschrijving der proeven.

Ten einde na te kunnen gaan, of *Bact. phosphoreum* A, B en C, alsmede *Bact. splendidum* A voor konijnen pathogeen waren, werden eerst geringe hoeveelheden intraveneus bij deze dieren ingespoten en daarna waargenomen, of zich eenigerlei afwijking vertoonde. Het bleek echter van niet, zoodat deze geringe hoeveelheid der resp. bacteriën geen invloed had. Bij deze proeven werd $\frac{1}{2}$ cm³ van een zeer licht troebele emulsie dezer bacteriën geïnjecteerd, welke gemaakt was door een 36—48 uur oude cultuur der resp. onderzochte lichtbacteriën met physiologische keukenzoutoplossing af te schudden en daarna met dezelfde oplossing op de juiste troebelingsgraad te brengen.

Na 2 dagen werd van een emulsie van dezelfde troebelingsgraad 1 cm^3 en tenslotte van dezelfde emulsie $1\frac{1}{2} \text{ cm}^3$ ingespoten, 4 dagen na de eerste injectie. Deze proef gaf een negatief resultaat.

Na herhaling van de injectie met sterkere bacteriën-emulsie's werd 5 dagen hierna tot het aftappen van bloed der resp. proefdieren overgegaan, nadat deze 12 uren hadden gevast.

Nadat het afgetapte bloed in de ijskast weggezet was, bleek dat het laatste meer en gemakkelijker serum leverde dan dat, hetwelk van de dieren was afgetapt, zonder dat deze hadden gevast.

Eerst werden de zoo verkregen bloedsera onderzocht, met de gelijknamige bacteriën, waarmede de dieren waren geïnjecteerd.

Bij het agglutineeren bleek, dat dit beter geschiedde bij 37°C. , dan bij kamertemperatuur. De beschreven proeven werden eerst met *Bact. phosphoreum* A, B en C gedaan.

De gemaakte serumverduunningen waren de volgende:
 $1:5$, $1:10$, $1:20$, $1:40$, $1:80$, $1:100$, $1:160$, $1:200$,
 $1:400$, $1:800$, $1:1600$, $1:3200$.

Deze werden op de dubbele concentratie gemaakt en daarna met een gelijke hoeveelheid bacteriën-emulsie verdund. Als antigeen dienden met physiologische keukenzout afgeschudde 36—48 uur oude agar-culturen der resp. phosphoreumstammen, welke zoo troebel waren, dat een inktlijn op wit papier net nog te zien was, wanneer deze bekeken werd, door een reageerbuis, welke de emulsie bevatte.

Vooraf waren de emulsie's van *Bact. phosphoreum* A, B en C gefiltreerd.

Als contrôle dienden normaalserum $1:2$ en $1:100$, alsmede physiologische keukenzoutoplossing en een serumverduunning $1:40$.

Bij deze proeven met *Bact. phosphoreum* A,

B en C bleek, dat *Bact. phosphoreum* A, tot een verdunning van 1 : 400 agglutineerde met eigen serum. *Bact. phosphoreum* B en C agglutineerden bij verdunningen resp. 1 : 1600, resp. 1 : 3200.

De buisjes, waarin een positieve agglutinatie was waar te nemen, bleven echter toch zwak troebel, ofschoon duidelijke sluiervorming zichtbaar was.

Bij omschudden was deze laatste niet meer tot emulsie te brengen; in de contrôlebuizen met normaalserum 1 : 2 en 1 : 100, alsmede die met physiologische keukenzoutoplossing waren de resp. antigenen zonder meer uitgezakt en bij omschudden weer gemakkelijk homogeen te suspendeeren.

De serumverdunning met physiologische keukenzoutoplossing bleef geheel helder.

Het antigeen, hetwelk van *Bact. splendidum* gemaakt was, gaf in het geheel geen agglutinatieveerschijsel, te zien in de serumverdunningen, gemaakt van de resp. *Bact. phosphoreum-sera*. Laatstgenoemd antigeen gaf evenmin vlokvorming in normaalserumverdunningen en het zich eveneens bij omschudden homogeen suspendeeren in physiologische keukenzoutoplossing, als in normaalserum en phosphoreum-serumverdunningen.

Vervolgens werden proeven gedaan met het antiserum van *Bact. splendidum* A, hetwelk op dezelfde wijze was verkregen, door een konijn met deze bacteriën intraveneus in te spuiten, zooals dit het geval was bij *Bact. phosphoreum* A, B en C.

De gebruikte verdunningen waren 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600 van het antiserum, als contrôle waren physiologische keukenzoutoplossingen, antiserumverdunning 1 : 50 zonder antigeen en normaalserum 1 : 50 met antigeen, evenals de keukenzoutoplossing.

Het maken der verdunningen werd geheel op dezelfde wijze gedaan als bij dezelfde proeven met *Bact. phosphoreum* A, B, en C. Als antigeen fungeerde hier een

24 uur oude agarcultuur van *Bact. splendidum* A, terwijl er eveneens proeven gedaan werden met een antigeen van *Bact. splendidum* B. Beide werden daartoe op de bij *Bact. phosphoreum* A enz. genoemde wijze gesuspenderd en daarna gefiltreerd.

Beide antigenen, werden tot 1 : 1600 geagglutineerd; er trad hier in tegenstelling met de agglutinaties van *Bact. phosphoreum* A, B en C, na 5 uur sterke vlok-vorming, en na 20 uur volledige clarificatie op, wanneer bij 37° C. werd geagglutineerd.

Bij de controleproeven was het antigeen weer homogeen te suspenderen bij omschudden, terwijl de serumver-dunning met physiol. keukenzout opl. geheel helder bleef.

De phosphoreumstammen op gelijke wijze onderzocht, gaven een negatieve uitkomst.

Uit deze proeven blijkt dus, dat serologisch een bevestiging is gevonden, dat *Bact. splendidum* A en B geenerlei verwantschap hebben, met *Bact. phosphoreum*.

Tenslotte zijn nog proeven gedaan met *Bact. phosphoreum* A en de sera van B en C, met *Bact. phosphoreum* B en de sera van A en C, en met *Bact. phosphoreum* C en de sera van A en B.

Als verdunningen der resp. sera werd de reeks 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200 genomen met als controle normaalserum 1 : 100 en physiologische keukenzoutoplossing. Ook hier werd bij 37 °C. geagglutineerd en daarbij de volgende resultaten verkregen:

Bact. phosphoreum A agglutineert met serum B tot een verdunning van 1 : 400; met serum C is bij 1 : 100 een zeer geringe agglutinaties te zien, echter zeer dubieus.

Bact. phosphoreum B agglutineert met serum A tot een verdunning van 1 : 400 positief en bij hogere verdunning is er aanwijzing van geringe vlok-vorming. Met serum C treedt in geen der verdunningen agglutinaties op.

Bact. phosphoreum C agglutineert met serum A zeer dubieus in een verdunning 1 : 100, terwijl er in de verdere verdunningen, alsmede in die van B-serum geen agglutinatatie is waar te nemen.

Uit deze laatste proeven blijkt, dat *Bact. phosphoreum* A verwant is met *Bact. phosphoreum* B. De verwantschap van *Bact. phosphoreum* A en B met *Bact. phosphoreum* C is, voor zoover deze aanwezig is, een zeer geringe.

Ook bij deze proeven treedt weer geen volledige clarificatie op, zooals dit het geval is bij de serumverdunningen met het daarbij behoorend antigeen.

Als reden, waarom bij de agglutinatieproeven met *Bact. phosphoreum* A, B en C geen volledige clarificatie is opgetreden, moet als waarschijnlijke oorzaak hiervan de groote hoeveelheid gebruikt antigeen worden opgegeven.

De agglutinatatie bij *Bact. phosphoreum* A, B en C is fijnvlokkig, bij *Bact. splendidum* A en B grofvlokkig.

LITTERATUUR.

GERTRUD MEISNER, Untersuchungen über die Symbiontischen Leuchtbakterien, Centralblatt f. Bakt. Abt. II Band 67 (1926) pag. 210—220.

F. BALLNER, Ueber das Verhalten von Leuchtbakterien bei der Einwirkung von Agglutinationserum und anaesthisierenden chemischen Agentien, Centralblatt f. Bakt. Abt. II Band 19 (1907) pag. 572—573.

HOOFDSTUK XVI.

Conclusie en samenvatting.

In het beschreven onderzoek is aangetoond, dat *Bact. phosphoreum* A, B en C geheel dezelfde culturiëele en morphologische eigenschappen hebben, echter wijst het gedrag van deze bacteriën t.o.v. antisera, dat er een groote verwantschap is tusschen de stammen A en B, maar deze

een geringere verwantschap met *Bact. phosphoreum C* hebben.

Glucose, mannose, galactose, fructose en maltose, werden door genoemde bacteriën onder zuur en gasvorming vergist, de organische stikstofbron (peptonen, gistwater en vischbouillon) heeft hierop geen invloed. Ook de invloed van zouten op de gisting is voorzoover, aanwezig, gering.

Bij de sulfietgisting van glucose worden door *Bact. phosphoreum A, B* en *C* rijkelijk aceetaldehyde gevormd, hetgeen bij pyrodruivenzuur niet het geval is.

Wanneer deze stof onder invloed van sulfiet wordt omgezet, is er een geringe spoor aceetaldehyde aantoonbaar, hetgeen erop wijst, dat *Bact. phosphoreum A, B* en *C* deze stof op een andere wijze als glucose ontleden.

Amylum, dextrine, saccharose, lactose, manniet, sorbiet, dulciet, arabinose, arabiet, sylose, glycerinaldehyde en glycerine worden door deze bacteriën niet ontleed.

In peptonwater, getrypsineerd peptonwater en tryptophaanvischextractoplossing gecultiveerd, geven geen der stammen indolvorming, met uitzondering van *Bact. phosphoreum B*, die na 14 dagen een zeer geringe indolreactie geeft.

Deze bacteriën bezitten dus geen peptolytisch, diastatisch, of inverteerend ferment. Deze laatste twee eigenschappen zijn geheel in overeenstemming met de kenmerken, welke BUCHANAN voor lichtbacteriën opgeeft.

De invloed van zouten, als oplosbare phosphaten, op de gisting is kwalitatief, voor zoover nagegaan, zeer gering. Deze en de zouten magnesiumsulfaat en joodkalium zijn voor deze bacteriën, alleen dan groeibevorderend, indien de gebruikte voedingsbodem voor deze geschikt is gebleken.

Uit het onderzoek van *Bact. splendidum A* en *B* blijkt, dat deze geheel identiek zijn, zoowel culturiëel als morphologisch en serologisch.

Deze bacteriën hebben culturiëel geheel andere eigen-

schappen dan *Bact. phosphoreum* A, B en C. Voorzover zij gistende eigenschappen hebben, vormen zij uit amyllum solubile, dextrine, maltose, glucose, mannose galactose, fructose, manniet, glycerine en pyrodruivenzuur (Na als NH_4 zout) uitsluitend zuur.

Uit de diverse peptonen (DIEST, POULENC, WITTE, CHAPEAUTÔT, BRUNNENGRÄBER en vischpepton, alsmede uit caseïne (getrypsiniseerd), wordt door *Bact. splendidum* A en B indol gevormd, hetgeen eveneens het geval is met tryptophaan.

De indolvorming wordt in hooge mate door de aanwezigheid van glucose verminderd, in geringere mate bij tryptophaan.

Uit kaliumnitraat, wordt in tegenwoordigheid van peptonen nitriet gevormd. Het meerendeel der peptonen levert zwavelwaterstof bij het cultiveeren van *Bact. splendidum* A en B in de diverse oplossingen, terwijl bij afwezigheid van glucose uit de zooeven genoemde culturen, altijd een op phenolphthaleïne alkalisch destillaat wordt verkregen (ammoniak).

De invloed van zouten op indolvorming en gisting is kwalitatief zeer gering. Echter werken bij deze bacteriën behalve natrium-, kalium- en ammoniumphosphaat de zouten magnesiumsulfaat en joodkalium, alsmede kaliumsulfaat groeibevorderend.

Kaliumnitraat werkt door nitrietvorming remmend, evenals de natriumsulfiet.

Bovendien is de gisting niet afhankelijk van het gistingsmilieu, alleen gistwater is, wegens zuurvorming, voor *Bact. splendidum* A en B geheel ongeschikt.

Bij het onderzoek van eiwitachtige stoffen met behulp van *Bact. splendidum* is gebleken, dat alle gebruikte peptonen geschikt voor indolvorming zijn. Het meest betrouwbare resultaat wordt verkregen door de culturen te destilleeren.

Bij deze proeven is het zeer gewenscht zorgvuldige contrôle toe te passen. Ook bij het bestudeeren van bacteriële gisting is contrôle van den blancobodem met behulp van dezelfde bacteriën gewenscht.

Bact. splendidum A en B vormen bij sulfietgisting uit manniet, glucose en amyllum sol. aceetaldehyde; uit pyrodruivenzuur vormen zij onder dezelfde omstandigheden evenals *Bact. phosphoreum* A, B en C ten hoogste een spoor aceetaldehyde.

Bact. phosphoreum A, B en C hebben de volgende eigenschappen met *Bact. splendidum* A en B gemeen:

Morphologisch: beiden zijn Gram-negatief en niet sporenvormend.

Cultuurêel: Vergisten pyrodruivenzuur (natrium- of ammoniumzout) uitsluitend onder zuurvorming en vormen in tegenwoordigheid van calciumsulfiet slechts een geringe spoor aceetaldehyde.

Natriumsulfiet werkt voor beiden groeibelemmend.

Inuline wordt door beiden niet aangetast.

Glucose wordt door beiden onder aceetaldehydevorming vergist, in tegenwoordigheid van calciumsulfiet. Het gedrag t.o.v. konijnen is gelijk. Beiden zijn voor deze dieren niet pathogeen en geven bij deze dieren onder geschikte omstandigheden o. a. aanleiding tot het ontstaan van agglutinen.

Niet ontleed worden, arabiet, arabinose, xylose, sorbiet, lactose en saccharose, dulciet.

Zij verschillen in de volgende eigenschappen:

<i>Bact. phosphoreum</i> A, B en C.	<i>Bact. splendidum</i> A en B
Niet beweeglijke, korte staafjes, aan beide uiteinden afgerond.	beweeglijke, lange, gekromde staafjes.
Vormen uit peptonen hoogstens een geringe spoor indol en vervloeien geen gelatine. Uit tryptophaan wordt practisch geen indol gevormd na 8 dagen.	Vormen uit peptonen enz. indol, vervloeien gelatine aan de lucht na ongeveer 4 dagen. (Schaalvormige vervloeiing. Uit tryptophaan wordt na 36 uur indol gevormd.
Vormen uit peptonen enz. geen zwavelwaterstof.	Vormen uit peptonen zwavelwaterstof (zie hoofdstuk peptononderzoek).
Vergisten onder zuur en gasvorming:	Vergisten onder zuurvorming:

Glucose, mannose, galactose, fructose en maltose.

Vergisten niet:

Glycerine, manniet, dextrine en amyllum sol.

Vormen op bouillon geen oppervlaktehuidje. Bouillon- en peptonwaterculturen zijn zeer zwak troebel met weinig neerslag.

Het beslag op vischbouillonagar en gelatine is dun en niet slijmig.

In neutraalrood-glucosevischbouillon fluorescentie en gasvorming.

Geven een dun beslag op peptonaardappel en zijn hierop zwak lichtend.

Groeien langzaam.

Agglutineeren fijnvlokkig.

ronde gaafrandige blauwe koloniën op lakmoes-pepton-manniet-agar (plaatcult.).

Glucose, mannose, galactose, fructose en maltose.

vergisten onder zuurvorming:

glycerine, manniet, dextrine en amyllum sol.

Oppervlaktehuidje op bouillon- en peptonculturen, het laatste vooral bij tegenwoordigheid van phosphaten, magnesiumsulfaat of kaliumjodide.

Dik slijmig neerslag in bouillonculturen. Slijmig beslag op vischagar, geen gasv. of fluorescentie in neutraalrood-glucosevischbouillon.

Dik slijmig beslag op pepton aardappel en sterk lichtend.

Groeien zeer snel.

Agglutineeren grofvlokkig.

zich uitbreidende roode kol. op lakmoes-pepton-mannietagar (plaatcult.).

Uit deze onderzoeken is, ten aanzien van *Bact. splendidum* A en B, gebleken, dat zij in tegenstelling van *Bact. phosphoreum* A, B en C een diastatisch en peptolytisch ferment bezitten, aangezien, amyllum soluble wordt vergist en pepton onder indolvorming wordt ontleed en bovendien gelatine vervloeit.

Voor al het vermogen tot het ontleden van zetmeel is iets merkwaardigs, aangezien door de sulfietgistingssproeven het bewijs is geleverd, dat hier aceetaldehyde wordt, gevormd. Glycerine wordt, evenals pyrodruivenzuur in tegenwoordigheid van sulfiet op andere wijze ontleed, aangezien hier evenals dit het geval was bij pyrodruivenzuur, slechts een spoor aceetaldehyde wordt gevormd.

Het vermogen van *Bact. splendidum* A en B, om amyllum te ontleden, is niet in overeenstemming met de opgaven van BUCHANAN, welke opgeeft, dat de licht-

bacteriën geen diastatisch ferment zouden afzonderen. Dit blijkt bij *Bact. phosphoreum* A, B en C het geval te zijn, maar bij *Bact. splendidum* moet een dergelijk ferment aanwezig zijn, anders is de mogelijkheid tot zuur resp. aceetaldehyde-vorming geheel buitengesloten.

Ten slotte blijkt proefondervindelijk, dat saprophytische lichtbacteriën bij konijnen ingespoten, de vorming van agglutinen bewerken.

INHOUD

ALGEMEEN OVERZICHT.

Hoofdstuk:	Bldz.
I. Inleiding	7
II. Litteratuuroverzicht	9
III. Eigen proeven met lichtbacteriën	19
IV. Gebruikte Voedingsbodems voor het onderzoek der Lichtbacteriën	23

PROEVEN MET BACTERIUM PHOSPOREUM

Hoofdstuk:	
V. Vaststellen van de morphologische en culturiëele kenmerken van Bact. phosphoreum A, B en C.	33
VI. Vaststellen van den invloed van de organische stikstofbron op de gisting, alsmede den invloed van enkele zouten. Identificatieproeven van de lichtbacterie van lichtend vleesch afkomstig	38
VII. Het gedrag van Bact. phosphoreum A, B en C ten opzichte van polyosen, eiwitachtige stoffen en tryptophaan. Invloed van joodkalium en sec. ammonium- phosphaat op de gasvorming in neutraalrood- glucose-peptonwater. Vergelijking van neutraalrood-glucose-visch- bouillon met neutraalrood-glucose-gistwater .	47
VIII. Sulfietgistingsproeven met Bact. phosphoreum A, B en C	54

PROEVEN MET BACTERIUM SPLENDIDUM.

Hoofdstuk:	Bldz.
IX. Vaststellen van de morphologische en culturiëele eigenschappen	59
X. Invloed van de organische stikstofbron op de gisting van Bact. splendidum A en B, alsmede den invloed van enkele zouten hierop	62
XI. Sulfietgistingsproeven met Bact. splendidum .	66
XII. Het gedrag van Bact. splendidum A en B, ten opzichte van eiwitachtige stoffen. Vaststellen van den invloed van suiker en zouten op de indolvorming	70
XIII. Onderzoek van handelspeptonen en vischpepton met behulp van Bact. splendidum . .	79
XIV. Indolvorming in de oplossingen van getrypsiniseerde peptonen	95
Hoofdstuk:	
XV. DIER- EN AGGLUTINATIEPROEVEN MET LICHT-BACTERIËN	97
XVI. CONCLUSIE EN SAMENVATTING	103

ERRATUM.

Pag. 31, 14e regel v.o.

staat: naar de hoofdstukken VII en XI

moet zijn: „ „ „ VII en XII.

STELLINGEN.

I.

De kans, dat *Bact. phosphoreum* COHN bijdraagt tot het bederf van vleesch en zeevisch, is zeer gering.

II.

Het is noodzakelijk, dat het ijken van verbrandingscalorimeters met meerdere standaardstoffen geschiedt.

III.

Het alkyleeren van acetylazynester en diens derivaten geschiedt het beste in benzolische oplossing.

Litt.: Wislicenus Ann. 186 (1877) 183—193

CONRAD & LIMPACH Ann. 192 (1878) 153.

IV.

De veranderingen, welke in dyphterievaccin optreden na bevroering en afkoeling gedurende langeren tijd, wanneer dit vaccin met 0.4% phenol is geconserveerd, zijn als looïingsverschijnsels op te vatten.

Litt.: H. G. BUNGENBERG DE JONG, Contributions to the Theory of vegetable Tanning. Rec. d. Tr. Ch. des Pays-Bas 48—5.

H. ALDERSHOFF, Het gevaar van bevroren T-A-mengsels.

N. Tijdschr. voor Geneesk. 72 (1928) 31.

V.

De zuurgraad van melk is geen waarborg, dat deze in deugdelijken toestand verkeert.

Melkbesluit, art. 2 d.

VI.

De eischen, welke de pharmacopee Ed. V aan benzol stelt, geven geen garantie van voldoende zuiverheid.

VII.

De universitaire opleiding voor chemicus dient verkort te worden: tevens dient deze meer op de practijk te worden ingesteld.

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY
ASTOR LENOX TILDEN FOUNDATION

111
The New York Public Library
Astor Lenox Tilden Foundation
111



