



De vergisting van aethaandiol-(1.2) door de bacteriën der colityphus-dysenterie-groep

<https://hdl.handle.net/1874/321185>

Ague. 192, 1935.

DE VERGISTING VAN
AETHAANDIOL-(1.2)
DOOR DE BACTERIËN DER
COLI-TYPHUS-DYSENTERIE-GROEP

H. J. GROENEWEGEN

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

De vergisting van Aethaandiol-(1.2) door de
Bacteriën der Coli-Typhus-Dysenterie-groep.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

Diss. Utrecht 1935

De vergisting van Aethaandiol-(1.2)
door de Bacteriën der Coli-Typhus-
Dysenterie-groep

Proefschrift ter verkrijging van den graad van Doctor in de Wis- en Natuurkunde aan de Rijks-Universiteit te Utrecht, op gezag van den Rector-Magnificus Dr. H. Bolkestein, Hoogleraar in de Faculteit der Letteren en Wijsbegeerte, volgens besluit van den Senaat der Universiteit tegen de bedenkingen van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde te verdedigen op Maandag 8 Juli 1935, des namiddags te 3 uur, door HERMAN JAN GROENEWEGEN, geboren te Amsterdam.

N.V. UITGEVERS-MAATSCH. W. GOSLER & CO. — HILVERSUM
KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT — 1935

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN DE NAGEDACHTENIS MIJNER OUDERS.
AAN MIJNE TOEWIJDINGSVOLLE VROUW
EN LIEVEN JONGEN.

U, mijne Ouders, ben ik zeer dankbaar, dat Gij mij in staat steldet in de chemie te gaan studeeren; dat Gij de bewerking en voltooiing van dit proefschrift helaas niet meer mocht beleven, is mij eene groote droefenis.

Bij het beëindigen van dit proefschrift rust op mij de aangename taak U, Oud-Hooggeleerden, Hooggeleerden en Lectoren aan de Rijks Universiteit te Utrecht, mijn groote dankbaarheid te betuigen voor de moeite, welke Gij U getroost hebt, mij, in de gekozen studierichting, op te leiden.

U, Hooggeleerde de Graaff, Hooggeachte Promotor, ben ik zeer veel dank verschuldigd, dat Gij mij de gelegenheid gaf bij U te mogen promoveeren; Uw ruime kennis, Uw welgemeende en opbouwende kritiek en groote hulpvaardigheid, gaven mij veel steun bij de bewerking van dit proefschrift. Ook de hartelijkheid waarmede U mij steeds tegemoet trad, deden mij weldadig aan.

Hooggeleerde van Romburgh, dat Gij mijn leermeester in de organische-chemie zijt geweest stel ik steeds op hoogen prijs, den tijd, dat ik Uw assistent mocht zijn, behoort, mede door de samenwerking, welke ik van U mocht ondervinden, tot de aangenaamste periode van mijn studietijd. De belangstelling, die U bovendien steeds voor mij en mijn gezin aan den dag legde, getuigde van een oprecht medeleven.

Hooggeleerde Ruzcika, dat Gij mij verder in de organische-chemie, en wel hoofdzakelijk, in die der aetherische olieën, bekwaamdet, daarvoor betuig ik U hierbij mijn dank.

U, Hooggeleerde Kögl, ben ik erkentelijk, dat Gij mij microchemisch leerdet werken; het assistentschap bij U heb ik zeer gewaardeerd.

U, Hooggeleerde Cohen, onderwees mij de physische-chemie; dit en Uw groote vriendschappelijkheid dwingen mij tot oprechten dank.

Hooggeleerde Kruyt, dat juist Gij, met Uw groote kennis en zeer bijzondere wijze van college geven, het waart, die mij in de faseleer en colloidchemie inleidet, waardeer ik ten zeerste.

U, Hooggeleerde School, betuig ik mijnen dank voor de welwillendheid en moeite, waarmede gij problemen, die zich tijdens de bewerking van dit proefschrift voordeden, oplostet, mede voor de, in Uw laboratorium genoten gastvrijheid, gevoel ik mij zeer verplicht.

U, Hooggeleerde Went, zeg ik dank voor het onderwijs in de botanie, Uw onderricht in de microscopie is mij bij mijn bacteriologische studiën van groot nut geweest.

U, Hooggeleerde Moll, betuig ik mijnen dank voor de natuurkundige opleiding, welke ik bij U genoot.

Gij, Hooggeleerde Rutten, waart 't, die mijn eerste schreden bestuurdet op het moeilijke pad der kristallographie; hiervoor zeg ik U ten zeerste dank.

Van U, Hooggeleerde van Everdingen en Zeergeleerde Cannegieter, apprecieer ik ten zeerste de bereidwilligheid, waarmede Gij aan mijne wenschen betreffende een barograaf, voldeedt.

U, Zeergeleerde Strengers, ben ik veel dank verschuldigd voor de anorganische-opleiding die Gij mij geeft.

U, Zeergeleerde van Romburgh en Zeergeleerde Moesveld, betuig ik mijne erkentelijkheid voor alles waarin Gij mij steeds terzijde stondt.

Jou Noor, ben ik heel dankbaar voor de hulp, die je mij de laatste maanden verleendet.

Verder wil ik allen die mij bij het bewerken van dit proefschrift behulpzaam waren, en hen van wie ik in mijn studententijd vriendschap mocht ontvangen, — in de eerste plaats, denk ik hierbij aan het Utrechtsch Studenten Corps, welks bloei mij immer zal verheugen, — nog eens mijn oprechten dank betuigen.

En tenslotte ben ik zeer gevoelig voor de groote ijver en kunde, waarmede het technisch personeel van het Pharmaceutisch- en het Organisch-chemisch laboratorium, mij hulp verleende.

INHOUD

	Blz.
HOOFDSTUK I.	
Inleiding	11
HOOFDSTUK II.	
Vroegere onderzoekingen betreffende de vergisting van aethaandiol-(1.2)	19
HOOFDSTUK III.	
Bacteriemateriaal en chemicaliën, welke bij de vergisting van glycol gebruikt werden	23
HOOFDSTUK IV.	
Het kwalitatieve onderzoek naar de vergistingsproducten van glycol	28
HOOFDSTUK V.	
Quantitatieve onderzoek naar de vergistingsproducten	41
HOOFDSTUK VI.	
Inrichting der vergistings-proeven	56
HOOFDSTUK VII.	
Resultaten van het kwalitatieve onderzoek	63
HOOFDSTUK VIII.	
Resultaten van het quantitatieve onderzoek	70
<i>a.</i> Aërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan geen krijt was toegevoegd	73
<i>b.</i> Anaërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan geen krijt was toegevoegd	76
<i>c.</i> Aërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt was toegevoegd	79
<i>d.</i> Anaërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt was toegevoegd	81
<i>e.</i> Anaërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt en natriumsulfiet waren toegevoegd	84
<i>f.</i> Vergisting van glycol met successieve toevoegingen van 5 % peptonoplossing	88

	Blz.
<i>g.</i> Vergisting van glycol, terwijl waterstof door de gistende vloeistof werd geschud	93
<i>h.</i> Vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt en calciumformiaat was toegevoegd	98
<i>i.</i> Vergisting van aethyleenoxyde	102
<i>j.</i> Vergisting van dioxaan	105
 HOOFDSTUK IX.	
Bespreking van de verkregen resultaten	108
SAMENVATTING	116
LITTERATUUROVERZICHT	117

HOOFDSTUK I.

Ter inleiding van het volgende onderzoek, zij een zeer beknopt overzicht gegeven van de verschillende fasen, die in het vergistingsvraagstuk op den voorgrond traden.

De eerste, die een quantitatief onderzoek naar de suikervergisting instelde, was Lavoisier (1789); hoewel hij noch de samenstelling van suiker, noch die van alcohol kende, geraakte hij door een toevallige compensatie van fouten, tot een juist resultaat. Door hem werden alcohol, koolzuur en een weinig azijnzuur gevonden.

In 1815 stelden Gay-Lussac en Dumas de bruto vergistingsformule op:



Met deze uitkomst stelde men zich gedurende het grootste gedeelte van de 19e eeuw tevreden en vroeg zich niet af hoe dit resultaat inderdaad tot stand kwam, doch beijverde zich de oorzaken te leeren kennen, die tot deze reactie aanleiding gaven. Er ontstond een strijd tusschen Pasteur eenerzijds en Liebig anderzijds over het vraagstuk of deze vergisting al dan niet door het levende organisme bewerkt werd.

Hierop volgde in 1897 de ontdekking van Buchner, dat, uit door kwartzand stuk gewreven gistcellen, een cel-vrij sap kon geperst worden, dat in staat is, om suiker te vergisten. Het ferment, dat deze reactie teweeg brengt, werd zymase genoemd.

Pogingen, om een beter inzicht in het chemisme der suikervergisting te verkrijgen, werden daarna ingesteld door: von Bayer, Nencki, Buchner en Meisenheimer, waarbij de zgn. triosehypothese geboren werd nl., het uitéenvallen van het hexose-molecule in twee triose-moleculen.

Vele triosen worden dan als tusschenproducten aangenomen: A. von Bayer¹⁾ melkzuuranhydride, Buchner en Meisenheimer²⁾

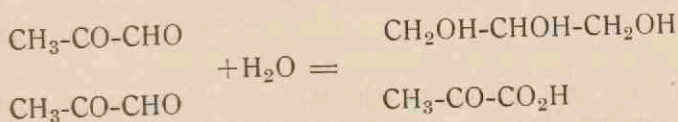
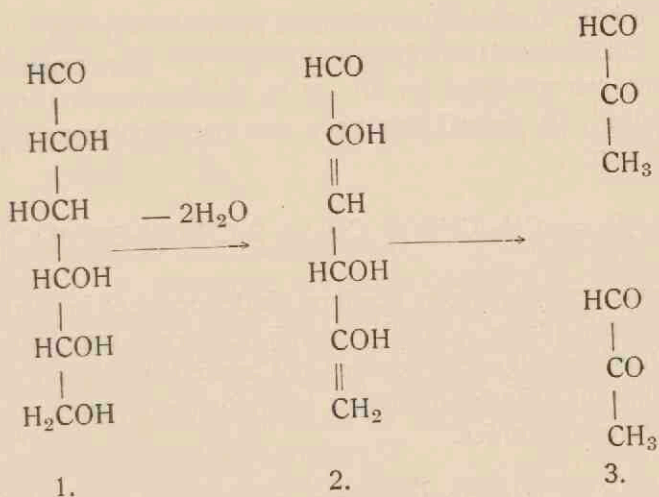
dioxyaceton, Loeb³⁾ glycerinealdehyde en Wohl⁴⁾ methylglyoxaal; daar de genoemde triosen slechts moeilijk en langzaam door de gistcel aangetast werden, zou deze theorie doodgeloopen zijn, zoo niet Fernbach en Schoen⁵⁾ bij alcoholische gisting — waarbij aan de te vergisten vloeistof calciumcarbonaat was toegevoegd, — pyrodruivenzuur hadden gevonden; parallel hiermede ging het onderzoek van Neubauer⁶⁾, die een biologische omzetting der aminozuren tot α -ketonzuren vaststelde; daarna ontdekte Ehrlich⁷⁾, dat α -aminozuren, bij de zoogenaamde alcoholische gisting der aminozuren, tot primaire alcoholen worden omgezet, waardoor tevens het ontstaan van foezelolie uit eiwitten en niet uit suikers, werd bewezen.

Vervolgens ontdekken Neuberger en Fromherz⁸⁾, zoowel als Neuberger en Hildesheimer⁹⁾, de gemakkelijke vergistbaarheid van het pyrodruivenzuur.

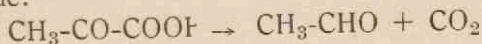
Neuberger herstelt de theorie van Wohl in eere door aan te nemen, dat het hexose-molecule uiteenvalt in twee triose-moleculen, deze zijn dan in nauw verband gedacht met het methylglyoxaal, het aldehyde van het pyrodruivenzuur. De triosen worden omgezet in pyrodruivenzuur, dat op zijn beurt door decarboxylatie tot acetaldehyde wordt afgebroken. Door reductie ontstaat uit laatstgenoemde verbinding, dus secundair, de aethylalcohol.

Neuberger ondervangt het bezwaar van de onvergistbaarheid van methylglyoxaal, door aan te nemen, dat deze verbinding, bij het ontstaan uit het hexose-molecule, in een anderen isomeren vorm optreedt, dan de stabilere vorm, waarin het door synthese verkregen wordt. Neuberger¹⁰⁾ stelt in 1913 een schema op, dat in het laatste gedeelte van dat van Wohl afwijkt; het schema, dat gedurende bijna 20 jaar als het schema zou gelden, dat de alcoholische gisting weergeeft.

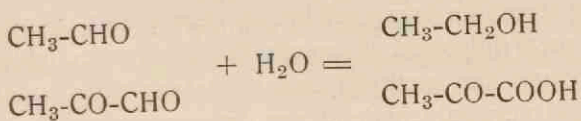
Het glucose-molecule zou onder waterafsplitsing overgaan in een theoretisch tusschenproduct (2.), dat vervolgens uiteenvalt in twee moleculen methylglyoxaal (3.). De twee moleculen methylglyoxaal ondergaan vervolgens de reactie van Cannizzaro en geven glycerine en pyrodruivenzuur.



Het pyrodruivenzuur gaat onder koolzuur-afgifte over in acetaldehyde:

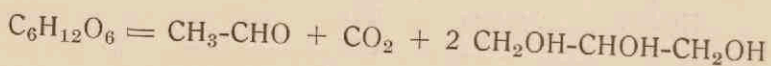


Voor de vorming van alcohol is dan nog een tweede reactie volgens Cannizzaro noodig, en wel tusschen één molecule acetaldehyde en één molecule methylglyoxaal:

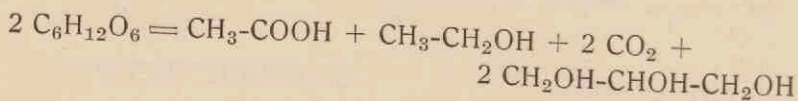


Het ontstane pyrodruivenzuur valt dan weer uiteen in acetaldehyde en koolzuur. De reactie-snelheid van de gemengde reactie van Cannizzaro is zóóveel grooter, dan die, welke zich ontwikkelt bij de reactie tusschen twee moleculen methylglyoxaal, dat aan het einde der gisting maar weinig glycerine ontstaan is. Neuberg noemde dit de eerste vergistingsvorm. Zoo werden vergistingen, die onder toevoeging van bepaalde stoffen verliepen, tweeden-, derden-, enz. vergistingsvorm genoemd.

Wordt het acetaldehyde tijdens de gisting vastgelegd, — Connstein en Lüdecke ¹¹⁾, Neuberg en Farber ¹²⁾ — dan ontstaat glycerine met een opbrengst van 30—35 %, berekend op de toegevoegde suiker. De vergelijking voor den tweeden vergistingsvorm wordt dan:

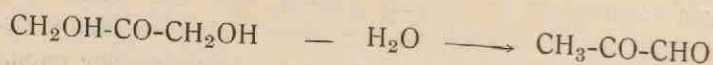
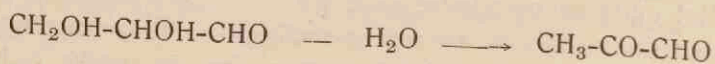


De derde vergistingsvorm treedt op als de vergisting in zwak alkalisch milieu plaats grijpt ¹³⁾, hierbij reageeren twee moleculen acetaldehyde volgens de reactie van Cannizzaro en geven alcohol en azijnzuur, waarbij tevens als bijproducten glycerine en koolzuur gevormd worden.



Onderwerpen wij nu het schema van Neuberg aan een nadere beschouwing, dan is het ontstaan van acetaldehyde en koolzuur, onder bepaalde omstandigheden, wel bewezen. Ook is het mogelijk, dat acetaldehyde volgens een reactie van Cannizzaro tot alcohol gereduceerd kan worden, doch hierbij moet tevens een andere verbinding geoxydeerd en dat dit nu juist methylglyoxaal moet zijn is de zwakke plek in Neuberg's schema.

Het is nog steeds de vraag, of het op deze plaats optredende product wel methylglyoxaal is, zooals Wohl veronderstelde. Uit chemisch oogpunt kan methylglyoxaal ontstaan door wateronttrekking aan glycerinealdehyde of aan dioxyceton.



Men zou het ontstaan van glycerine gemakkelijker kunnen verklaren door een reactie volgens Cannizzaro met behulp van glycerinealdehyde, dan met methylglyoxaal; immers hierbij moet nog

gelijktijdige opname van water aan een geëmoliseerde verbinding plaats grijpen, hetwelk tot nu toe nog niet in vitro mogelijk bleek.

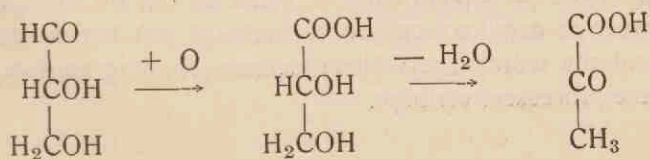


Waar het echter door Neuberg bewezen is, dat zijn ketonaldehydemutase (de glyoxalase van Dakin) in staat is, het methylglyoxaal in melkzuur om te zetten, verkiest hij het methylglyoxaal boven glycerinealdehyde. Dat het methylglyoxaal, zoowel als het glycerinealdehyde en dioxyaceton, moeilijk tusschenproducten kunnen zijn, volgt wel, uit de tot nu toe bestaande onmogelijkheid, deze stoffen te laten vergisten.

Zoals reeds eerder werd opgemerkt, zegt Neuberg nu: „het methylglyoxaal speelt niet als zoodanig de rol van tusschenproduct bij de alcoholische gisting, doch een tautomerevorm.” Hiertegen is in te brengen, dat dan deze andere vormen van methylglyoxaal toch in dynamisch evenwicht moeten zijn met het gewone methylglyoxaal, en wanneer dus een gedeelte van den anderen vorm door de gisting verdwijnt, zal deze steeds weer uit het gewone methylglyoxaal worden aangevuld, zoodat dit ten slotte toch vergist moet kunnen worden.

Dit is dan de omgekeerde volgorde van die, waarbij methylglyoxaal in den gewonen vorm in het gistingssubstraat ontstaat.

In 1914 stelde Lebedew¹⁴⁾ zijn gistingsschema op; over het algemeen komt dit overeen met dat van Neuberg; de voornaamste afwijking is, dat Lebedew glycerinealdehyde als eerste tusschenproduct aanneemt. Volgens hem wordt het glycerinealdehyde niet in methylglyoxaal omgezet, doch tot glycerinezuur geoxydeerd; dit laatste gaat dan, onder wateruittreding, over in pyrodruivenzuur.



De hierboven ontwikkelde theorie paste men eveneens toe op de gemengd-zure-gisting.

Onder „gemengd-zure-gisting” wordt verstaan de omzetting van koolhydraten tot verbindingen met anderen (meestal kleinen) energie-inhoud, waarbij de veelsoortigheid van de verbindingen, die hierbij tegelijkertijd ontstaan, dadelijk in het oog springt. Aan de vele zuren, die men onder deze verbindingen aantreft, wordt de naam „gemengd-zure-gisting” ontleend.

Voornamelijk zijn het de organismen van de coli-typhus-groep, die deze wijze van ontleding van suikers, teweegbrengen. Daar deze ontledings-producten, — al is het vaak in andere verhoudingen tot elkander, — eveneens onder streng anaërobe omstandigheden gevormd worden, wordt — met Pasteur als grondlegger dezer theorie — algemeen aangenomen, dat de bacteriën door middel van deze afbraak in hun energie-behoefte voorzien, welke energie noodzakelijk is voor het voortbestaan van het organisme en zijne voortplanting, zonder daarbij van zuurstof gebruik behoeven te maken.

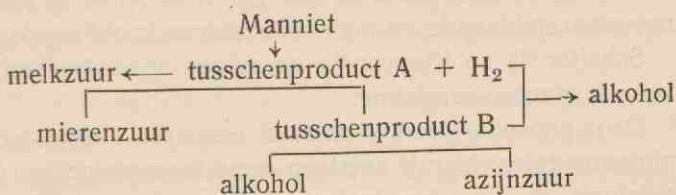
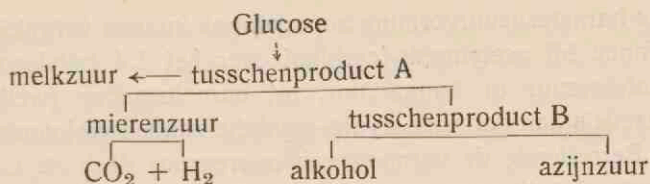
Het zou ons te ver voeren al het werk, dat noodig was om tot een inzicht in deze zoo samengestelde koolhydraat-ontleding te kunnen komen, in extenso te bespreken, doch willen slechts enkele, in verband met dit onderzoek, belangrijke schema's beschrijven.

A. Harden ¹⁵⁾ isoleerde uit anaërobe vergistingen van suikers en polyalkoholen door *B. coli communis*: koolzuur, waterstof, aethylalkohol, melkzuur, azijnzuur, barnsteen- en soms wat mierenzuur.

De hoeveelheden alcohol en azijnzuur werden door hem bij benadering aequivalent gevonden.

Grey ¹⁶⁾ geeft in 1914 een schema voor de vergisting van glucose en manniet.

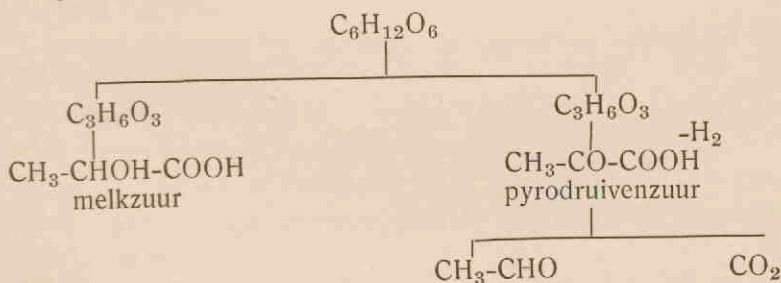
Hij geeft als zijn meening te kennen, dat alcohol en azijnzuur uit het zelfde tusschenproduct ontstaan en dat dit tusschenproduct weer in aequimoleculaire hoeveelheid met het mierenzuur, gevormd zou worden, terwijl de melkzuurvorming onafhankelijk van deze processen, verloopt.



Voor tussenproduct A neemt hij de mogelijkheid van methylglyoxaal, en voor B, acetaldehyde aan.

In 1919 gelukte het aan Neuberg¹⁷⁾ en zijn medewerkers, evenals bij de alcoholische-gisting, ook bij de vergistingen van glucose door *B. lactis aërogenes* en *B. coli*, met behulp van sulfiet, acetaldehyde vast te leggen.

In het „Nederlandsch tijdschrift voor Hygiëne, Microbiologie en Serologie” geeft W. C. de Graaff¹⁸⁾ een verhandeling over de gemengd-zure gisting; wij willen volstaan met het overnemen van zijn schema:



1. CH₃-CHO + H₂ = CH₃-CH₂-OH
2. 2CH₃-CHO + H₂O = CH₃-CH₂OH + CH₃COOH
3. CH₃-CHO + H₂O = CH₃-COOH + H₂ (hydro-oxydatie)
4. 2CH₃-CHO = CH₃-CO-CHOH-CH₃ (condensatie)
5. 2CH₃-CHO + 2H₂O = COOH-CH₂-CH₂-COOH + 3H₂
(condensatie en hydro-oxydatie)
6. CH₃-CO-CHOH-CH₃ + H₂ = CH₃-CHOH-CHOH-CH₃

De barnsteenzuurvorming zou zich ook kunnen voltrekken, te beginnen bij acetylmethylcarbinol over het 1.4 butyleenglycol en maleïnezuur of fumaarzuur, tot barnsteenzuur (welke laatste reactie's dan door een hydro-oxydatie zouden verlopen).

Betreffende de vorming van mierenzuur deelt de Graaff nog mede, dat dit zuur gevormd kan zijn door splitsing van $C_3H_6O_3$ nevens acetaldehyde, en door reductie van kooldioxyde.

Scheffer¹⁹⁾ en Kluiver²⁰⁾ geven een zeer uitgebreid schema voor de glucose-vergisting.

Door phosphoryleering ontstaat eerst een hexose-mono-phosphorzure ester; hieruit ontstaan eerst twee moleculen glycerine-aldehyde, die over hun hydraten, door intra-moleculaire oxydo-reductie-reactie's, tot methylglyoxaalhydraat omgezet worden. Dit laatste wordt eenerzijds gestabiliseerd tot melkzuur, dat bij anaërobe gistingen niet verder wordt afgebroken; anderzijds wordt het ontleed tot mierenzuur en acetaldehydehydraat en ten derde heeft een ontleding in pyrodruivenzuur en waterstof plaats.

HOOFDSTUK II.

VROEGERE ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE VERGISTING VAN AETHAANDIOL-(1.2).

De volgende onderzoekers beschrijven het ontstaan van verschillende stoffen uit glycol *):

Brown ²¹⁾ zegt, dat uit glycol, onder invloed van een azijnzuurbacterie, glycolzuur ontstaat.

Henneberg ²²⁾ toont zuurvorming aan, uit glycol, door *Acetobacter xylinum*.

Seifert ²³⁾ toont eveneens de vorming van glycolzuur uit glycol, door *B. pasteurianum* en *B. kutzingianum*, aan.

Waterman ²⁴⁾ vermeldt de vergisting van glycol door *Acetobacter melanogenum*.

A. Harden en Mrs. D. Norris ²⁵⁾ bepaalden quantitatief de hoeveelheid butyleenglycol, die door *B. lactis aërogenes*, uit glycol gevormd wordt.

F. Visser 't Hooft ²⁶⁾ vond, dat bij de oxydatie van glycol, onder invloed van *A. xylinum*, *A. melanogenum* en *A. suboxydans*, glycolzuur ontstaat.

Siegwart Hermann ²⁷⁾ beschrijft de omzetting van glycol in zuur, door *B. gluconicum*.

Ida Smedley Maclean en Dorothy Hoffert ²⁸⁾ wijzen op de slechte vergistbaarheid van glycol door gist.

Teizo Takahaski en Toskinobu Asai ²⁹⁾ vermelden de vergisting van glycol tot glucuronzuur door *B. hoshigaki* var. *glucuronicum* L. nov. spec.

Hans Mosel ³⁰⁾ vindt, dat *B. ascendens* minder zuur uit glycol doet ontstaan, dan *B. aceti*.

Bij Grey ³¹⁾ vinden we een quantitatief onderzoek over de vergisting van glycol door *B. coli*, Esch., welke bacterie in zeer groote hoeveelheden aan de te vergisten vloeistof, werd toegevoegd. Hij vond geen gas, weinig alcohol, en betrekkelijk groote hoeveel-

*) Eenvoudigheidshalve schrijven wij inpl. v. aethaandiol-(1.2), glycol.

heden azijnzuur en melkzuur. Grey voegde aan zijn voedingsbodem calciumformiaat toe met het doel een betere neutralisatie te verkrijgen van de, tijdens de vergisting, gevormde zuren, dan met gesuspenseerd krijt mogelijk was *).

In de dissertatie van Le Fèvre ³²⁾, beschrijft deze onderzoeker de vergisting van vele koolhydraten, zuren, aldehyden en meerwaardige alcoholen; onder deze laatsten wordt ook het glycol besproken. In verband met ons onderwerp refereeren wij slechts deze onderzoeken.

De voedingsbodem ³³⁾ welke L.F. gebruikte, om de vorming van acetaldehyde uit de onderzochte stoffen vast te stellen, bevatte:

Pepton „Witte”	1,0	g
Na ₂ SO ₃	2,0	„
Na ₂ CO ₃	1,0	„
Water	100	cm ³

Hij liet het glycol in deze oplossing vergisten door 3 Coli-, 9 Paratyphus B-, 2 Paratyphus A-, 2 Typhus-, en 5 Dysenteriestammen, en vond, bij het kwalitatieve onderzoek, zooals uit de tabel op blz. 29 van zijn diss. blijkt, bij de Colistammen een duidelijke acetaldehydeproductie, terwijl de andere stammen slechts sporen hiervan vormden.

Voor het kwalitatieve onderzoek naar de andere ontledingsproducten, maakte L.F. gebruik van een voedingsbodem van de volgende samenstelling:

Pepton „Witte”	5	g
CaCO ₃	5	„
Te vergisten stof	5	„
Water	500	cm ³

De glycol was gezuiverd door destillatie, kpt. 197°. Hij entte met B. coli en broedde gedurende 26 dagen bij 37°. In het destillaat werd acetaldehyde, ammoniak en een spoor indol gevonden. Zoowel volgens de proef van Rimini, als door de hydrazonvorming, vond hij een sterk positieve reactie op acetaldehyde. De reactie's op andere mogelijke, neutrale ontledingsproducten vielen negatief uit.

*) Volledige tabel van Grey, zie blz. 98.

Van de vluchtige zuren werd alleen azijnzuur gevonden. Ook de reactie's op barnsteen- en melkzuur waren zonder eenig resultaat.

Glycol gaf geen gasvormige producten, noch met *B. coli*, noch met de andere bacteriën van deze groep.

Met een *Paratyphus*stam verkreeg hij de zelfde producten als met *B. coli*, maar in veel kleinere hoeveelheden³⁴).

Eveneens stelde Le Fèvre een quantitatief onderzoek in naar de ontledingsproducten van glycol³⁴).

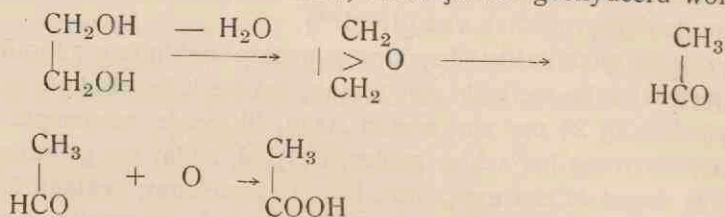
Voor de quantitatieve bepaling van deze verbinding gebruikte hij een extractie-methode met aceton; het sterk ingedampde substraat liet hij 24 uur met aceton staan, filtreerde, verdampte de aceton en woog het achter gebleven glycol, nadat het gedurende eenige dagen in een exsiccator, boven zwavelzuur, gestaan had.

Hij verklaart, dat deze methode geen al te beste resultaten opleverde, maar past toch de extractie-methode toe, daar een oxydatie in alkalisch milieu met permanganaat, na aanzuren en terugtitreeren van het niet verbruikte permanganaat, geheel mislukte; dit was volgens L.F. te wijten aan de geringe concentratie van het glycol in de oplossing, zoodat er bijna geen verschil was waar te nemen tusschen een 1 %-glycol-oplossing en een blanco peptonwateroplossing. Zijn resultaten, per 50 cm³ vloeistof, worden door onderstaande tabellen weergegeven.

verdwenen stof	gevormde producten in mg	berekend als C.
229 mg. glycol; berekend als C. 88,6 mg	acetaldehyde 89 mg	48,5 mg
	azijnzuur 87 „	34,8 „
	totaal 176 mg	83,3 mg of 94 %
222 mg. glycol; berekend als C. 86 mg	acetaldehyde 83 mg	45,2 mg
	azijnzuur 89 „	35,6 „
	totaal 162 mg	80,8 mg of 93,9 %

Hij wijst op de opvallend groote hoeveelheid onaangetaste glycol en meent de oorzaak hiervan te moeten zoeken bij een te groote acetaldehyde-concentratie aan het einde van de proef ³⁵⁾.

Wat het chemisme van de ontleding van glycol betreft, beschrijft L.F. op blz. 80—82 van zijn diss., dat uit glycol door afsplitsing van de bestanddeelen van water, aethyleenoxyde ontstaat, dat zich omlegt tot acetaldehyde, hetwelk ten slotte, met behulp van de zuurstof der lucht, tot azijnzuur geoxydeerd wordt.



In de opvatting, dat het glycol zich eerst zou omzetten in acetaldehyde, meent hij gesteund te worden door het onderzoek van Ipatiew ³⁶⁾, die deze reactie bij 250°, in tegenwoordigheid van aluminiumoxyde, liet verlopen.

Dat de oxydatie door de zuurstof der atmosfeer tot stand komt, meent hij te kunnen verklaren, uit een door hem uitgevoerde proef, waarbij hij tijdens de vergisting een stroom waterstofgas door de apparatuur leidde; hij vond toen groote hoeveelheden acetaldehyde, maar geen spoor van azijnzuur.

Le Fèvre komt tot de conclusie, dat bij de ontleding van glycol, de atoomverschuiving de energiebron moet zijn en dat hier pyrodruivenzuur geen tusschenproduct is, ondanks het feit, dat acetaldehyde ontstaat.

Ten slotte geeft hij op blz. 95 nog een tabel, waaruit blijkt, dat uit glycol door 3 Colistammen, zuur werd gevormd; 9 Paratyphus B-, 2 Paratyphus A- en 2 Typhusstammen gaven slechts sporen zuur, terwijl verschillende Dysenteriestammen geen zuur vormden.

HOOFDSTUK III.

HET BACTERIEMATERIAAL EN DE CHEMICALIËN, WELKE GEBRUIKT WERDEN.

Voor onze vergistingen gebruikten wij, het in onderstaande tabel omschreven bacteriemateriaal.

De reïnculturen entten we steeds na twee weken op schuinebouillon-agar over en controleerden, tijdens het onderzoek, meerdere keeren de meest kenmerkende eigenschappen. Zooals nog nader beschreven zal worden, onderzochten we tevens, voordat met het opwerken van een vergisting begonnen werd, door enten van een oogje van het gistingssubstraat op schuinebouillon-agar, of de bacteriën nog in leven waren en gebruikten de aangeslagen culturen voor de beoordeeling, of er geen infectie met andere bacteriën had plaats gevonden.

De nummers: 1—4, 20—29, 31 en 38—52, waren afkomstig uit de verzameling van de bacteriologische afdeling van het Pharmaceutisch laboratorium te Utrecht.

De nummers: 5, 6, 11, 16, 17, 19 en 37 kregen wij uit de verzameling van het Centraal laboratorium te Utrecht.

De nummers: 9, 10, 10a, 14, 15 en 34—36 van het Instituut voor tropische hygiëne, afd. van het Koninklijk Koloniaal Instituut te Amsterdam en ten slotte de nummers: 7, 8, 12, 13, 18, 32 en 33, uit de collectie van het Instituut voor tropische geneeskunde te Leiden; voor deze welwillende medewerking zeg ik den directeurs van genoemde instellingen nogmaals mijn welgemeenden dank.

Lijst van het gebruikte bacteriemateriaal.

No. *Coli-groep*

1	B. coli	Glorian	st. Glorian	21 B	Ph. 1.
2	B. „	Schmidt	st.	41 B	„
3	B. „		st.	7	„
4	B. „	f.c.			„

Typhus-groep

5	B. typhi		st.	34 biq.	Ctr. 1.
6	B. „		st.	354 f.c. 1532	„
7	B. „		st.	67	Inst. T.H.L.
8	B. „		st.	68	„
9	B. „		st.	O. 901	Inst. T.H.A.
10	B. „		st.	76 Medan	„
10a	B. „	Schaap			„

Para-typhus A-groep

11	B. para-typhi	A.	st.	Snijders	Ctr. 1.
12	B. „	„ A.	st.	79	Inst. T.H.L.
13	B. „	„ A.	st.	80	„
14	B. „	„ A.	st.	21 Medan	Inst. T.H.A.
15	B. „	„ A.	st.	Roemenië	„

Para-typhus B-groep

16	B. para-typhi	B.	st.	961 f.c. 1531	Ctr. 1.
17	B. „	„ B.	st.	816 f.c. 1532	„
18	B. „	„ B.	st.	88	Inst. T.H.L.
19	B. enteritidis	Gärtner	st. Erica		Ctr. 1.

Para-typhi C-groep

20	B. para-typhi	C.	st. type Orient (Hirschfeld)		Ph. 1.
21	B. „	„ C.	st. „ Berlijn (Julius)		„
22	B. „	„ C.	st. „ Virchow (inst. R. Koch)		„
23	B. „	„ C.	st. „ Amsterdam (Matseld Vlis.)		„
24	B. Suipestifer		st. v. Waanen		„
25	B. „		st. 1718 (Kunzendorf)		„
26	B. Hogcholera	Salmon	st. (Snijders)		„
27	B. psithacosis		st. Nocard		„
28	B. „		st. Perry		„

Para-typhi D-groep

29	B. typhi-murium		st. 10 B.		„
----	-----------------	--	-----------	--	---

Dysenterie Shiga-Kruse-groep

31	B. dys. Sh.-Kr.	st. 48 B.	Ph. 1.
32	B. " Sh.	st. 149	Inst. T.H.L
33	B. " Sh.	st. 151	"
34	B. " Deli Shiga	st. 22	Inst. T.H.A.
35	B. " " "	st. Schneider-Krall	"
36	B. " " "	st. Podhaga	"

Dysenterie Flexner-groep

37	B. dys. Flexner	st.	Ctr. 1.
38	B. " "	st. V. Oxford	Ph. 1.
39	B. " "	st. W. Oxford 25/10	"
40	B. " "	st. " 1138 Borculo	"
41	B. " "	st. " 790 '26 Sleen	"
42	B. " "	st. VI. 623 Bergen op Zoom	"
43	B. " "	st. VI. 1474 Staphorst	"
44	B. " "	st. VI. Nieuweroord 1934	"
45	B. " "	st. Z. Oxford 25/10	"

Dysenterie Sonne-groep

46	B. dys. Sonne	st. 2254 Opeinde	"
47	B. " "	st. 2505 Woudrichem	"
48	B. " "	st. 588 Zuidlaren	"
49	B. " "	st. 1291 Bussum	"
50	B. " "	st. 2337 Oudewater	"
51	B. " "	st. 2282 Hilversum	"
52	B. " "	st. 631 Goedereede	"

Nadat genoemde bacteriën zoo noodig in rein-cultuur waren gebracht, onderzochten wij de stammen zoowel morphologisch, als physiologisch, (door enten op de voor dit doel gebruikelijke suiker- en andere oplossingen), op hunne eigenschappen; hieruit bleek ons, dat wij de voor genoemde bacteriën, specifieke soorten zuiver in handen hadden.

De bij de vergistingen gebruikte chemicaliën.

Wij streefden naar een zoo groot mogelijke zuiverheid van de, voor het bereiden der voedingsbodems, gebruikte chemicaliën.

Pepton.

Als stikstofbron voor de bacteriën maakten wij gebruik van

pepton „Witte”. Ter voorkoming van afwijkingen in de samenstelling, zooals zich zouden kunnen voordoen bij het verwerken van pepton, welke afkomstig was van verschillende zendingen, namen wij één Kg, mengden dit goed dooreen en verdeelden het over eenige flesschen, welke met een, met ongebluste kalk gevulde stop, gesloten werden.

Zoodoende hadden wij een ruime voorraad pepton van zoo constant mogelijke samenstelling, waaruit wij voor de verschillende vergistingen telkens putten konden.

Keukenzout.

Het gebruikte keukenzout was chemisch-zuiver natriumchloride.

Krijt.

Wij gebruikten zeer fijn verdeeld, zuiver krijt, het zgn. carbonas calcicus levissimus.

Natriumsulfiet.

Het, bij de sulfiet-gistingen, toegepaste natriumsulfiet voldeed aan de eischen van zuiverheid.

Glycol.

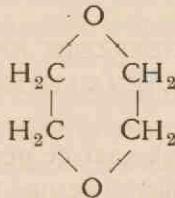
Het glycol was geleverd door de firma Schering-Kahlbaum, als preparaat voor wetenschappelijke doeleinden; wij destilleerden het nog tweemaal in vacuum, telkens de middenfractie voor ons doel afzonderende. Wij onderzochten het op de aanwezigheid van: alcohol, acetaldehyde, azijnzuur en dioxaan. Genoemde verbindingen bleken er niet in aanwezig te zijn. Direct na de destillatie, bewaarden wij het in een gesloten flesch, welke in een chloorcalciumexsiccator stond, om te voorkomen, dat het waterdamp aan de lucht zou opnemen.

Dioxaan.

Wij gebruikten een preparaat van Fraenkel en Landau „reinst Diaethyleendioxyde”. Het werd volgens de methode van Eigenberger³⁷⁾ en daarna nog eens door uitvriezen, gezuiverd.

Het was vrij van: acetaldehyde, alkohol en azijnzuur.

Het 1-4 dioxaan is een waterheldere vloeistof, welke door:



wordt voorgesteld. Lourenço bereidde het in 1863; in het zelfde jaar maakte Würtz het door condensatie van glycol en aethyleenbromide. In 1906 publiceerde Faworsk³⁸⁾ een bereiding van dioxaan, door glycol met 4 % geconcentreerd zwavelzuur te destilleeren.

Het dioxaan mengt zich zoowel met water, als met de gebruikelijke, organische oplosmiddelen. Het is zeer hygroscopisch, heeft een kookpunt van 101,4° 760 mm en een smeltpunt van 11,8°.

Voor de zuivering en eigenschappen van het dioxaan zij verder naar de, deze onderwerpen uitgebreid behandelende dissertatie van den Heer F. Ph. A. Tellegen³⁹⁾, verwezen.

Aethyleenoxyde.

Het aethyleenoxyde betrokken wij eveneens van Fr. en L. Wij destilleerden het bij zoo laag mogelijke temperatuur op steriele wijze, waardoor het tevens nog een zuivering onderging. De afwezigheid van sporen acetaldehyde konden wij niet met zekerheid vaststellen, daar aethyleenoxyde met het reagens van Rimini een roode- tot violette verkleuring geeft.

HOOFDSTUK IV.

HET QUALITATIEVE ONDERZOEK NAAR DE VERGISTINGS- PRODUCTEN VAN GLYCOL.

Wij vingen het onderzoek naar de gistingsproducten aan, met het bestudeeren van alle hierbij te pas komende reactie's op de afzonderlijke stoffen, welke bij de gisting te verwachten waren. Vervolgens werden mengsels van deze stoffen door de hieronder beschreven scheidingsmethoden weder gescheiden en de verbindingen op dezelfde wijze aangetoond.

De, bij de vergisting van suikers en meerwaardige alcoholen, optredende vergistingsproducten kunnen gerangschikt worden volgens de groepen:

A. *Gasvormige producten.*

Dit kunnen zijn: waterstof, koolzuurgas en methaan.

B. *Vluchtige, neutrale en basische verbindingen.*

Te weten: alcoholen, acetaldehyde, acetylmethylcarbinol, diacetyl, dioxaan, ammoniak, indol en aminen.

C. *Vluchtige zuren.*

Waaronder we kunnen rangschikken: mierenzuur en azijnzuur.

D. *Niet vluchtige zuren.*

Melkzuur en barnsteenzuur.

E. *Niet vluchtige, neutrale producten.*

2.3. butyleenglycol.

Wij namen het kwalitatieve onderzoek nu ter hand, door voor een reeks van veertien bacteriestammen (tot de coli-, typhus-, paratyphus- en dysenteriegroep behoorende), in groote (± 300 cm³ bevattende) gistbuizen, vergistingsproeven uit te voeren. De steriele gistbuizen vulden we met een 1 % pepton-oplossing, waaraan $\frac{1}{2}$ % keukenzout en 2 % glycol was toegevoegd, doch geen

krijt, en steriliseerden dit bij 110° , gedurende een half uur.

De gistbuizen werden geënt met een suspensie van de gewenschte bacteriën, welke suspensie wij verkregen, door vier-en-twintig-uur-oude, schuine bouillonagar-kulturen met een weinig peptonwater af te spoelen en vervolgens gedurende 10 dagen bij 37° te bebroeden.

Een tweede proef werd ingezet, waarbij aan bovenstaande pepton-10 % lakmoes-oplossing was toegevoegd en de vloeistof zich in, van gasbuisjes voorziene, kultuurbuizen bevond.

Behalve de resultaten, welke nog nader besproken zullen worden, is hier slechts van belang, dat er in beide gevallen bij deze veertien stammen *geen gas* werd gevonden.

Het onderzoek naar gasvormige producten kon hierdoor dus achterwege blijven.

B. *Vluchtige neutrale en basische verbindingen.*

Na aan de helft van den inhoud der gistbuizen 1 N kaliloog toegevoegd te hebben, tot een even alkalische reactie op lakmoes verkregen was, destilleerden wij de neutrale producten af.

In de eerst overkomende druppels werd op acetaldehyde gereageerd.

Acetaldehyde.

Dit toonden wij aan met de reactie van Rimini⁴⁰), welke wij als volgt uitvoerden: ongeveer 3 cm^3 van de te onderzoeken vloeistof werden met $0,5 \text{ cm}^3$ 4 % nitroprussidnatrium-oplossing vermengd en aan het mengsel 1 cm^3 van een 3 % oplossing van piperidine toegevoegd; een blauwe verkleuring kenmerkt de aanwezigheid van acetaldehyde.

Wanneer deze reactie een positief resultaat opleverde, vingen wij verder het destillaat, in, door ijs gekoeld water op.

Hieruit werd later het aldehyde weer afgedestilleerd, met p. nitrophenylhydrazine, in azijnzure-oplossing, onder zachte verwarming het hydrazon gemaakt en door smeltpunts- en mengsmeltpuntsbepaling met het p. nitrophenylhydrazon van acetaldehyde, als dit laatste hydrazon, geïdentificeerd.

Acetylmethylcarbinol en diacetyl.

De afwezigheid van deze stoffen, bij de vergisting van glycol

met de door mij gebruikte bacteriestammen, bleek uit de negatieve uitkomst, die verkregen werd, door met een gedeelte van het gistingssubstraat de reactie van Voges-Proskauer uit te voeren.

Bij 5 cm³ substraat voegden we 5 cm³ 10 % KOH-oplossing; af en toe doorschuddende bleef dit mengsel gedurende 24 uur in een open Erlenmeyertje staan.

De eosine-achtige kleur, die bij een positieve uitslag van de reactie moest optreden, bleef achterwege; zelfs was bij doorvallend booglicht geen groene fluorescentie waar te nemen *).

Ammoniak, aminen en indol met zijn derivaten.

De aanwezigheid van ammoniak en aminen werd bewezen door het blauw kleuren van een vochtig, rood lakmoespapiertje, dat in het gistingsvat was opgehangen. Bij sommige gistingproeven werd indol gevonden. Het was aan te toonen volgens de reactie van Ehrlich, n.l. 10 cm³ bedeeien met 5 cm³ van een oplossing van 4 g. p-dimethyl-amido-benzaldehyde in 380 g. 96 % alcohol en 80 g. geconcentreerd HCl. Daarna werd 5 cm³ van een verzadigde kaliumpersulfaat-oplossing in water, toegevoegd en geschud.

Bij indolvorming had rood-kleuring binnen 5 min. plaats. De kleurstof was met aethylalkohol uit te schudden.

Aethylalkohol.

In het destillaat reageerden we eerst op acetaldehyde met de reeds genoemde reactie van Rimini: was acetaldehyde aanwezig, dan werd dit — alvorens tot de alcohol bepaling over te gaan, — verwijderd, door eenigen tijd te koken onder een opstaande koeler met p-nitrophenylhydrazine in 30 % azijnzuur en vervolgens de vloeistof voor twee derde gedeelte af te destilleeren.

In de eerst overkomende druppels reageerden we op acetaldehyde; zoo dit nog niet geheel vastgelegd was, zetten we het koken onder opstaande koeler vanzelf sprekend, nog eenigen tijd voort, alvorens de alcohol verder af te destilleeren.

*) Zie eveneens bladz. 38.

De aanwezigheid van alcohol was vast te stellen met behulp van de jodoformreactie van Lieben, uitgevoerd volgens F. Emich⁴¹⁾: In een uitgetrokken buisje voegt men aan het destillaat kaliloog en daarna jood-joodkali (1 : 1 : 10) toe, tot er een gele kleur optreedt, en dan nog zooveel loog tot de gele kleur verdwijnt. Vaak werden nu onder den mikroscoop de kenmerkende, gele kristallen van jodoform waargenomen; was dit niet het geval, dan werd getracht, door eenige malen destilleeren, den alcohol voldoende te concentreeren om de, na toepassing van de jodoform-reactie, gevormde kristalletjes, te kunnen waarnemen. In die gevallen, waar het onmogelijk bleek de kristallen te onderscheiden, volstonden we met het duidelijk waarnemen van den jodoformgeur om tot de aanwezigheid van aethylalkohol te besluiten⁴²⁾.

Het verdient nog opmerking, dat glycol geen jodoformreactie geeft, zooals geconstateerd werd; hierdoor is het dus uitgesloten, dat eventueel mee overgegangene glycol, oorzaak van de jodoformvorming kon zijn.

Qualitatief aantoonen van Dioxaan.

Betreffende het diaethyleendioxyde, 1-4-dioxaan, was tot nu toe betrekkelijk weinig bekend. Door het verschijnen van de dissertatie van F. Ph. A. Tellegen³⁹⁾ is dit, wat de derivaten aangaat, sterk veranderd, doch de isoleering van dioxaan en het aantoonen van deze stof, wanneer zij in kleine hoeveelheden in water voorkomt, is nog niet beschreven.

Voor het aantoonen van dioxaan achten wij het meest geschikt: de verbinding met broom⁴³⁾, het pikraat³⁸⁾ en de verbinding met sublimaat⁴⁴⁾.

Hiervan leek ons het pikraat het meest aanlokkelijke, daar het in aetherische oplossing gevormd wordt, vrij stabiel is en tot smp., 66° heeft.

Voor ons doel bleek het echter ongeschikt, daar het alleen in geconcentreerde, aetherische oplossing en dan nog pas na langen tijd staan, uitkristalliseerde.

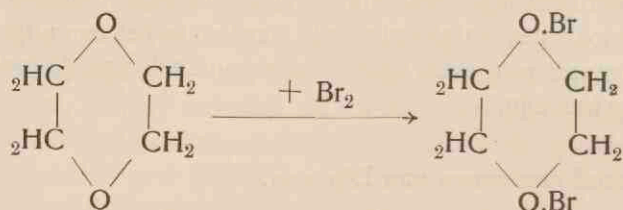
De broom-verbinding was doeltreffender, doordat zij direct en met sporen dioxaan ontstaat in den vorm van karakteristieke

gele naalden met smp. 65—66°; nadeelen waren, dat het dioxaan droog en liefst niet opgelost, voor deze reactie gebruikt moet worden en dat de verbinding, vooral bij aanwezigheid van vocht, snel weder ontleedt.

De verbinding met sublimaat leende zich niet tot identificatie van dioxaan daar de lange naalden groote overeenkomst vertoonden met sublimaat-kristallen en geen smeltpunt kon worden vastgesteld; wel bleek zij uitermate geschikt voor de isolatie van dioxaan, zoowel uit zijn oplossing in water, als in aether.

Zoodat wij besloten de beide laatste verbindingen voor ons onderzoek te gebruiken.

De verbinding van broom met dioxaan, die opgevat moet worden te bestaan uit één molecule dioxaan en twee atomen broom,



vormt zich het beste door inwerking van broomdamp; gebruikt men nl. broom in vloeibaren vorm, dan worden de naalden oranjegeel door het overmatige broom, dat mede door de snelle ontleding van de verbinding in oplosmiddelen, moeilijk te verwijderen is en het smpt. verlaagt.

Met broomdamp verkrijgt men echter zuiver kanarie-geel gekleurde naalden.

Ten onrechte wordt dan ook in de litteratuur de kleur dezer verbinding „oranje” genoemd.

Wij werkten als volgt: in een groot model weegflesch met ingeslepen stop bevond zich een weinig broom; in de flesch stond een glazen driepootje; hierop legden we een horloge glaasje met een hoeveelheid dioxaan en sloten het vat; direct begonnen de lange gele naalden van de broomverbinding, uit te schieten. Reeds bij geringe sporen dioxaan was het verschijnsel goed waarneembaar.

Liet men de verbinding in de weegflesch, dan bleef zij eenigen

tijd intact, doch er uit genomen, ontleedde ze snel aan de lucht.

Maakte men de verbinding bij grootere hoeveelheid, dan gelukte het, bij snel werken, het smeltpunt vast te stellen.

Het aantonen van dioxaan was hiermede opgelost, restte dus nog de isoleering uit zeer verdunde oplossingen in water.

Met aether was het dioxaan uit water uit te schudden, doch dan alleen, wanneer de concentratie niet al te gering was.

Daar wij verwachten konden, dat b.v. in een liter gistingssubstraat een spoortje dioxaan zou kunnen voorkomen, leek ons de perforatie met aether een geschikter methode; wij konden echter, na voorzichtig afdampen van den aether — zelfs als dit bij kamertemperatuur, al dan niet onder een klein vacuum en uitsluiting van waterdamp geschiedde — geen dioxaan door middel van het bromide aantonen.

Het meest voor de hand liggend was een te groote vluchtigheid van het dioxaan, hoewel bij $101,4^{\circ}$ kokende.

Hier kwam ons de sublimaatverbinding, welke spontaan ontstaat, wanneer men dioxaan in een verzadigde sublimaat-oplossing brengt, te hulp, deze vormt zich eveneens, als men een aetherische oplossing van dioxaan met een verzadigde sublimaat-oplossing schudt; het dioxaan laat zich aldus uit aether uitschudden.

In plaats van het kookkolfje direct aan een perforator te verbinden, bevestigden we eerst, met een kurk, een ongeveer 20 cm lange, van onderen dichtgesmolten buis met 2 cm diameter, aan den afvoer van den perforator; ongeveer 4 cm onder den rand van deze nieuwe buis was een naar beneden omgebogen dito gesmolten, gelijk aan de afvoerbuis van den perforator, waaraan nu het kookkolfje door middel van een kurk werd bevestigd. In de tusschengevoegde buis stond een trechttertje met langen steel, die tot den bodem reikte en hier voorzien was van zijdelingsche openingen.

De rand van dit trechttertje bevond zich een paar centimeters boven de laatste afvoerbuis.

De beste voorstelling van het geheel is: een kleine perforator met een groote, verbonden op de plaats waar zich anders de kookkolf bevindt.

De groote perforator vulden we met een oplossing van zeer

weinig dioxaan in water en in de kleine werd een verzadigde oplossing van sublimaat gedaan, ter hoogte van ongeveer 5 cm. Nu extraheerden we met aether; na de te extraheeren vloeistof gepasseerd te zijn, vloeide de aether in den trechter van den kleinen perforator en werd aldus gedwongen door de sublimaat-oplossing te gaan, waarna hij zich in het bovengedeelte van den kleinen perforator verzamelde en ten slotte in het kookkolfje terugvloeide.

Wij verwachtten nu, dat zich in den kleinen perforator de lange naalden van de dioxaansublimaat-verbinding zouden vormen, hetgeen echter niet het geval was; dit werd veroorzaakt doordat deze verbinding vrij goed in aether oplosbaar was, want na afdampen van den aether uit het kookkolfje, op een kokend waterbad, bleef de sublimaatverbinding achter als witte kristallen, die volgens de hieronder beschreven werkwijze, op dioxaan onderzocht werden.

Wij beschrijven deze extractie-methode zoo uitvoerig, daar zij niet alleen van belang is voor de extractie van andere verbindingen, die eveneens niet te perforeren zijn wegens te groote vluchtigheid met de perforerende vloeistof, (natuurlijk moet dan een passend bindmiddel gekozen worden), maar ons eveneens geschikt voorkomt voor de extractie van verbindingen, die niet tegen de langdurige verhitting in de kookkolf kunnen, b.v. voor gevoelige natuurproducten; vanzelf sprekend moet dan in den kleinen perforator een vloeistof gedaan worden, die bedoelde verbindingen daar ter plaatse ook vasthoudt.

Het aantoonen van dioxaan in de sublimaatverbinding geschiedde als volgt: na de extractie dampten we den aether af, tot er zich kristallen begonnen te vormen; dan voegden we wat petroleumather toe, waardoor de sublimaatverbinding werd neergeslagen en filtreerden deze af.

Dan brachten we een weinig van genoemde stof in een micro-sublimeerapparaatje (een wijde reageerbuis, waarin een klein koelbuisje hangt, waardoorheen water kan stroomen); met enkele druppels kaliloog van 50 % stelden we het dioxaan weder in vrijheid en destilleerden het, door verhitten van het apparaatje in een oliebad op $\pm 130^\circ$, snel af; het dioxaan condenseerde tegen het koelertje, waarna het afgestreken werd op een horlogeglasje

en met behulp van broom, op de boven beschreven wijze, kon worden aangetoond.

Nu zetten we de volgende proeven in:

In 70 cm³ water deden we 0,2 cm³ dioxaan en extraheerden met aether, volgens boven vermelde methode, gedurende 4 uren; na afdestilleeren van den aether verkregen we de witte kristallen van de sublimaatverbinding; uit een gedeelte hiervan werd het dioxaan op de reeds beschreven wijze in vrijheid gesteld en met broom aangetoond: de gele naalden waren duidelijk waar te nemen.

Een proefextractie van water met aether zonder dioxaan leverde eveneens weinige witte kristallen op, die volgens het negatieve resultaat van de broomreactie geen dioxaan bevatten.

Hieronder laten we nog enkele proeven volgen, welke van nut konden zijn, alvorens tot de bepaling van dioxaan in een gistingssubstraat met glycol, werd overgegaan.

Sublimaat	Witte krist. verkregen bij een extractie van water zonder dioxaan.	Witte krist. verkregen bij een extractie van water met glycol.	Witte krist. verkregen bij een extractie van water en dioxaan.
Het neerslag werd met loog behandeld en eventueel aanwezig dioxaan afgedestilleerd en met broom aangetoond.			
<i>Geen gele naalden.</i> Na toevoegen van een spoor dioxaan aan het reactie mengsel en wederom destilleeren, wel gele naalden.	<i>Geen gele naalden.</i> Wel na toev. enz.	<i>Geen gele naalden.</i> Wel na toev. enz.	<i>Direct gele naalden.</i>

En ten slotte nog een extractie van dioxaan uit een liter pepton-water van 1 %, waaraan was toegevoegd: $\frac{1}{2}$ % keukenzout, 2 % glycol en 0,2 cm³. dioxaan; na het toevoegen van het dioxaan deden we er nog wat alcohol en azijnzuur bij en maakten het geheel alkalisch ten opzichte van lakmoes, kortom, we stelden een synthetisch gistingssubstraat samen.

Na acht uur extraheeren konden wij, op de aangegeven wijze, in een gedeelte van de witte kristalmassa, duidelijk dioxaan aantoonen.

Nadat de rest geheel in de dioxaanbroom-verbinding was omgezet, werden de zoo verkregen kristallen gemengd met die, welke uit zuiver dioxaan en broom gemaakt waren; het smpt. bleek nu 65—66° te bedragen, waarmede bewezen was, dat het inderdaad de dioxaanbroom-verbinding was.

Onderzoek naar de gevormde zuren.

De rest van de vloeistof, waaruit acetaldehyde en alcohol waren afgedestilleerd, zuurden we met verdund zwavelzuur aan tot congoroodpapier juist blauw kleurde, waarna de aanwezige zuren met stoom afgedestilleerd konden worden.

Na neutralisatie van het destillaat met loog, dampten we het op een waterbad in.

Mierenzuur.

Met de reactie van Sérulas⁴⁵): na aanzuren van 10 cm³ te onderzoeken vloeistof, HgO toevoegen en schudden, na affiltreeren van de overmaat HgO, verwarmen. De aanwezigheid van mierenzuur wordt gekenmerkt door een wit neerslag, dat zich allengs grijs tot donkergroen kleurt.

Microchemisch werd de ingedamppte vloeistof met ceriumnitraat op mierenzuur onderzocht.

Bij de door ons gebruikte stammen kon geen vorming van mierenzuur waargenomen worden.

Azijnzuur.

De aanwezigheid van azijnzuur bleek uit een positieve kakydylreactie. Een gedeelte van de geneutraliseerde oplossing damp-

ten we droog en verhitten daarna met watervrije soda en een weinig arseentrioxiede. In alle gevallen kon de onaangename reuk van het kakodyloxyde worden waargenomen.

Ten slotte werd in de zuur-destillatie-rest op barnsteen- en melkzuur gereageerd.

Barnsteen- en melkzuur.

Na neutralisatie met soda en indampen op een waterbad tot droog, zuurden we met ongeveer 2 cm³ 50 % zwavelzuur, gecontroleerd op congoroodpapier, aan en maakten het geheel met watervrij natriumsulfaat vast, om dan gedurende 8 uur in een Soxhletapparaat, de zuren met aether te extraheeren. Na afloop van de extractie werd de aether afgedestilleerd en het residu in 100 cm³ 96 % alcohol, opgenomen ⁴⁶).

Aan de kokende, alcoholische oplossing werd een gefiltreerde, koud verzadigde oplossing van bariumhydroxyde toegevoegd tot het bijgedruppeld phenolphthaleïne juist rood kleurde.

Na afzuigen van het neergeslagen bariumsuccinaat konden we het barnsteen- en melkzuur door zoutzuur in vrijheid stellen, en na verdampen van dit laatste, het voorzichtig boven een microvlammetje tegen een horlogeglas sublimeren, waarna het te identificeren was als lanthaan- of loodzout.

Eveneens gebruikten we de pyrol-reactie om de aanwezigheid van barnsteen- en melkzuur vast te stellen.

In een reageerbuisje dampten we voorzichtig de aangezuurde oplossing tot klein volumen in, voegden zink-stof toe en gloeiden; een in den mond van het buisje gehangen, met zoutzuur bevochtigd houtstofpapiertje, werd, bij aanwezigheid van barnsteen- en melkzuur, door het gevormde pyrol, licht- tot donkerrood gekleurd.

Melkzuur.

Het bovengenoemde filtraat dampten we in op een waterbad; vervolgens voegden we 10 % zwavelzuur toe, verwarmden dit, en druppelden 2 % kaliumpermanganaat-oplossing bij; bij aanwezigheid van melkzuur ontstond dan acetaldehyde, dat door de reactie van Rimini, (papiertje gedrenkt in oplossing van nitroprussidnatrium en piperidine) ⁴⁷) kon worden aangetoond.

Microchemisch werd het geïdentificeerd met behulp van zijn cobaltzout.

Niet vluchtige neutrale producten.

2.3. butyleenglycol.

We behandelden een gedeelte van het substraat met broom, terwijl met zonlicht of een sterke, elektrische lamp belicht werd; het eventueel gevormde diacetyl destilleerden we, na verwijdering van de overmaat broom met natriumsulfiet, af en toonden dit in het destillaat aan, door hierop de reeds boven beschreven reactie van Voges-Proskauer of de reactie met een nikkelzout, uit te voeren ⁴⁸⁾.

Een eosine-achtige roode kleur of het neerslag van dimethylglyoxim-nikkel bewezen de aanwezigheid van 2.3. butyleenglycol, dat in sommige gevallen kon worden aangetoond.

Semi-quantitatieve bepaling van acetaldehyde.

Aansluitend aan dit hoofdstuk en als overgang tot het volgende, waarin het quantitative onderzoek zal besproken worden, diene de beschrijving van het semi-quantitatieve onderzoek naar acetaldehyde.

Dit semi-quantitatieve onderzoek naar acetaldehyde diene niet alleen om een overzicht te verkrijgen van de acetaldehyde-productie van verschillende, tot de coli-typhus-groep behorende bacteriën, maar tevens bleek hiermede een zeer gevoelige methode verkregen te zijn om met behulp van de reactie van Rimini zelfs de kleinste spoortjes acetaldehyde, kwalitatief aan te toonen.

Het toestel was hetzelfde als gebruikt werd voor de quantitative bepaling van acetaldehyde en de quantitative bepaling van melkzuur, volgens de methode van Fürth en Charnasz in de modificatie van Friedemann en Kendall ⁴⁹⁾, welke methode ten slotte eveneens berust op een quantitative acetaldehyde-bepaling. Dit toestel bestaat uit een rondbodem van pyrex-glas van 200 cm³ inhoud met een vrij wijde hals, de kolf wordt gesloten met een stop met drie doorboringen; door de eerste gaat een nauw, tot op den bodem der kolf reikend, rechthoekig omgebogen buisje, door

de tweede de buis van een druppel-trechter en door de derde een betrekkelijk wijde buis, die onder de stop uitmondt en van een mantel, waarin water kan stroomen, omgeven is, zoodat het geheel als koeler werkt. De lengte van het koelend gedeelte bedraagt ongeveer 25 cm. Het bovineinde van den koeler wordt door middel van een tweemaal rechthoekig omgebogen buisje (waarvan het einde in een slijpstuk overgaat) verbonden met een rechte buis, die in een punt uitmondt op den bodem van een wijdere buis (diameter $\pm 1\frac{1}{2}$ cm en ongeveer 50 cm lengte), welke laatste hier tot een bolletje is uitgeblazen.

De wijdere buis is door middel van een gummistop gesloten en door twee rechthoekig omgebogen buisjes, die door een slijpstuk met elkander vereenigd zijn, met een tweede, wijdere buis, gelijk aan de eerste, verbonden. De invoer reikt wederom tot den bodem. De tweede wijdere buis is eveneens met een gummi-stop gesloten, waarin nog een rechthoekig omgebogen buisje steekt, ter afvoer van de spoel-stikstof. Bij het doorvoeren van stikstof werd vaak last ondervonden, doordat de stikstof-bellen niet regelmatig door de vloeistof, waarmede de wijdere buizen gevuld waren, borrelde, doch stootsgewijze doorgingen; om dit euvel te ondervangen werd het afvoerbuisje door middel van een gummi slangetje verbonden met een glazen buis, die op den bodem van een met water gevulde maatcilinder, van b.v. 250 cm³, uit kwam. Door nu het slangetje met een schroefklemkraantje gedeeltelijk dicht te knijpen, kon de stikstofstroom zoodanig geregeld worden, dat er regelmatig enkele kleine bellen opstegen. Ten slotte werd de druppeltrechter nog met een, door een schroefklemkraantje afsluitbaar slangetje, aan de stikstof-toevoer-leiding verbonden, opdat in dezen trechter dezelfde druk, als in het geheele toestel, zou heerschen.

Voor de semiquantitatieve acetaldehyde-bepaling werden de wijdere buizen elk gevuld met een oplossing van 5 cm³ 4 % nitroprussidnatrium, waaraan even vóór het gebruik 10 cm³ 3 % piperidine-oplossing was toegevoegd.

Voor de bepaling van acetaldehyde bij de gewone gistingen werd een zekere hoeveelheid van het substraat in het kolfje gebracht en stikstof doorgeleid; om het acetaldehyde af te destil-

leeren, vingen we na 10 min. aan met de vrije vlam te verwarmen, zoodat de inhoud zacht kookte.

Bij de sulfiet-gistingen werd het substraat eveneens in den rondbodem gebracht, maar nu lieten we uit den druppeltrechter 20 cm³ 20 % bariumchloride-oplossing toevloeden, bovendien was aan het substraat (zoo niet reeds aanwezig), wat krijt toegevoegd, om het acetaldehyde uit de sulfiet-verbinding in vrijheid te stellen.

Het acetaldehyde, door den stikstofstroom medegenomen, kleurde de nitroprussidnatrium-oplossing, al naar gelang van de gevormde hoeveelheid acetaldehyde, groen tot blauw.

Was een spoor acetaldehyde aanwezig, dan zag men alleen in de binnenbuis aan het oppervlak van de op en neer gaande vloeistof-kolom, een blauw wolkje optreden, dat scherp afstak tegenover de omringende geel gekleurde vloeistof.

Meer acetaldehyde manifesteerde zich door een groenkleuring van den geheelen buis-inhoud, reeds quantitatief te bepalen hoeveelheden acetaldehyde kleurden den buis-inhoud blauw, terwijl nog grootere hoeveelheden, deze geheel ondoorzichtig maakten.

Daar steeds het acetaldehyde in de eerste buis geheel geabsorbeerd werd, bleef de inhoud van de tweede buis zijn gele kleur behouden; hierdoor kon een kleuromslag goed worden waargenomen.

Wij gingen met koken door, totdat de kleur niet meer veranderde.

HOOFDSTUK V.

QUANTITATIEF ONDERZOEK NAAR DE VERGISTINGS- PRODUCTEN.

Overtuigd van de moeilijkheden, die zich zouden kunnen voordoen bij het quantitative onderzoek van de bij de gisting ontstane producten, — welke moeilijkheden werden veroorzaakt, zoowel door het optreden van verschillende vergistingsproducten, als door de aanwezigheid van pepton in het gistingssubstraat, — werd het quantitative onderzoek aangevangen met de bepaling van de hoeveelheden van de te verwachten stoffen, elk afzonderlijk en in bekende concentratie in water opgelost. Vervolgens werden mengsels van meerdere dezer stoffen quantitatief onderzocht, om ten slotte over te gaan tot het analyseeren van deze mengsels in een oplossing die 1 % pepton bevatte.

Nadat met het analyseeren van deze synthetische gistingssubstraten voldoende inzicht en routine was verkregen, werden de uitgegiste vloeistoffen onderzocht, volgens de hieronder nader beschreven methodes.

Bepaling van het oorspronkelijk aanwezige en van het na gisting overgebleven glycol.

Veelal worden verbindingen zooals glycol, bepaald, door de, op deze stof te onderzoeken oplossing, voorzichtig in te dampen en vervolgens onder toevoeging van zand, het residu te extraheeren met aether of aceton, het extractie middel te verdampen en het glycol na droging te wegen ⁵⁰).

Bezwaren, aan deze methode verbonden, zijn:

- 1e. Tijdens het indampen kan er een weinig glycol verdampen.
- 2e. Men extraheert tevens andere stoffen uit het substraat, welke men dus mede als glycol bepaalt.
- 3e. Een groote moeilijkheid bij deze methode levert de sterk

water-aantrekkende werking van glycol op, waardoor dus steeds te veel glycol gevonden zal worden.

Behalve de bovengenoemde bezwaren, komt hier nog het groote tijdiverlies door indampen en extraheeren bij.

Ons scheen derhalve een directe bepaling van het glycol in het gistingssubstraat, verreweg de voorkeur te verdienen.

Le Fèvre heeft ook getracht het te bepalen door oxydatie met permanganaat in alkalisch milieu en het niet verbruikte permanganaat, na aanzuren, terug te titreeren. Volgens hem gelukte deze methode niet door de kleine concentratie van het glycol in de oplossing, waardoor hij bijna geen verschil vond tusschen een 1 % glycol-oplossing en een blanco peptonwater-oplossing.

Daar hij echter niet eerst het pepton verwijderde, alvorens tot oxydatie over te gaan, is het mogelijk, dat hieraan zijn negatief resultaat te wijten is.

Wij kozen nu de oxydatie van glycol⁵¹), tot koolzuur door middel van kaliumpermanganaat in zuur milieu, het CO₂ werd dan door weging bepaald.

Deze nieuwe methode moest allereerst op haar betrouwbaarheid getoetst worden.

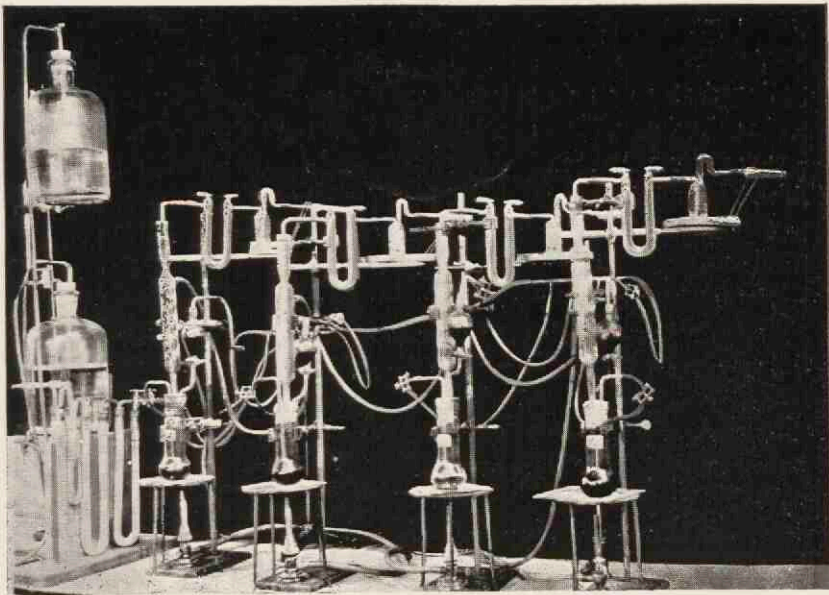
De gebruikte apparatuur bestond uit een zgn. vet-extractie kolfje, afgesloten door een rubber stop met drie doorboringen. In deze gaten staken: een opstaande koeler, een rechthoekig omgebogen buisje (van voldoende lengte, om den bodem van de kolf te bereiken) en een druppeltrechter. Het bovineinde van den koeler werd, onder tusschenvoeging van een U-vormige, van twee kranen voorziene, chloorcalciumbuis, met een kaliapparaatje verbonden. Nadat de chloorcalciumbuis gevuld was, verzadigden we den inhoud met koolzuur, waarna door een koolzuur-vrije-luchstroom, het overmatige gas verdreven werd.

Door het omgebogen buisje leidden we koolzuur-vrije-lucht in en verbonden de luchtleiding eveneens met de opening van den druppeltrechter (waarin zich een kaliumpermanganaat-oplossing bevond), waardoor de druk op deze oplossing gelijk was aan die, welke in het geheele toestel heerschte.

Het geheel was boven een brander opgesteld.

Voor de oxydatie van 1 g glycol is 5,0938 g KMnO₄ en 4,7421

Batterij van vier toestellen voor glycol-bepaling.



Links flesschen voor het doorpersen van lucht; aansluitend een, in duplo, uitgevoerde luchtreinigingsinstallatie; vervolgens de vier oxydatie-toestellen met bovenaan de U-vormige, van kranen voorziene, chloorcalciumbuisjes, waarmede de kali-apparaatjes zijn verbonden.

g H_2SO_4 noodig, er ontstaat dan 1,4185 g CO_2 ; om dit te binden is theoretisch 3,6257 g KOH noodzakelijk. Teneinde voldoende zekerheid te hebben, dat al het koolzuur werd vastgelegd, gebruikten we 130 cm^3 50 % KOH oplossing per g glycol; dit vertegenwoordigt 18 keer de theoretische hoeveelheid; zooals dan ook bleek, kon dezelfde vulling voor twee bepalingen gebruikt worden.

We maakten de volgende standaardoplossingen; KMnO_4 oplossing 60 g per liter, H_2SO_4 oplossing 500 g per liter, en verder, om de reactie's en methode te kunnen bestudeeren, en ook om de apparatuur te kunnen controleeren, een glycol-oplossing, die 20,125 mg watervrije glycol per cm^3 bevatte.

5 cm^3 van deze standaard oplossing komt overeen met $5 \times 20,125 \text{ mg} = 0,100625 \text{ g}$ glycol.

Bij de bepalingen werd zooveel mogelijk van deze hoeveelheid uit gegaan daar we gebonden waren aan de afmetingen van de gebruikte kaliapparaatjes. Hiervoor was dikwijls eerst een oriënteerende bepaling noodzakelijk.

0,100625 g glycol komt overeen met 0,1427 g CO_2

$$\lg 0,100625 = 00271$$

$$\text{mol.gew. glycol} = 62,0478 \quad \lg = 79272$$

$$\text{mol.gew. CO}_2 = 88 \quad \lg = 94448$$

$$0,100625 \text{ g glycol geeft } \frac{88 \cdot 0,10063}{62,047} = 0,1427 \text{ g CO}_2$$

Voor het berekenen van de verkregen resultaten gebruikten we den hieronder vermelden factor:

$$a \text{ g CO}_2 = x \text{ g glycol}$$

$$88 : a = 62,047 : x$$

$$\frac{a \cdot 62,047}{88} = x \quad \text{fact.} = \frac{62,047}{88} = 0,70508 \quad \lg = 84824$$

Bepaling:

1. Uitgegaan van 5 cm³ standaard glycol-opl. = 0,10063 g glycol
 Gevonden gewicht koolzuur 0,1279 g CO₂
 84824
 10687

 95511 hieruit berekend glycol 0,09018 g d.i. 89,62 %
 teruggevonden.
2. Voor 5 cm³ standaard glycol-opl. werd gevonden 0,1195 g CO₂
 84824
 07737

 92561 hieruit berekend glycol 0,0843 g d.i. 83,73 %
 teruggevonden.
3. Voor 5 cm³ st.d. glycol-opl. 0,1301 g CO₂
 84824
 11428

 96252 hieruit berekend glycol 0,0917 g d.i. 91,16 %
 teruggevonden.
4. Voor 5 cm³ st.d. glycol-opl. 0,1425 g CO₂
 84824
 15381

 00205 hieruit berekend glycol 0,1005 g d.i. 99,85 %
 teruggevonden.
5. Voor 5 cm³ st.d. glycol-opl. 0,1417 g CO₂
 84824
 15137

 99961 hieruit berekend glycol 0,0999 g d.i. 99,29 %
 teruggevonden.

Uitvoering van de methode:

Uit bovenstaande berekeningen, waarvan de gegevens verkregen werden door de bepaling op verschillende wijze uit te voeren, b.v. door het zwavelzuur direct aan de glycol-oplossing, of een gedeelte van genoemd zuur aan het bij te druppelen kaliumpermanganaat, toe te voegen, mede door de tijden van doorspoelen,

reactie, en wederom doorspoelen te veranderen, werd de volgende werkwijze, als de beste resultaten gevende, gekozen:

In de kookkolf bevond zich de glycol-oplossing, waaraan 10 cm³ standaard zwavelzuur-oplossing was toegevoegd. Onder verwarming leidden we gedurende 15 minuten koolzuur-vrije-lucht door het apparaat.

Vervolgens werd gedurende ongeveer 20 minuten 25 cm³ standaard kaliumpermanganaat, waaraan eveneens 10 cm³ standaard zwavelzuur-oplossing was toegevoegd, bijgedruppeld, onderwijl werd de temperatuur tot zacht koken der vloeistof opgevoerd. Eerst ziet men de druppels permanganaat snel ontkleuren, dan gaat dit steeds langzamer, waardoor men goed het verloop van de reactie kan volgen. Duidelijk ziet men, na verloop van eenigen tijd, koolzuur-ontwikkeling optreden. Nadat al het kaliumpermanganaat was toegevoegd werd nog gedurende ongeveer één uur een koolzuur-vrije luchtstroom doorgeleid en de vloeistof even aan de kook gehouden; door goede koeling en een voorgeschakelde chloorcalciumbuis werd voorkomen, dat waterdamp in het kali-apparaatje kon dringen. Na afloop werd het opgenomen koolzuur, door weging van het kali-apparaatje, bepaald.

Volgens deze methode verkregen we de uitkomsten 4 en 5.

Quantitatieve bepaling van glycol, opgelost in peptonwater.

Vóór de oxydatie verwijderden we het pepton door het neer te slaan met phosphor-wolfraamzuur.

Aan 4 cm³ van een standaard glycol-pepton-oplossing, bevattende 1,3053 g glycol per 50 cm³ peptonwater = 0,026106 g per cm³. en 0,025 g pepton per cm³, werd 40 cm³ van een phosphor-wolfraam-zuur-oplossing (5 g per liter bevattend) toegevoegd. Het ontstane neerslag werd gecentrifugeerd, vervolgens de vloeistof afgeschonken en gefiltreerd, terwijl het neerslag goed uitgewasschen en telkens de vloeistof ter dege afgezogen en bij het vorige filtraat gevoegd werd.

In de zoo voorbereide oplossing bepaalden we het glycol door oxydatie met kaliumpermanganaat.

Uitgegaan van 0,1048 g glycol.

Gevonden gewicht koolzuur 0,1516 g

84824

18070

02894 hieruit berekend glycol 0,1069 g d.i. 104,37 %

teruggevonden.

Deze werkwijze leverde nog geen bevredigend resultaat op.

1e. Werd, waarschijnlijk door verdamping van water tijdens het afzuigen, te veel glycol gevonden.

2e. Nam het filtreren zeer veel tijd in beslag.

Om deze twee redenen werd de methode als volgt veranderd:

Aan 25 cm³ van de, glycol bevattende, pepton-oplossing 10 cm³ (zowel de 25 cm³ als de 10 cm³ werden nauwkeurig afgepipetteerd) van een 5 % phosphorwolfraamzuur-oplossing (50 g phosphorwolfraamzuur, 970 cm³ water, 30 cm³ geconcentreerd zwavelzuur⁵²), toevoegen. Na een paar uur staan door een vouwfilter filtreren en van de zoo verkregen heldere oplossing, 5 cm³ voor elke glycol-bepaling nemen.

Op deze wijze werd 99,87—99,43 % van het glycol, teruggevonden.

Bepaling van glycol in het gistings-substraat.

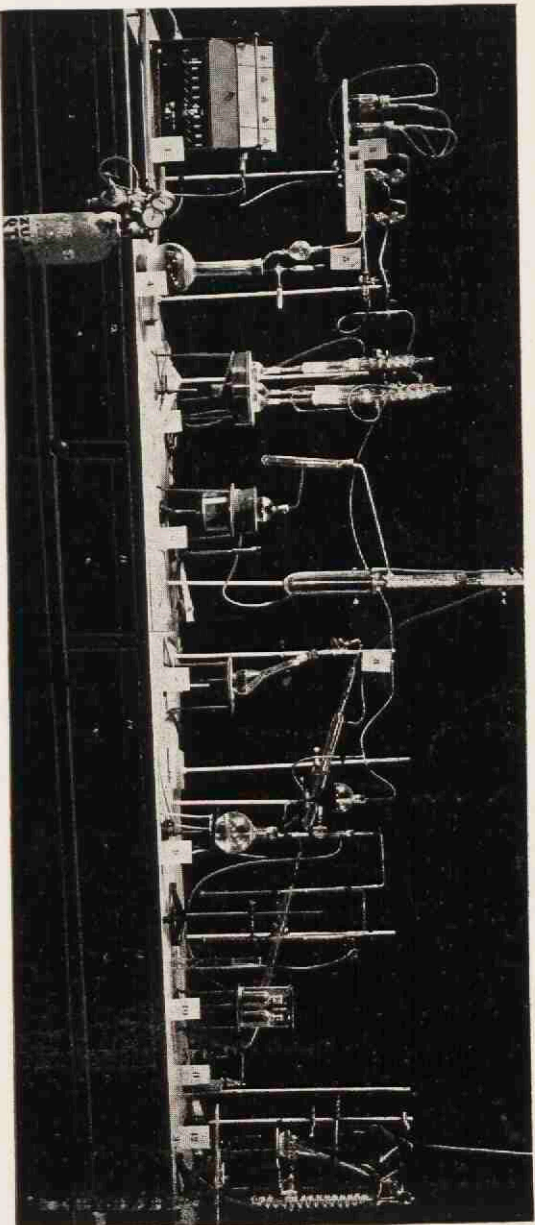
Uit de volgende proeven was gebleken, dat glycol met waterdamp, nog betrekkelijk vluchtig was.

3,9775 g glycol werd opgelost in 250 cm³ water. Door deze oplossing leidden we stoom tot 1 l. was afgedestilleerd. In de kolf was toen 121 cm³ achter gebleven, die wij aanvulden tot 250 cm³. Van deze oplossing werd 10 cm³ voor de glycol bepalingen genomen, terwijl hiervoor van het destillaat 100 cm³ gebruikt werd. Het bleek toen, dat er van 5,03 tot 6,70 % glycol over gegaan was, terwijl we in totaal 98,32—98,84 % glycol terug vonden.

Daarom werd het azijnzuur vóór de glycol bepaling niet afgestoomd.

Uit 40 cm³ van het gistings-substraat werden de aanwezige hoeveelheden acetaldehyde en alcohol verwijderd door ongeveer $\frac{3}{4}$ van het volumen af te destilleeren, opnieuw aan te vullen met water en weer $\frac{3}{4}$ af te destilleeren.

Analyse apparatuur.



1. Reductie-oven.
2. Controle-apparaat.
3. Bus met steriele watten-prop voor het tegenhouden van bacteriën uit de stikstof.
4. Vergistingsvat.
5. Niet-vluchtige-zuren-extractie.
6. Dioxaan-extractie.
7. Alkohol-destillatie.
8. Stikstof-leiding.
9. Acetaldehyde- en melkzuur-bepaling.
10. Alkohol-oxydatie.
11. Schroefwasmachines voor het tegenhouden van alcohol.
12. Stoomdestillatie der vluchtige-zuren.

Het residu vulden we weer nauwkeurig aan tot 40 cm³ ; op deze wijze destilleerden slechts sporen glycol mee over.

In het zoo voorbereide substraat was dus nog het ontstane azijnzuur aanwezig. Er werden nu de volgende proeven genomen, om te constateeren of het mogelijk was glycol direct naast azijnzuur te bepalen.

Aan een oplossing, welke 0,0923 g azijnzuur per 5 cm³ bevatte, werd bij deze hoeveelheid 10 cm³ standaard-zwavelzuur-oplossing gevoegd en onder verwarmen 25 cm³ std. kaliumpermanganaat-opl. + 10 cm³ standaard-zwavelzuur-opl. bijgedruppeld. Wij vonden een gemiddelde van 0,0011 g CO₂; dit komt overeen met 0,8 % van het toegevoegde azijnzuur.

Om te zien of het azijnzuur soms door de doorstroomende lucht werd meegevoerd, verwarmden we 5 cm³ van bovenstaande azijnzuur-oplossing met 10 cm³ st.d. zwavelzuur-opl., doch zonder kaliumpermanganaat-opl., maar wel aangevuld met 35 cm³ water en leidden, gedurende denzelfden tijd als bij de vorige proef, koolzuur-vrije-lucht door. Het gewicht aan koolzuur bleek nu 0,0009 g te bedragen, een hoeveelheid, welke ook als gemiddelde gevonden was bij de blanco-proeven, genomen ter controle van de apparatuur en welke tevens in de orde van grootte lag, die wij verkregen bij de oxydatie van azijnzuur. Hieruit blijkt wel, dat het zeer goed mogelijk is, het glycol direct naast het azijnzuur te bepalen.

Nu werd, zooals boven beschreven, het pepton verwijderd door 25 cm³ van deze oplossing af te pipetteeren, hieraan 10 cm³. phosphorwolfraamzuur toe te voegen en na een paar uur af te filtreeren. Van het filtraat namen we 5 cm³ voor elke glycol-bepaling, welke in duplo werd uitgevoerd, zooals eerder beschreven is.

Het kali-apparaatje wogen we vóór en na de oxydatie en berekenden uit het gewichtsverschil de hoeveelheid glycol.

Acetaldehyde-bepaling.

Vóór dat wij tot bepaling van de gistings-producten overgingen leidden we ged. ½ uur, nog warm uit de broedstoof, zuur-

stof-vrije-stikstof door, terwijl het opvangapparaat nog aangesloten was. Hierdoor werd het, eventueel niet in het substraat opgeloste, acetaldehyde uitgedreven en in de bisulfiet-opl. vastgelegd. Dan openden we de kolf en pipetteerden 40 cm³ van het filtraat in een rond-bodem, deze rondbodem *) daarna met behulp van een gummistop aan een opstaanden koeler bevestigend, welke koeler met een glazen buisje verbonden was aan de opvang-toestellen, bestaande uit twee 45 cm lange buizen met ongeveer 1 cm doorsnede van onderen verwijd tot een bolletje, waarin de inleidbuisjes met een uitgetrokken punt uitmondten. De twee buizen waren achter elkaar geschakeld. In elke buis bevond zich ongeveer 20 cm³ 1 % bisulfiet-oplossing. Nu werd gedurende 30 minuten een langzame, zuurstofvrije stikstofstroom door het toestel geleid, terwijl de vloeistof zacht kookte. Alle aanwezige acetaldehyde bleek dan vastgelegd te zijn in de bisulfiet-oplossing, zooals bij de volgende proeven waargenomen was.

In een oplossing van acetaldehyde in peptonwater bepaalden we direct het acetaldehyde-gehalte in 40 cm³ van deze oplossing, terwijl ook 40 cm³ op bovenstaande wijze behandeld en vervolgens het acetaldehyde-gehalte van de bisulfiet-oplossing, vastgesteld werd.

De oorspronkelijke opl. bevatte 3,15 mg per 40 cm³ Na destillatie vonden we 3,13 mg per 40 cm³ d.i. 99,36 %.

Na het afdestilleeren van het acetaldehyde werd de 40 cm³ aan een destillatie, zooals beschreven voor glycol ter verwijdering van de alcohol, onderworpen en, na het volumen weer op 40 cm³ gebracht te hebben, de glycol-bepaling met deze vloeistof uitgevoerd.

Ter bepaling van het acetaldehyde kozen wij de methode, die door Theodore E. Friedemann en Arthur I. Kendall ⁴⁰⁾ uitgewerkt is voor het ontwikkelde acetaldehyde uit melkzuur.

Wij weken in zooverre van genoemd voorschrift af, dat wij niet den inhoud van beide buizen verzamelden, doch van elke buis afzonderlijk het acetaldehydegehalte bepaalden; in de tweede buis vonden we geen of nagenoeg geen acetaldehyde, aldus de absorptie van het acetaldehyde controleerend. Wij voegden 2½ cm³

*) Zie blz. 38.

2 % stijfse oplossing toe en titreerden met 1/10 N jodiumoplossing tot even blauwkleuring, waardoor het niet gebonden bisulfiet werd weggenomen; na deze kleine overmaat jodium met een druppel 1/10 N thiosulfaat-oplossing verwijderd te hebben, riepen we met 1/100 N jodiumoplossing de blauwe kleur weer *juist* te voorschijn en voegden 25 cm³ verzadigde natriumbicarbonaatoplossing toe, waardoor het (aan acetaldehyde gebonden bisulfiet), in vrijheid werd gesteld en titreerden dit bisulfiet met een 1/100 N oplossing van jodium, totdat de blauwe kleur, welke één minuut moet blijven bestaan, juist zichtbaar was.

Uit de volgende berekening blijkt, dat 1 cm³ 1/100 N jodiumoplossing, overeen komt met 0,00022 g acetaldehyde. Nu komt 1 mg mol. jodium overeen met 1 mg mol. acetaldehyde en dus 1 cm³ 1/100 N J₂ opl. met 1/200 mg mol. acetaldehyde.

$$M \text{ acetaldehyde} = 44,03$$

1 cm³ 1/100 N jodiumopl. komt dus overeen met

$$\frac{1 \times 0,01 \times 44,03}{2 \times 1000} = 0,00022 \text{ g acetaldehyde.}$$

Deze titratie heeft tot nadeel, dat zij langzaam afloopt en het acetaldehyde-gehalte te laag gevonden wordt, nl. ongeveer 1 %, ten opzichte van de, volgens Ripper⁵⁴⁾ uitgewerkte en door Kolt-hoff, verbeterde acetaldehyde-titratie.

Toch meenden wij de titratie volgens Friedemann en Kendall te moeten verkiezen, daar deze eenige voordeelen bood: 1e. Gingen de bepalingen sneller, doordat de bisulfiet-oplossing niet vooruit gesteld behoefde te worden; 2e. en dit is zeker wel het grootste voordeel, stelde deze methode ons in staat direct het acetaldehyde te bepalen in de tijdens de gistingen voorgelegde bisulfiet-oplossing van de opvang-apparaatjes. Deze bisulfiet-oplossing verbleef, gedurende 14 dagen of langer, in de broedkamer bij een temperatuur van 37°; het was dus zeker, dat een gedeelte geoxydeerd werd door de zuurstof uit de lucht, zoodat een vooraf stellen van deze oplossing geen zin had. Wij zouden dus eerst het opgevangen acetaldehyde uit deze vloeistof hebben moeten vrij maken en vervolgens in een gestelde bisulfiet-oplossing destilleeren.

Als derde voordeel kan nog worden genoemd, dat wij dadelijk — na de vrij ruwe titratie met 1/10 N jodiumoplossing, om de overmaat bisulfiet weg te nemen —, door het blijven bestaan van de blauwe kleur, na toevoeging van de verzadigde bicarbonaat-oplossing, konden waarnemen, dat er geen acetaldehyde aanwezig was.

De kleine fout achtten wij in dit geval van niet zoo'n groot belang, daar hij toch weinig afbreuk aan de resultaten der analyses deed.

Bij het opwerken der sulfiet-gistingen voegden we, door middel van een druppeltrechter, 20 cm³ verzadigde bariumchloride-oplossing toe ten einde het acetaldehyde in vrijheid te stellen.

Zoo noodig was bij het substraat reeds te voren wat krijt gedaan.

Azijnzuur-bepaling.

Van het gefiltreerde substraat namen we 100 cm³. en maakten het met wat soda alkalisch. Dan werd ongeveer $\frac{3}{4}$ afgedestilleerd; vervolgens weer aangevuld met water en wederom afgedestilleerd.

Het destillaat gebruikten we voor de alcohol-bepaling.

Uit het residu, — nadat dit voorzichtig op congoroodpapier met verdund zwavelzuur aangezuurd was — stoomden we de vluchtige zuren over, totdat 1½ l. was overgedestilleerd. Het was noodzakelijk om dit vrij groote volumen over te stoomen, ten einde zeker te zijn, dat al het gevormde zuur meekwam.

Voor dit volumen moest een correctie aangebracht worden, door, van de bij de titratie gevonden waarden, 3,76 cm³ 0,1 N loog af te trekken ⁵⁵⁾ want wij titreerden het geheele volumen tegelijkertijd op de aanwezige vluchtige zuren. Een groot bezwaar vonden wij, dat dit getal lang niet constant bleek te zijn, ook leverde de titratie van deze groote hoeveelheid, moeilijkheden op. Om deze redenen sloegen we den volgenden, reeds door Olmsted ⁵⁶⁾ aangegeven weg in voor de destillatie der vluchtige zuren. Aan het zuur gemaakte substraat, voegden we zooveel magnesiumsulfaat toe, dat de oplossing bij verwarming nog verzadigd bleef; stoomden

vervolgens de vluchtige zuren over, vingen dan het destillaat in fracties van 250 cm³ op en titreerden elke fractie afzonderlijk met 0,1 N loog op phenolphthaleïne; meestal begonnen we na de vierde fractie voor deze titratie een constant getal te vinden van ongeveer 1 cm³ 0,1 N loog en beschouwden dan de destillatie als afgelopen.

Vanzelfsprekend werden de, voor de verschillende fracties gevonden getallen, bij elkaar opgeteld om de totaal aanwezige hoeveelheid vluchtig zuur te leeren kennen. Ten slotte trokken wij nog voor elke fractie, waarin zich zuur bevond, 0,9 cm³ 0,1 N loog, ter correctie, af.

Wij vonden bij deze vergistingen geen mierenzuur, zoodat de gevonden waarden direct de hoeveelheid gevormd azijnzuur aangaven.

Alleen bij de vergisting van glycol met natriumformiaat-toevoeging, kwam wel een mierenzuurbepaling in het geding; deze bepaling voerden wij uit volgens de methode van Fincke⁵⁷), welke berust op de reductie van sublimaat tot calomel door het mierenzuur. Het geneutraliseerde destillaat werd ingedampd tot op 50 cm³ en hieraan toegevoegd 10—50 cm³ (al naar gelang van te verwachten hoeveelheid mierenzuur) van een oplossing in water, van 10 % HgCl₂, 3 % NaCl en 4 % natriumacetaat, twee uur op waterbad verwarmd, vervolgens warm, door een, te voren gewogen, glazen filter gefiltreerd en het gevormde neerslag achtereenvolgens uitgewasschen met water, alcohol en aether en gedurende één uur bij 100° gedroogd.

Door wegen laat zich het gewicht aan gevormd calomel bepalen; het gevonden getal vermenigvuldigd met 0,0977 geeft de hoeveelheid aanwezig mierenzuur aan. Dit getal van de totaal gevonden hoeveelheid zuur afgetrokken, doet ons het gewicht aan gevormd azijnzuur kennen.

De azijnzuur-bepaling heeft een fout van 2—3 %, voor de mierenzuur-bepaling is dit ongeveer 4 %.

Bepaling van de niet-vluchtige-zuren.

Het residu van de voorgaande stoomdestillatie, maakten we alkalisch en dampden het, tot bijna droog, op een waterbad in.

Na aanzuren op congoroodpapier met 50 % zwavelzuur (3—6 cm³) roerden we de massa met watervrij natriumsulfaat goed dooréén, tot een vrijwel vaste massa was verkregen, waarop nog minstens 12 uur staan in een exsiccator volgde, tot het geheel goed droog en korrelig was geworden; zoo noodig werd het in een mortier fijn gewreven en in een Soxhlet met drogen aether, gedurende acht uur geëxtraheerd. Na verdampen van den aether, namen we in water op, vulden tot 100 cm³ aan en filtreerden de harsachtige producten af.

Eventueel aanwezige, niet-vluchtige-zuren, moeten zich dan in deze oplossing bevinden; de hoeveelheid werd bepaald door 25 cm³ dezer oplossing, (na toevoeging van een paar druppels phenolphthaleïne) even te koken ter verwijdering van koolzuur en dan een bekende hoeveelheid, doch overmaat, 0,1 N loog, bij te laten loopen; wederom te koken — ten einde het melkzuur-lacton in melkzuur om te zetten, — om vervolgens de niet verbruikte loog met 0,1 N zoutzuur terug te titreeren.

In het residu konden meestentijds geen noemenswaardige hoeveelheden zuur gevonden worden, dus waren in die gevallen bij de vergisting geen niet-vluchtige-zuren gevormd.

Bij enkele gistingen werden ze echter wel aangetroffen; dit wordt nog daar ter plaatse nader beschreven; hier zij alleen de bepaling van deze zuren genoemd.

Melkzuur-bepaling.

Voor deze bepaling vervingen wij de pyrex-kolf van 200 cm³ door één van 500 cm³ in het reeds, bij de semi-quantitatieve en quantitatieve bepaling van acetaldehyde, beschreven toestel *) en bepaalden het melkzuur volgens de methode van Friedemann en Kendall ⁴⁹). In de pyrex-kolf voegden we aan 25 cm³ van de boven verkregen oplossing der niet-vluchtige-zuren, 5 cm³ 6 N phosphorzuur, 20 cm³ 10 % mangaansulfaat-oplossing, 100 cm³ gedestilleerd water en een mespuntje talk toe. Stikstof werd doorgeleid en de vloeistof tot zacht koken verwarmd.

*) Zie deze diss. pag. 38 en 48.

Uit den druppeltrechter lieten we langzaam een 1/100 N kaliumpermanganaat-oplossing bijdruppelen en gingen hiermede door totdat de bruine kleur van overmaat MnO_2 minstens een kwartier bleef bestaan, waarna nog, gedurende een half uur, stikstof werd doorgeleid om het ontstane acetaldehyde quantitatief in de bisulfiet-oplossing te spoelen; om dan vervolgens deze oplossing op de reeds beschreven wijze te titreeren. De gevonden waarde, uitgedrukt in cm^3 1/100 N jodiumoplossing, vermenigvuldigd met 0,00045 gaf het gewicht aan melkzuur weer; dit, afgetrokken van de totale hoeveelheid niet-vluchtig-zuur, deed ons het gewicht aan barnsteenzuur kennen.

Alkohol-bepaling.

De, onder vluchtige-zuren vermelde, uit 100 cm^3 substraat, verkregen destillaten, werden samen gevoegd en met verdund zwavelzuur goed aangezuurd — ter binding van aanwezige vluchtige basen — en vervolgens gedestilleerd.

Bij alle destillaties, waarbij alcoholhoudend-destillaat overkwam, vingen wij dit onder een weinig water op, in een, door een twee maal doorboorde rubber stop afgesloten, maatglas; door de eene boring stak een rechthoekig omgebogen buisje, dat even onder de stop eindigde en het maatglas met een, met water gevuld, schroefwaschfleschje verbond; door het tweede gat ging een alonge tot op den bodem van het maatglas, dit met den langen koeler verbindend. Het maatglas en waschfleschje stonden in ijswater.

Na afloop der destillatie voegden we den inhoud van het waschfleschje, bij dien van het maatglas.

Om uit het destillaat, afkomstig van gistingen waarbij acetaldehyde ontstond, dit te verwijderen, volgden we eerst de methode van Gorr en Wagnet⁵⁸): het acetaldehyde wordt hierbij vastgelegd als een niet-vluchtig „mercarbide”.

Men voegt bij de acetaldehyde bevattende vloeistof, voor ieder g mol. acetaldehyde, zóóveel N of 2 N natronloog, als noodig is, om uit ongeveer 9/10 gedeelte van het toegevoegde sublimaat, kwikoxyde in vrijheid te stellen. Daarna wordt het mengsel, ge-

durende 5 uren, onder een krachtig werkenden terugvloekoeler, gekookt.

Vervolgens werd de alcohol afgedestilleerd en het destillaat aangevuld tot 200 cm³.

Het acetaldehyde zou onder deze voorwaarden quantitatief omgezet worden, terwijl de alcohol niet wordt ontleed.

Ons bleek echter, dat ook na herhaalde behandeling met kwik-oxyde, steeds nog een weinig acetaldehyde in het destillaat aanwezig was, hetwelk bij de door ons gevolgde methode van Northrop — voor de bepaling van het alcohol-gehalte, door middel van oxydatie — een te hooge uitkomst voor dit gehalte zou geven; desondanks vonden wij bedoelde waarde te laag, waarschijnlijk dus gaat een gedeelte van den alcohol te loor, hetzij door omzetting, hetzij door verliezen, die optreden bij het koken onder opstaanden koeler. We trachtten dit nog te ondervangen, door het boveneinde van den koeler, met een, in ijswater geplaatst, schroef-waschfleschje te verbinden en voor een goede sluiting van het toestel zorg te dragen, doch ook dit middel mocht niet baten. Het verdient hierbij nog opmerking, dat er bij deze gistingen zeer weinig alcohol gevormd werd.

Om deze redenen kozen wij een anderen weg, die ons betere resultaten opleverde, en bepaalden het acetaldehyde-gehalte van de alcoholische oplossing door middel van titratie, stelden vervolgens de hoeveelheden alcohol en acetaldehyde gezamenlijk vast, met de hieronder te beschrijven methode van Northrop⁵⁹), en vonden dan, door hiervan het acetaldehyde af te trekken, de hoeveelheid alcohol. Deze bepaling berust dus op een „verschilmethode” en is daarom niet fraai te noemen, toch gaf zij ons nog de beste resultaten.

In 10 cm³ alcoholhoudende-oplossing oxydeerden we de alcohol tot azijnzuur met 20 cm³ 2 N kaliumbichromaat-oplossing en 20 cm³ zwavelzuur van 50 % (beide hoeveelheden gepipetteerd), door dit mengsel gedurende drie kwartier in een goed sluitend drukfleschje, in een kokend waterbad te verwarmen.

Vervolgens werd de inhoud van het drukfleschje in een Erlenmeijer van 1 l. gespoeld en 300 cm³ gedestilleerd water toegevoegd; deze verdunning vergemakkelijkt het waarnemen van de

kleuromslag bij de titratie van het onverbruikte bichromaat, dat we, na toevoeging van 10 cm³ 20 procentige kaliumjodide-oplossing en wat stijfjel als indicator, met een 1/10 N thiosulfaat-oplossing bepaalden. Deze hoeveelheid bichromaat, afgetrokken van het, bij een blanco-bepaling gevonden bichromaat, uitgedrukt in cm³ 1/10 N thiosulfaat en vermenigvuldigd met 0,001151, leverde het alcoholgehalte op.

Deze, zoowel als de blanco-bepalingen, voerden we steeds in duplo en tegelijkertijd uit.

De fout is ongeveer 1—3 %.

Wanneer acetaldehyde aanwezig is, moet men van het gevonden thiosulfaat, nog aftrekken een hoeveelheid thiosulfaat, berekend naar het aantal cm³ 1/100 N jodium-opl., dat voor het acetaldehyde noodig was.

HOOFDSTUK VI.

INRICHTING DER VERGISTINGSPROEVEN.

In dit hoofdstuk zal de apparatuur en de wijze van uitvoering, welke bij de gisting zelf werden toegepast, besproken worden.

De vergistingen, welke voor kwalitatief onderzoek bestemd waren, werden ten deele in gistbuizen van 250 cm³ inhoud, ten deele in groote kultuurbuizen uitgevoerd.

Behalve in die gevallen, welke speciaal zijn aangegeven, werd een voedingsbodem van de volgende samenstelling gekozen:

Pepton Witte	1 %
keukenzout	$\frac{1}{2}$ %
krijt	2 %
glycol	2 %

Allereerst werd de vorming van gas, met behulp van gistbuizen onderzocht; het bleek, dat bij de vergisting van glycol geen gasen ontstonden, zoodat voor het kwalitatieve onderzoek gebruik gemaakt kon worden van groote kultuur-buizen, die na, voor de helft met bovengenoemden vloeibaren voedingsbodem gevuld te zijn, bij 110° gestereliseerd werden.

Na enting met de bacterie werd gedurende 10 dagen bebroed bij 37°.

Was het gewenscht de gisting onder anaërobe omstandigheden uit te voeren, dan verwarmden wij de kultuur-buizen na enting, tot 40° en plaatsten ze te zamen in een vacuum-exsiccator.

Deze exsiccator bestond uit een cilindrisch gedeelte, even hoog als de buizen en een helmvormig bovenstuk, dat van een ringvormige goot, welke met een alkalische pyrogallol-oplossing gevuld werd, voorzien was.

Door de exsiccator met een waterstraalluchtpomp te evacueeren tot 18 cm kwikdruk, kookte alle lucht uit de kultuur-vloeistof.

Vervolgens werd stikstof toegelaten en aan de reeds in de ringvormige goot aanwezige pyrogallol-oplossing, de benodigde

hoeveelheid natronloog toegevoegd; hierdoor werd een te vroeg-tijdige oxydatie van deze oplossing door de zuurstof der lucht, voorkomen. Het evacueeren en weder inlaten van stikstof herhaalden wij nog twee maal.

De laatste maal werd een klein vacuum tot ongeveer 60 cm kwik behouden, waardoor de exsiccator, nadat hij in de broedstoof op 37° was verwarmd, nog goed bleef sluiten.

Voor het opwerken der gistingen vulden wij dit vacuum weder met stikstof aan en openden de exsiccator; namen het aantal buizen, dat in ongeveer één uur tijds opgewerkt kon worden er uit, waarna de exsiccator, na wederom geëvacueerd te zijn, met stikstof gevuld werd.

Aan de gebruikte stikstof moest de grootst mogelijke zorg besteed worden om haar zuurstof-vrij te maken. Hiertoe leidden we het gas achtereenvolgens door twee buizen, die gevuld waren met rollen kopergaas. Beide buizen bevonden zich naast elkander in een brandenden gasoven.

Wanneer het kopergaas in de eerste buis door oxydatie zwart was geworden, reduceerden we het gaas in beide buizen alvorens het verder voor de reiniging van stikstof te gebruiken, zoodat steeds minstens één volle buislengte van gereduceerd kopergaas, beschikbaar bleef. Vervolgens werd de stikstof — door zeefplaatjes fijn verdeeld — twee-maal door een alkalische pyrogallol-oplossing geleid om dan een controle apparaatje, bestaande uit twee kleine waschfleschjes, te passeeren. Het vullen van de waschfleschjes geschiedde als volgt: een oplossing van pyrogallol in water werd even gekookt, waarna ze onder doorleiden van stikstof afkoelde; met deze oplossing vulden we de waschfleschjes en voegden — steeds stikstof doorleidende — een eveneens uitgekookte en onder stikstof bekoelde natronloog-oplossing, toe. Het voornaamste hierbij was, dat de vloeistof in het eerste waschfleschje van het controle apparaatje (gerekend van de zijde waar de gasstroom intrad) kleurloos of tenminste lichtbruin gekleurd bleef. Tijdens het gebruik van stikstof mocht deze oplossing dan ook niet donkerder van kleur worden.

Het behoeft geen betoog, dat de inhoud van het eerste waschfleschje — hoewel het tweede-, dat als zuurstof-slot moest die-

nen om tijdens het aansluiten van toestellen een binnendringen van luchtzuurstof in het eerste te voorkomen, deze functie goed na kwam — toch op den duur bruiner kleurde doordat een weinig lucht door slangen en verbindingen heen difundeerde. Een nieuwe vulling bracht dan alles weer in orde.

De quantitatieve gistingen werden uitgevoerd in een apparaat, bestaande uit een Erlenmeyer met een aangesmolten bol van ongeveer 100 cm³. Dit vat werd geijkt met een uitgewogen hoeveelheid water (b.v. 200 cm³) en het geheel zoodanig gekozen, dat de vloeistof-spiegel van dit water, zich in het vernauwde gedeelte van het apparaat bevond; hierdoor verkregen we later een groo-tere nauwkeurigheid bij het weder aanvullen met water, na afloop van de gisting.

Het bolvormige gedeelte neemt, bij uitzetting van de vloeistof of bij schuimvorming, beide op.

De door mij gebruikte apparaten werden vervaardigd uit een „Jena” rondbodern van 100 cm³ en een „Jena” Erlenmeyer van 200 cm³.

Het bolvormige gedeelte werd afgesloten met een tweemaal doorboorde gummi-stop, vastgehouden met behulp van een stropje van koperdraad.

In één doorboring stak een, op den bodern van het vat eindigende glazen buis, welke van boven een verwijd gedeelte, ter lengte van ± 7 cm en $1\frac{1}{2}$ —2 cm diam. had, waarin zich een watten-prop bevond. Door de andere doorboring ging een rechthoekig omgebogen buisje, precies onder de stop eindigende, eveneens van een dergelijke verwijding met watten-prop voorzien. De rechte buis werd afgesloten met een gummi-stop en het omgebogen buisje met behulp van een doorboorde gummi-kurk, aangesloten aan een opvang-apparaatje om eventueel ontwijkend acetaldehyde, tegen te houden. Dit apparaatje bestond uit drie, (door tus-schenkomst van dubbelomgebogen buisjes met bolletjes en twee-maal doorboorde gummi-stopjes), met elkaar verbonden buizen van ongeveer 50 cm³ inhoud.

De eerste buis bevatte water, de tweede en derde een verza-digde bisulfiet-oplossing.

De bolletjes voorkwamen, dat bij vermindering van den druk

in het gistingsvat, vloeistof uit het opvang-apparaatje in dit vat zou komen, en konden de in de buizen aanwezige vloeistof volumina, gemakkelijk bevatten. Het water in de eerste buis belette, eventueel uit de andere buizen ontwijkend zwaveldioxyde, in het gistingsvat te komen.

Vullen en enten van het apparaat.

200 cm³ voedingsbodem werden bij kamertemperatuur in het gistingsvat gepipetteerd, de vloeistofspiegel moet dan gelijk met den ijk-ring, in de vernauwing staan. We sloten het vat met de van buizen voorziene stop en bevestigden deze met een koperdraadje.

Het geheel werd bij 110° gestereliseerd; tijdens de sterilisatie zijn beide buizen alleen met een watten-prop gesloten.

Voor anaërobe gistingen namen wij het gistingsvat zoo warm mogelijk uit de autoclaaf en verbonden het met de opvang-apparaat om dan door de rechte buis steriele stikstof in te leiden.

Na bekoeling kon tot enten worden overgegaan; daartoe verwijderden we, na even flambeeren van het bovineinde van de rechte buis, de watten-prop en brachten door deze buis een bacterie-emulsie in het vat (tijdens deze manipulatie werd de verbinding met de opvang-inrichting verbroken om een wegvloeiën van de bacterie-emulsie te vergemakkelijken). Na flambeeren brachten we de watten-prop weer op haar plaats en verbonden de buis met de stikstof-leiding; nadat het opvang-apparaatje aangesloten was werd nog gedurende eenigen tijd stikstof doorgeleid en vervolgens na afsluiting met een gummi-stop, het toestel in een broedstoof of broedkamer geplaatst.

Voor het opwerken lieten we de geheele apparatuur tot kamertemperatuur afkoelen en vulden daarna, zoo noodig, met steriel water aan, tot de vloeistofspiegel wederom gelijk met den ijk-ring stond.

Apparaat voor de gistingen met successieve pepton-toevoegingen.

Voor deze vergistings-proeven gebruikten we als gistingsvat een mengcilinder van één liter inhoud met verdeling; hierop was,

met behulp van een driemaal doorboorde gummi-stop, een cilindervormige opzet, met een inhoud van 200 cm^3 en een verdeeling van 10 cm^3 , bevestigd, door de aangesmolten kraan in de eerste boring van de stop te steken, tot het uiteinde er even buiten stak. Boven aan den opzet was wederom een $1\frac{1}{2}$ —2 cm wijde buis gesmolten, welke een watten-prop bevatte; tevens was aan dit einde een zijbuis bevestigd, die door de tweede doorboring van de stop ging en aldus veroorloofde, dat het gas in den mengcilinder de uit den opzet wegvloeiende pepton-oplossing, kon vervangen. Het verdient aanbeveling om in deze buis eveneens een watten-prop aan te brengen, om infectie — welke ons bleek mogelijk te zijn — van den voedingsbodem, in den opzet, vanuit het gistingvat te voorkomen. Door de derde boring stak een, even onder de stop eindigend, rechthoekig omgebogen buisje met verwijding voor watten-prop, hetwelk de verbinding vormde met het reeds boven beschreven opvang-toestelletje voor acetaldehyde.

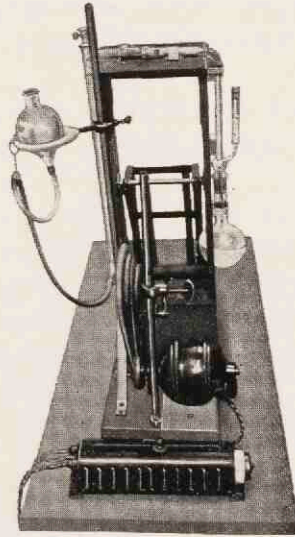
Voor het enten en stikstof doorleiden was ten slotte nog een vierde, tot op den bodem van den mengcilinder reikende, eveneens van verwijding voor watten-prop voorziene buis aanwezig.

Het vullen van den mengcilinder met voedingsvloeistof, waarvan het volumen op de verdeeling kon worden afgelezen, geschiedde door de stop met den opzet te verwijderen; nadat de gewenschte hoeveelheid was toegevoegd werd de cilinder weder met den opzet gesloten en deze met koperdraad stevig bevestigd. Terwijl alle daartoe bestemde buizen van watten-proppen voorzien waren, werd gestereliseerd; vervolgens tijdens het bekoelen, op de reeds beschreven wijze stikstof doorgeleid en het geheele toestel er mede gevuld. Na enten met een bacterie-emulsie leidden we nog een tijdje stikstof door, waarna de opzet, en de stikstof-invoerbuisk, van gummi-stoppen voorzien werden; het opvang-apparaat was reeds eerder aangesloten.

Den opzet vulden we — na verwijdering van de gummi-stop, flambeeren der buis en uitnemen van de watten-prop — met de later toe te voegen, van te voren gestereliseerde, oplossing, waarna steriele stikstof in den opzet geleid en deze, na flambeeren, wederom met de gummi-stop, gesloten werd.

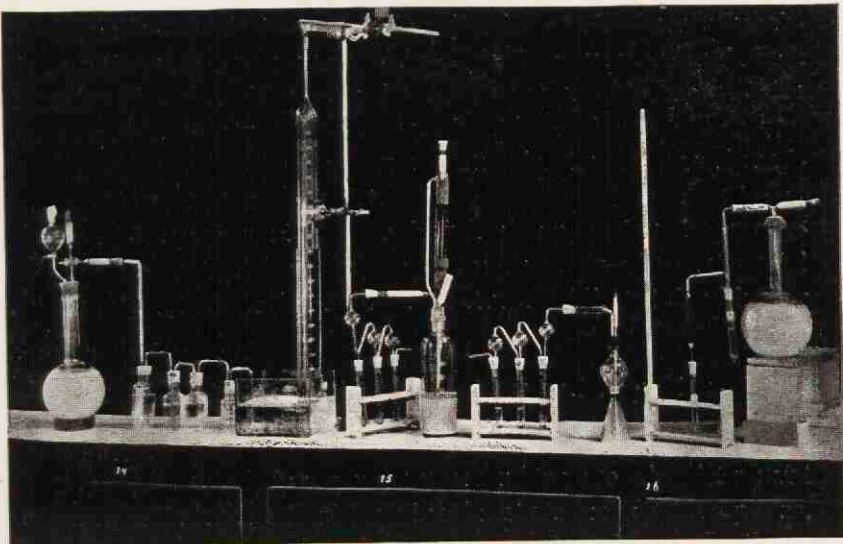
Met behulp van de kraan, kon nu, b.v. om den anderen dag, een

Toestel voor het doorschudden van waterstof tijdens de gisting.



Links manometer, aan de voorzijde reservoir voor spervloei-stof, rechts vergistingsvat. Het geheel kan, om een, in het midden aangebrachte as slingeren en wordt door den, op den voorgrond staanden electro-motor, aangedreven.

Verschillende vergistings-toestellen.



14. Formiaat-gisting. 15. Gisting met successieve-pepton-toevoegingen. 16. links toestel voor de vergisting met kleine hoeveelheden vloeistof, rechts voor vergisting met grootere hoeveelheden.

bepaalde, op de verdeling af te lezen, hoeveelheid vloeistof uit den opzet tot den mengcilinder worden toegelaten zonder dat er stikstof uit het toestel ontweek of lucht erin kon toetreden.

Toestel voor het uitvoeren van gistingen, terwijl waterstof door de gistende vloeistof geschud werd.

Dit toestel bestond uit een rondbodern van 500 cm³ met aangesmolten slijpstuk, waarop een aan weerszijden van slijpstukken voorziene rechthoekig omgebogen buis (diam. $\pm 1\frac{1}{2}$ cm) kwam. In het in de kolf stekende slijpstuk, was een nauwer buisje gesmolten, dat tot aan het oppervlak van de, in de kolf aanwezige vloeistof, reikte; beneden deze aanhechting was een, naar boven gekeerde zijbuis aangesmolten, eindigende in een verwijding voor een watten-prop.

Eveneens bevond zich een watten-prop in het verwijde gedeelte achter het slijpstuk, waarmede het horizontale einde van de omgebogen-, verbonden was met een U-vormige buis.

Deze U-vormige buis was uitgevoerd als open-manometer. Aan het eene been, bij de bovengenoemde aansluiting, was een zijbuisje met kraan, aan de onderzijde van het andere, een zijbuisje aangesmolten. Het, met de kolf verbonden been, was vervaardigd uit een buret, die 50 cm³ kon bevatten. Het onderste zijbuisje werd door middel van een rubber-slang verbonden met een reservoirtje en het geheel met water gevuld; door nu het reservoirtje hooger of lager te stellen konden de niveaus, ter aflezing van het volumen, gelijk gezet worden. Het volumen van kolf enz. tot aan de nulstreep van den manometer, bedroeg 720 cm³.

De, van 300 cm³ voedingsbodern voorziene, door een watten-prop gesloten kolf en de afzonderlijk ingepakte, rechthoekig omgebogen buis, werden op de gewone wijze, gedurende $\frac{1}{2}$ uur bij 110° gestereliseerd.

Na bekoeling zetten wij het toestel weer in elkander en bevestigden het op de schudmachine, om dan vervolgens door het kraantje waterstof in te leiden; de hierdoor verdrongen lucht werd gelegenheid gegeven, door de recht opstaande zijbuis, te ontwijken. Ongeveer een $\frac{1}{2}$ uur leidden we waterstof door en sloten dan

de zijbuis met een gummi-stop, waarna het gecalibreerde been van den manometer met waterstof gevuld, de kraan gesloten, en de verbinding met den waterstof-cilinder verbroken werd; het geheel was dan voor gebruik gereed.

HOOFDSTUK VII.

RESULTATEN VAN HET QUALITATIEVE ONDERZOEK.

In het vorige hoofdstuk deelden wij reeds mede, dat de vorming van gassen bij vergisting van glycol, onderzocht werd in gistbuizen (zgn. Einhorn) van 250 cm³ inhoud. We vulden deze buizen met een voedingsbodem, die 1 % pepton, ½ % keukenzout, en 2 % glycol, doch geen krijt bevatte; het vrij maken van koolzuur, door de bij de gisting ontstane zuren, schakelden wij hierdoor uit.

Bij deze proeven konden wij de afscheiding van gassen uit de oplossing niet waarnemen, ook bij het onderzoek onder anaërobe omstandigheden trad geen gas op.

Dit stemde dus overeen met de resultaten van vorige onderzoekers, die bij de vergisting van glycol eveneens geen gassen vonden.

Na veertien dagen onderzochten we zoowel de vloeistof der gistbuizen, als het substraat van anaërobe vergistingen en vonden: azijnzuur, alcohol, zeer weinig melk- en barnsteenzuur, sporen acetaldehyde en in enkele gevallen 2.3. butyleenglycol.

Tevens onderzochten we, volgens Voges-Proskauer, de vloeistoffen op diacetyl en acetoïne, doch konden beide verbindingen niet aantoonen.

Voor deze vergistingen gebruikten wij de onder nummer: 1—6, 11, 16, 17, 19, 29, 31 en 37, in onderstaande tabel aangeduide, stammen.

Bij dit onderzoek trof het ons, dat acetaldehyde in sommige substraten wel, in andere niet voorkwam.

Wij besloten dit nader te onderzoeken en tevens in het onderzoek meerdere stammen te betrekken.

Bovendien achtten wij het gewenscht het acetaldehyde semi-quantitatief te bepalen, welke bepalingen wij, in het op blz. 38 beschreven toestel, uitvoerden.

Als voedingsbodem gebruikten wij een oplossing van 1 % pep-

ton „Witte”, 2 % natriumsulfiet ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 % krijt en 1 % glycol in leidingwater en steriliseerden in wijde kultuurbuizen gedurende een half uur bij 110° .

Wij voerden deze proeven in vier groepen uit: Aëroob, met en zonder sulfiet; anaëroob met en zonder sulfiet.

De aërobe gistingen werden, in door watten-proppen gesloten buizen, in een stoof gedurende 10 dagen bebroed; bij de anaërobe gistingen zetten we gedurende den zelfden tijd, de buizen in een met stikstof gevulden exsiccator *), in de broedstoof.

Wij entten met één cm^3 bacterie-suspensie.

Na het broeden namen we uit elke buis een oogje en streken dit op schuine-agar af; na vierentwintig uur staan bij 37° konden we dan, door het aanslaan van deze kultuur, constateeren of de bacteriën, bij het afbreken der gisting, nog leefden.

De resultaten zijn vereenigd in onderstaande tabel, waarvoor wij de volgende normen vaststelden:

1e. Buis blijft geel, geen	acetaldehyde	—
Er vertoont zich een wolkje, spoor	„	sp.
De vloeistof wordt even groen, zeer weinig	„	zw. 1,5 à 2 %
Blauw-groene kleur, weinig	„	w. 2 à 3 %
Blauw,	„	+ 3 à 5 %
Donker blauw, veel	„	v. ± 30 %
Donder blauw, de buis onderzichtig, zeer veel	„	zv. ± 50 %
Bacteriën dood		o.

*) Zie blz. 56.

TABEL 2.

Semi-quantitatief onderzoek naar de productie van acet-
aldehyde bij de vergisting van glycol.

Deze vergistingen verliepen alle in tegenwoordigheid van krijt.

	Aërobe gisting		Anaërobe gisting	
	zonder sulfiet	met sulfiet	zonder sulfiet	met sulfiet
No. Coli-groep				
1	—	sp	sp	w
2	—	—	sp	zw
3	—	sp	w	sp
4	—	—	sp	zw
Typhus-groep				
5	—	—	sp	zw
6	—	sp	zw	+
7	—	—	—	sp
8	—	o	sp	o
9	—	sp	sp	w
10	—	sp	w	+
10a	—	—	—	sp
Paratyphus A- groep				
11	—	—	sp	sp
12	—	—	sp	sp
13	—	—	—	o
14	—	—	—	sp
15	—	—	—	o
Paratyphus B- groep				
16	sp	v	zw	zv
17	—	+	sp	+
18	sp	w	+	v
19	sp	+	+	zv

	Paratyphus C-groep	Aërobe gisting		Anaërobe gisting	
		zonder sulfiet	met sulfiet	zonder sulfiet	met sulfiet
20		—	w	zw	zw
21		—	w	sp	zw
22		zw	zw	w	+
23		zw	w	zw	+
24		—	zw	sp	—
25		—	sp	sp	sp
26		—	sp	zw	sp
27		+	+	w	v
28		+	+	zw	v
	Paratyphus D-groep				
29		—	sp	sp	w
	Dysenterie Shiga-Kruse-groep				
31		—	—	sp	zw
32		—	—	sp	sp
33		—	—	—	sp
34		—	o	—	o
35		sp	—	—	—
36		—	—	sp	sp
	Dysenterie Flexner-groep				
37		—	—	sp	sp
38		—	—	zw	zw
39		—	—	zw	sp
40		—	—	zw	sp
41		—	—	sp	sp
42		—	—	sp	sp
43		—	—	zw	sp
44		—	—	sp	sp
45		—	—	zw	sp
	Dysenterie Sonne-groep				
46		—	sp	sp	sp
47		—	—	sp	zw
48		—	—	sp	w
49		—	—	sp	sp
50		—	—	sp	zw
51		—	—	sp	sp
52		—	—	sp	sp

TABEL 2a.

Semi-quantitatief onderzoek naar de productie van acetaldehyde bij de vergisting van glycol, zonder dat krijt was toegevoegd en onder aërobe omstandigheden.

34	Coli-groep	—
5	Typhus-groep	sp
11	Paratyphus A-groep	sp
16	„ „ B-groep	—
19	„ „ „	zw
37	Dysenterie Flexner-groep	sp

Bekijken we de tabel, dan zien we, dat over het algemeen, zooals te verwachten was, de grootste hoeveelheden acetaldehyde ontstaan bij de toevoeging van sulfiet, doch tevens, dat bij de anaërobe gistingen meer acetaldehyde ontstaat, dan bij de aërobe, zóó zelfs, dat de opbrengsten aan acetaldehyde bij de anaërobe gisting zonder sulfiet, grooter zijn dan die bij de aërobe gistingen met sulfiet.

In de meeste gevallen kunnen we een stijgende lijn constateeren in de opbrengst van acetaldehyde, wanneer we de volgorde, aëroob zonder-, aëroob met sulfiet, anaëroob zonder- en anaëroob met sulfiet, kiezen, in welke volgorde ook de tabel opgesteld is.

Nemen we de bacteriën in groepen te zamen, dan zien we het volgende resultaat:

Bacterium coli gaf aëroob zoowel zonder-, als met sulfiet, geen acetaldehyde; anaëroob zonder sulfiet spoor- en met sulfiet zeer weinig acetaldehyde.

Bacterium typhi zonder sulfiet en aëroob geen acetaldehyde, aëroob en met sulfiet spoor-, anaëroob zonder sulfiet spoor- en anaëroob met sulfiet weinig acetaldehyde.

Voor de bacteriën *paratyphi* A., B. en C. wordt dit: zonder sulfiet en aëroob A. en B. geen acetaldehyde, C. zeer weinig; aëroob en met sulfiet A. geen-, B. en C. weinig acetaldehyde, en voor de anaërobe gistingen A. een spoor acetaldehyde, B. en C.

zeer weinig, wanneer er geen sulfiet was toegevoegd; was sulfiet wel aanwezig, dan geeft A. een spoor, B. veel en C. weinig acetaldehyde.

Voor *B. enteritidis* Gärtner wordt dit respectievelijk: een spoor, matig veel, matig veel en zeer veel acetaldehyde.

De *dysenterie-bacteriën* leverden ten slotte een zeer slechte opbrengst aan acetaldehyde op, nl.: bij de aërobe vergistingen geen en bij de anaërobe vergistingen sporen acetaldehyde.

Over het algemeen konden de Typhus-, de Paratyphus A-, en de Dysenterie-bacteriën de sulfiet-toevoeging slecht verdragen. Bij de stammen, welke wij van het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam en van dat te Leiden, voor dit onderzoek ontvingen, was dit zelfs zoo sterk, dat bij onze eerste proeven, in een milieu waaraan 2 % sulfiet was toegevoegd, zoowel bij de aërobe als bij de anaërobe vergistingen, de bacteriën dood waren gegaan. Waarschijnlijk was dit gedeeltelijk aan het, met te groote tuschenpoozen, overenten, te wijten. Nadat wij gedurende anderhalve maand iedere vijf dagen deze stammen hadden overgeënt, gelukte het ons ze in een voedingsbodem, waaraan 1 % sulfiet was toegevoegd, in het leven te houden, hoewel er toch nog eenige stammen bij waren, welke in dit milieu eveneens stierven. In de tabel zijn, voor deze stammen, de resultaten van vergistingen in tegenwoordigheid van 1 % sulfiet, vermeld.

Na het enten, met een oogje van de vergistingssubstraten der Dysenterie-bacteriën, op schuine-bouillon-agar, sloegen de culturen meestentijds moeilijk aan en vertoonden een dunnen groei.

Ten slotte zij nog opgemerkt, dat in de meeste gevallen, het sulfiet beter werd verdragen bij de aërobe-, dan bij de anaërobe vergistingen.

Wanneer we de uitkomsten van dit semi-quantitatieve onderzoek naar de opbrengst aan acetaldehyde, vergelijken met de resultaten, welke wij verkregen bij de quantitative bepalingen, dan blijken deze voor het quantitative onderzoek zonder krijt (tab. 9—14) goed overeen te stemmen; vonden echter de vergistingen onder aërobe omstandigheden plaats, dan traden voor genoemde stammen verschillen op. Het quantitative onderzoek, waarbij géén krijt aan de te vergisten vloeistof was toegevoegd

(tab. 3—8) leverde meer acetaldehyde op, dan het semiquantitatieve onderzoek, waarbij wél krijt was toegevoegd, daarom stelden wij nog een semiquantitatief onderzoek in naar de vorming van acetaldehyde bij deze stammen als de vergisting plaats greep in een milieu zonder krijt en onder aërobe omstandigheden. De resultaten, welke wij onderaan tabel 2 vermeldden, stemmen, behoudens voor stam No. 16, goed overeen.

HOOFDSTUK VIII.

RESULTATEN VAN HET QUANTITATIEVE ONDERZOEK.

De toevoeging, zoowel als het weglaten, van stoffen aan den voedingsbodem, waarin de vergisting moet plaats hebben, heeft niet alleen ten gevolge, dat bepaalde chemische reactie's niet kunnen verlopen — zooals b.v. 1e. het vastleggen van acetaldehyde met sulfiet, waardoor het aan verdere chemische reactie's onttrokken wordt; 2e. het uitvoeren van de gistingen onder anaërobe omstandigheden, (dus het wegnemen van zuurstof), waardoor oxydatie reacties, door middel van deze zuurstof, opgeheven worden — doch tegelijkertijd beïnvloedt men de conditie's, waaronder het levende organisme verwijlt; erger nog: door bepaalde toevoegingen kan men het organisme schaden, waardoor het, zoo het niet gehéél te gronde gaat, toch sterk in zijn levensfunctie's wordt geremd. Men mag dus ook de resultaten van een dergelijk onderzoek niet beschouwen in overeenstemming te zijn, met die, welke het zelfde organisme zou opleveren zoo het zich onder normale omstandigheden kon ontwikkelen, zonder er zich van overtuigd te hebben, dat de afwijkingen niet groot zijn of althans uit de conditie-verandering verklaard kunnen worden.

Met andere woorden: alvorens het onderzoek in bepaalde banen te leiden, is het goed, eerst de proeven onder normale omstandigheden te laten verlopen, en de hierbij bekomen resultaten te vergelijken met die, welke onder abnormale omstandigheden werden verkregen.

Mede zij er op gewezen, dat zeer kleine concentratie's voor het organisme reeds voldoende kunnen zijn, om het tot een geheel andere leefwijze te noodzaken.

Het leek ons dan ook gewenscht, om de vergisting van glycol eerst te onderzoeken in een milieu, waaraan verder niets anders was toegevoegd dan de noodzakelijke voedingsstoffen.

Bij voorkeur wilden we de vergistingen laten verlopen in een vloeistof, waaraan, behalve het glycol, slechts anorganische voe-

dingszouten of gedefinieerde organische verbindingen, waren toegevoegd, doch het bleek ons onmogelijk hierin een noemenswaardige vergisting van dit lichaam, te verkrijgen. Wij meenen dit gedeeltelijk te moeten wijten aan het giftige karakter van glycol voor bacteriën. Een tweede mogelijke oorzaak zal nog nader besproken worden onder paragraaf f. en g. blz. 92, 96 en in hoofdstuk 9 blz. 114.

De geringe giftigheid van glycol mogen wij afleiden uit de volgende publicatie's:

Toxiciteit van aethyleenglycol grooter dan die van propyleenglycol. M. A. Seidenfeld en P. J. Harzlik ⁶⁰).

Houdbaar maken van eierpreparaten met aethyleenglycol. Wolf Kritchevsky, Benz. Harris, Carl J. Beckert ⁶¹).

Reid Hunt ⁶²) onderzocht de giftigheid van aethyleenglycol, in verband met het gebruik van deze stof in voedingsmiddelen en pharmaceutische producten, in plaats van glycerine. Door dierproeven is hem gebleken, dat glycol een giftige werking uitoefende, welke met die van methylalkohol overeenkomt.

De slechte vergisting in anorganisch-milieu dwong ons dus pepton als voedingsstof te gebruiken, hoewel deze stof uit analytisch oogpunt nu juist niet als ideaal is te beschouwen door haar wisselende en gedeeltelijk nog onbekende samenstelling, terwijl ze bovendien nog vluchtig zuur bevat.

Dit onderzochten wij als volgt:

Tweemaal 100 cm³ peptonwater, dat 1 % pepton bevatte, werden gedurende ½ uur bij 110° gestereliseerd, waarna we op de aangegeven wijze het vluchtige zuur afdestilleerden; bij titratie vonden wij voor de verschillende fractie's de volgende hoeveelheden 0,1 N loog.

1e. 250 cm ³	1,56	1,51 cm ³
2e. „ „	1,42	1,1 „
3e. „ „	1,2	0,9 „
4e. „ „	0,5	0,8 „
5e. „ „	0,4	0,6 „
totaal	5,08	4,91 cm ³
gem. per fractie	1,02	0,98 „

Voor niet gestereliseerd peptonwater vonden we:

1e. 250 cm ³	1,8	1,19 cm ³
2e. „ „	1,6	0,94 „
3e. „ „	0,6	0,6 „
4e. „ „	0,5	0,6 „
totaal	3,5	3,33 cm ³
gem. per fractie	0,88	0,83 „

Eveneens bepaalden wij voor een niet gestereliseerde peptonoplossing, die 10 % pepton bevatte, in tweemaal 100 cm³ de hoeveelheid vluchtig zuur; dit kwam overeen met de volgende hoeveelheden 0,1 N loog.

1e. 250 cm ³	9,51	10,05 cm ³
2e. „ „	6,0	6,2 „
3e. „ „	4,98	4,5 „
4e. „ „	4,9	3,8 „
5e. „ „	3,43	3,5 „
6e. „ „	2,7	2,8 „
7e. „ „	1,2	1,45 „
8e. „ „	0,6	0,62 „
9e. „ „	0,6	0,5 „
totaal	33,92	33,42 cm ³

Hieruit blijkt wel, dat de pepton belangrijke hoeveelheden vluchtig zuur bevatte.

Ten slotte bepaalden we nog den invloed, welke een Coli-stam op de pepton uitoefende. Tweemaal 100 cm³ 1 % peptonwater werd, na bij 110° gesteriliseerd te zijn, met B coli st. No. 4 geënt; na zes dagen broeden bij 37°, destilleerden we het vluchtige zuur met stoom af en titreerden de afzonderlijke fracties:

1e. 250 cm ³	2,62	2,98 cm ³
2e. „ „	1,02	1,01 „
3e. „ „	1,21	1,2 „
4e. „ „	0,7	0,6 „
5e. „ „	0,6	0,6 „
totaal	6,15	6,39 cm ³

Gemiddeld dus	6,27 cm ³
Voor de gesterel. opl. vonden we gem.	5. „
Door de bacteriën was dus uit de pepton een, met 0,1 N loog overeenkomende hoeveelheid, vluchtig zuur geprodu- ceerd.	1,27 cm ³

Behalve pepton werd steeds $\frac{1}{2}$ % keukenzout toegevoegd, daar dit volgens sommigen den bacteriën-groei en de vergisting stimuleert.

Bij het analyseeren van het substraat veroorzaakt het keukenzout geen last, want, het hieruit, door het zwavelzuur vrij gemaakte zoutzuur, komt bij de destillatie van de vluchtige zuren niet over; dit was te verwachten en kon door ons herhaalde malen geconstateerd worden.

a. Aërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan geen krijt was toegevoegd.

Deze vergistingen werden uitgevoerd in de op blz. 58 beschreven apparatuur, nl. een Erlenmeyer waaraan een rondbodem gesmolten was, verbonden met een toestelletje om het ontwijkende acetaldehyde vast te leggen. Het was tot aan de merkstreep gevuld met een oplossing, die 1 % pepton, $\frac{1}{2}$ % keukenzout en 2 % glycol bevatte, en met inhoud gestereliseerd bij 110°.

Wij entten den voedingsbodem met een oogje van een vierentwintig uur oude bouillon-kultuur van de gewenschte bacteriestam en bebroedden bij 37° gedurende 10 dagen (eens per dag steriele lucht door het toestel leidende), waarna de vloeistof geanalyseerd werd, waarvan de resultaten in onderstaande tabellen vereenigd zijn.

In de eerste kolom worden de gewichten der respectievelijke stoffen, zooals ze bij de analyse gevonden werden, aangetroffen. In het bovenste gedeelte van de tweede kolom zijn de, uit de, voor glycol gevonden waarden, berekende percentage's onvergisten en vergiste glycol (toegevoegde glycol is 100 % gesteld) vermeld. In de derde kolom zijn de percentage's glycol vereenigd, die bij het ontstaan van respectievelijk: acetaldehyde, azijnzuur en alcohol, zijn verdwenen; hierbij is de totale hoeveel-

heid vergiste glycol, dus laatste waarde, bovenste gedeelte van de eerste kolom, op 100 % gesteld. Onder „totaal” is in de derde kolom de som van deze percentage's vermeld. In de vierde kolom treft men de aantallen moleculen aan, die met de gewichten in de eerste kolom corresponderen. En ten slotte geeft de vijfde kolom het aantal koolstof-atomen weer, dat zich in deze moleculen bevond.

De reactie van Voges-Proskauer gaf steeds een negatief resultaat.

TABEL 3.
B. coli No. 4.

Aërobe vergisting zonder krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,041				
Onvergiste „	1,8521	60,9			
Vergiste „	1,1889	39,1		0,01916	0,03832
Acetaldehyde	0,0040		0,47	0,00009	0,00018
Azijnzuur	0,6113		53,15	0,01020	0,02040
Alkohol	0,3821		43,30	0,00830	0,01660
Totaal			96,92	0,01859	0,03718

TABEL 4.
B. typhi No. 5.

Toegevoegde glycol	3,7846				
Onvergiste „	3,2295	85,33			
Vergiste „	0,5551	14,64		0,00895	0,01790
Acetaldehyde	0,0053		1,35	0,00012	0,00024
Azijnzuur	0,4397		81,88	0,00733	0,01466
Alkohol	0,0437		10,60	0,00095	0,00190
Totaal			93,83	0,0084	0,01680

TABEL 5.
B. paratyphi A. No. 11.

Aërobe vergisting zonder krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,8704				
Onvergiste „	3,4455	89,02			
Vergiste „	0,4249	10,98		0,00685	0,01370
Acetaldehyde	0,0051		1,69	0,00012	0,00024
Azijnzuur	0,3687		89,70	0,00614	0,01228
Alkohol	0,0089		2,10	0,00019	0,00038
Totaal			94,21	0,00645	0,01290

TABEL 6.
B. paratyphi B. no. 16.

Toegevoegde glycol	3,1177				
Onvergiste „	2,7008	86,62			
Vergiste „	0,4169	13,37		0,00671	0,01342
Acetaldehyde	0,0062		2,10	0,00014	0,00028
Azijnzuur	0,2542		63,02	0,00424	0,00848
Alkohol	0,1012		32,71	0,00220	0,00440
Totaal			97,83	0,00658	0,01316

TABEL 7.
B. enteritidis Gärtner. No. 19.

Toegevoegde glycol	4,2110				
Onvergiste „	3,7230	88,41			
Vergiste „	0,4880	11,59		0,00787	0,01574
Acetaldehyde	sp.				
Azijnzuur	0,4018		85,11	0,00669	0,01338
Alkohol	0,0484		13,36	0,00105	0,00210
Totaal			98,47	0,00774	0,01548

heid vergiste glycol, dus laatste waarde, bovenste gedeelte van de eerste kolom, op 100 % gesteld. Onder „totaal” is in de derde kolom de som van deze percentage's vermeld. In de vierde kolom treft men de aantallen moleculen aan, die met de gewichten in de eerste kolom corresponderen. En ten slotte geeft de vijfde kolom het aantal koolstof-atomen weer, dat zich in deze moleculen bevond.

De reactie van Voges-Proskauer gaf steeds een negatief resultaat.

TABEL 3.
B. coli No. 4.

Aërobe vergisting zonder krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,041				
Onvergiste „	1,8521	60,9			
Vergiste „	1,1889	39,1		0,01916	0,03832
Acetaldehyde	0,0040		0,47	0,00009	0,00018
Azijnzuur	0,6113		53,15	0,01020	0,02040
Alkohol	0,3821		43,30	0,00830	0,01660
Totaal			96,92	0,01859	0,03718

TABEL 4.
B. typhi No. 5.

Toegevoegde glycol	3,7846				
Onvergiste „	3,2295	85,33			
Vergiste „	0,5551	14,64		0,00895	0,01790
Acetaldehyde	0,0053		1,35	0,00012	0,00024
Azijnzuur	0,4397		81,88	0,00733	0,01466
Alkohol	0,0437		10,60	0,00095	0,00190
Totaal			93,83	0,0084	0,01680

TABEL 5.
B. paratyphi A. No. 11.

Aërobe vergisting zonder krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,8704				
Onvergiste „	3,4455	89,02			
Vergiste „	0,4249	10,98		0,00685	0,01370
Acetaldehyde	0,0051		1,69	0,00012	0,00024
Azijnzuur	0,3687		89,70	0,00614	0,01228
Alkohol	0,0089		2,10	0,00019	0,00038
Totaal			94,21	0,00645	0,01290

TABEL 6.
B. paratyphi B. no. 16.

Toegevoegde glycol	3,1177				
Onvergiste „	2,7008	86,62			
Vergiste „	0,4169	13,37		0,00671	0,01342
Acetaldehyde	0,0062		2,10	0,00014	0,00028
Azijnzuur	0,2542		63,02	0,00424	0,00848
Alkohol	0,1012		32,71	0,00220	0,00440
Totaal			97,83	0,00658	0,01316

TABEL 7.
B. enteritidis Gärtner. No. 19.

Toegevoegde glycol	4,2110				
Onvergiste „	3,7230	88,41			
Vergiste „	0,4880	11,59		0,00787	0,01574
Acetaldehyde	sp.				
Azijnzuur	0,4018		85,11	0,00669	0,01338
Alkohol	0,0484		13,36	0,00105	0,00210
Totaal			98,47	0,00774	0,01548

TABEL 8.
B. dysenterie Flexner. No. 37.

Aërobe vergisting zonder kriet.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,3392				
Onvergiste „	3,1885	95,48			
Vergiste „	0,1507	4,52		0,00243	0,00486
Acetaldehyde	0,0021		1,96	0,00005	0,00010
Azijnsuur	0,1034		70,94	0,00172	0,00344
Alkohol	0,0267		23,89	0,00058	0,00116
Totaal			96,79	0,00235	0,00470

b. Anërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan geen kriet was toegevoegd.

Vervolgens voerden we dezelfde vergistingen onder anaërobe omstandigheden uit.

De voedingsbodem was van gelijke samenstelling als de beschrevene. Het toestelletje namen we zoo warm mogelijk uit de autoclaaf en leidden direct op de, op blz. 59 besproken wijze, zuurstof-vrije- en steriele-stikstof door het geheele apparaat.

Na bekoeling werd wederom geënt met een oogje van een 24 uur oude bouillon-kultuur en, nadat nog stikstof was door geleid, gedurende 10 dagen bij 37° bebroed, in welken tijd het geheel goed gesloten bleef.

De analysesresultaten volgen hieronder:

De Voges-Proskauer-reactie was wederom steeds negatief.

TABEL 9.

B. coli No. 4.

Aërobe vergisting zonder kriet.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,5092				
Onvergiste „	3,4217	97,51			
Vergiste „	0,0875	2,49		0,00141	0,00282
Acetaldehyde	sp.				
Azijnsuur	0,0422		49,82	0,00070	0,00140
Alkohol	0,0332		51,05	0,00072	0,00144
Totaal			100,87	0,00142	0,00284

TABEL 10.

B. typhi No. 5.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,7136				
Onvergiste „	3,5379	95,27			
Vergiste „	0,1757	4,73		0,0028	0,0056
Acetaldehyde	sp.				
Azijnsuur	0,1191		70,08	0,00200	0,00400
Alkohol	0,0304		23,31	0,00066	0,00132
Totaal			93,39	0,00266	0,00532

TABEL 11.

B. para typhi A. No. 11.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram-moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,2851				
Onvergiste „	3,2045	97,55			
Vergiste „	0,0806	2,45		0,00127	0,00254
Acetaldehyde	sp.				
Azijnsuur	0,0632		81,09	0,00105	0,00210
Alkohol	0,0060		10,05	0,00013	0,00026
Totaal			91,14	0,00118	0,00236

TABEL 12.

B. paratyphi B. No. 16.

Aërobe vergisting zonder kruit.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,7284				
Onvergiste „	3,3076	88,71			
Vergiste „	0,4208	11,29		0,00678	0,01356
Acetaldehyde	0,0191		6,40	0,00043	0,00086
Azijnzuur	0,1768		43,42	0,00295	0,00590
Alkohol	0,1398		44,77	0,00304	0,00608
Totaal			94,59	0,00642	0,01284

TABEL 13.

B. enteritidis Gärtner. No. 19.

Toegevoegde glycol	3,5744				
Onvergiste „	3,2666	91,39			
Vergiste „	0,3078	8,61		0,00496	0,00992
Acetaldehyde	0,0028		1,28	0,00006	0,00012
Azijnzuur	0,2220		74,56	0,00370	0,00740
Alkohol	0,0499		21,86	0,00109	0,00218
Totaal			97,70	0,00485	0,00970

TABEL 14.

B. dysenterie Flexner. No. 37.

Toegevoegde glycol	3,1479				
Onvergiste „	3,0426	96,65			
Vergiste „	0,1053	3,35		0,00170	0,00340
Acetaldehyde					
Azijnzuur	0,0650		63,81	0,00108	0,00216
Alkohol	0,0253		32,30	0,00055	0,00110
Totaal			96,11	0,00163	0,00326

Hieruit blijkt, dat de glycol, onder deze omstandigheden, slecht vergist werd.

Het beste verliep de vergisting onder aërobe omstandigheden bij de Colistam; voor de Typhus-, Paratyphus A. en B.- en Enteritidisstammen was het percentage vergiste glycol zeer laag, ongeveer 12 %, terwijl de Dysenterie Flexner-stam een buitengewoon slechte ontleding opleverde.

Bij de anaërobe vergistingen wordt het percentage vergiste glycol nog geringer, hoewel de verhouding der vergistingsintensiteit voor de respectieve stammen ongeveer het zelfde blijft, (met uitzondering van de Coli-, Typhus- en Paratyphus A. stammen, die in dit geval een uiterst laag percentage bereikten).

De oorzaken van de geringe ontleding van glycol, konden gelegen zijn: 1e. bij een te groote zuur-concentratie, 2e. aan de moeilijke vergistbaarheid van glycol en 3e. aan een giftige uitwerking op de bacteriën.

Wij besloten, om te groote zuur-concentratie tegen te gaan, aan den voedingsbodem krijgt toe te voegen en de twee andere oorzaken zoo veel mogelijk op te heffen, door, met een grootere hoeveelheid bacteriën, te enten.

c. Aërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijgt was toegevoegd.

De vergistingen werden, als onder § a. beschreven, uitgevoerd; behalve de daar reeds genoemde stoffen, voegden we nog 2 % krijgt aan den voedingsbodem toe.

Wij brachten de grootere hoeveelheid bacteriën in, door een schuine bouillon-agar-kultuur met 5—10 cm³ peptonwater af te schudden en met deze suspensie de te vergisten vloeistof, te enten.

Na 10 dagen broeden bij 37° (gedurende welken tijd iederen dag wat lucht werd doorgeleid) analyseerden we het substraat; de verkregen resultaten zijn hieronder getabeleerd.

Ook bij deze vergistingen was de Voges-Proskauer reactie negatief.

TABEL 15.

B. coli No. 4.

Aërobe vergisting plus krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	4,679				
Onvergiste „	2,7597	58,98			
Vergiste „	1,9193	41,02		0,03093	0,06186
Acetaldehyde					
Azijnzuur	1,1015		59,32	0,01835	0,03670
Alkohol	0,5093		35,76	0,01106	0,02212
Totaal			95,08	0,02941	0,05882

TABEL 16.

B. paratyphi B. 16.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	2,7138				
Onvergiste „	2,0433	75,29			
Vergiste „	0,6705	24,71		0,01081	0,02162
Acetaldehyde	0,0085		1,78	0,00019	0,00038
Azijnzuur	0,3826		58,97	0,00637	0,01274
Alkohol	0,2052		41,21	0,00445	0,00890
Totaal			101,96	0,01101	0,02192

TABEL 17.

B. dysenterie Flexner. No. 37.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	4,2245				
Onvergiste „	3,5032	82,93			
Vergiste „	0,7213	17,07		0,01163	0,02326
Acetaldehyde					
Azijnzuur	0,4339		62,04	0,00721	0,01442
Alkohol	0,1676		31,30	0,00364	0,00728
Totaal			93,34	0,01085	0,02170

d. Anaërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt was toegevoegd.

De voedingsbodem had dezelfde samenstelling als onder § c. beschreven.

De lucht werd door stikstof vervangen, zooals onder § b. besproken is; na bekoeling entten we met 5—10 cm³ bacterie-suspensie, bebroedden gedurende 10 dagen en analyseerden den inhoud van het toestel.

De Voges-Proskauer reactie was negatief.

TABEL 18.

B. coli No. 4.

Anaërobe vergisting plus krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,9482				
Onvergiste „	2,6895	68,12			
Vergiste „	1,2587	31,88		0,02029	0,04058
Acetaldehyde	sp.				
Azijnzuur	0,6217		51,05	0,01036	0,02072
Alkohol	0,4395		47,05	0,00954	0,01908
Totaal			98,10	0,01990	0,03980

TABEL 19.

B. paratyphi A. No. 11.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	3,9482				
Onvergiste „	2,9800	75,48			
Vergiste „	0,9681	24,52		0,01560	0,03120
Acetaldehyde	sp.				
Azijnzuur	0,4994		53,32	0,00832	0,01664
Alkohol	0,3141		43,72	0,00682	0,01364
Totaal			97,04	0,01514	0,03028

TABEL 20.

B. paratyphi B. No. 16.

Aërobe vergisting plus krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	4,2821				
Onvergiste „	3,5181	82,18			
Vergiste „	0,7631	17,82		0,01230	0,02460
Acetaldehyde	0,0095		1,75	0,00022	0,00044
Azijnzuur	0,3878		52,53	0,00646	0,01292
Alkohol	0,2360		41,68	0,00513	0,01026
Totaal			95,96	0,01181	0,02362

TABEL 21.

B. enteritidis Gärtner. No. 19.

Toegevoegde glycol	3,9482				
Onvergiste „	3,1242	79,13			
Vergiste „	0,8240	20,87		0,01328	0,02656
Acetaldehyde	0,0050		0,86	0,00011	0,00022
Azijnzuur	0,4154		52,11	0,00692	0,01384
Alkohol	0,3127		51,13	0,00679	0,01358
Totaal			104,10	0,01382	0,02764

TABEL 22.

B. dysenteriae Flexner. No. 37.

Toegevoegde glycol	3,7019				
Onvergiste „	3,2156	84,16			
Vergiste „	0,5863	15,84		0,00945	0,01890
Acetaldehyde					
Azijnzuur	0,3417		60,24	0,00569	0,01138
Alkohol	0,1624		37,31	0,00353	0,00706
Totaal			97,55	0,00922	0,01844

Vergelijken we deze resultaten met die van de vergistingen zonder krijt, dan zien we voor de overeenkomstige stammen bij de aërobe vergistingen, dat in het algemeen de toevoeging van krijt, het percentage vergiste glycol verhoogt, nl. voor: *B. paratyphi* B. van 13 op 25 %, *B. dysenteriae* Flexner van 4,5 op 17 %; voor *B. coli* blijft het echter vrijwel gelijk nl. 39 en 41 %.

De verschillen tusschen de percentage's zuur en alcohol worden voor *B. paratyphi* B. en *B. dysenteriae* Flexner, kleiner, nl. van $63 - 33 = 30$ (tab. 6) tot $59 - 41 = 18$ (tab. 16) en $71 - 24 = 47$ (tab. 8) tot $62 - 31 = 31$ (tab. 17).

Bij *B. coli* neemt het verschil toe van $53 - 43 = 10$ (tab. 3) tot $59 - 36 = 23$ (tab. 15).

De percentage's gevormd zuur wijken niet veel af van die, welke bij de vorige vergistingen gevonden werden; alleen *B. dysenteriae* maakte onder deze omstandigheden wat meer zuur.

Vergelijken we eveneens de anaërobe vergistingen zonder en met krijt, dan is over de geheele linie het percentage vergiste glycol grooter geworden door de toevoeging van krijt.

Bij de Coli- en Enteritidisstammen zijn de percentage's zuur en alcohol nagenoeg gelijk aan elkaar geworden; bij de paratyphus B. stam is meer zuur en bij de Dysenteriestam nog steeds véél meer zuur dan alcohol gevormd, hoewel nu ook het verschil tusschen de percentage's zuur en alcohol kleiner is geworden $64 - 32 = 32$ (tab. 14) en $60 - 37 = 23$ (tab. 22).

Vergelijken we nog de aërobe en anaërobe vergistingen, beide met krijttoevoeging, dan is het percentage vergiste glycol bij de paratyphus B.-stam en de Colistam gedaald, bij de Dysenteriestam is dit gelijk gebleven.

De hoeveelheden gevormd zuur zijn nagenoeg hetzelfde gebleven voor *B. paratyphi* B. en *dysenteriae*, respectievelijk $59-53$ % en $62-60$ %; de coli bacteriën hebben een weinig meer zuur tijdens de aërobe vergisting gevormd, te weten $59-51$ %.

Over het algemeen is het percentage vergiste glycol door de krijttoevoeging, ten opzichte van de gistingen zonder krijt, sterk gestegen; toch konden wij niet dat van ongeveer 50 %, hetwelk Le Fèvre bij zijn glycol-vergistingen vond, bereiken; het is

mogelijk, dat bij langduriger verblijf in de broedstroof (L.F. liet zijn gistingen minstens gedurende 30 dagen staan) dit percentage stijgt; wij namen dit echter niet waar.

e. Anaërobe vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt en natriumsulfiet was toegevoegd.

Acetaldehyde was in de substraten niet of slechts in geringe hoeveelheden aanwezig, een uitzondering hierop werd gemaakt door *B. paratyphi* B. No. 16, waarbij onder anaërobe omstandigheden ongeveer 6 % acetaldehyde in het substraat te vinden was.

Le Fèvre³⁵) berichtte het vinden van ongeveer 54 % van het verdwenen glycol als acetaldehyde, 40 % als azijnzuur, doch vond geen alcohol; het totale percentage bedroeg dus 94 %, terwijl ongeveer 50 % van het toegevoegde glycol, vergist was, wanneer hij deze verbinding, in tegenwoordigheid van krijt en sulfiet, onder aërobe omstandigheden liet ontleden door een *Coli*-stam.

Naar aanleiding hiervan en de betrekkelijk geringe resultaten, die wij bij de gewone vergistingen betreffende het acetaldehyde, verkregen, leek het ons gewenscht, deze vergistingen eveneens als „sulfietgisting” uit te voeren.

Wij stelden daarom eerst, het op blz. 64 beschreven, semi-quantitatieve onderzoek naar acetaldehyde in, en volgens de daar verkregen resultaten, bepaalden we onze keus tot anaërobe-sulfiet-gisting van glycol door *B. coli* No. 4, *B. paratyphi* A. No. 11, *B. paratyphi* B. No. 16 en *B. dysenteriae* Flexner No. 37.

Bij *B. coli* en *B. paratyphi* B. mochten we namelijk, op grond van de uitkomsten van het semi-quantitatieve onderzoek, acetaldehyde verwachten; bij *B. paratyphi* B. zelfs zeer veel.

Voor *B. paratyphi* A. had dit onderzoek sporen acetaldehyde opgeleverd, terwijl voor de Dysenteriestammen in het algemeen geen acetaldehyde gevonden kon worden, of in enkele gevallen slechts sporen.

Het was juist daarom van belang, na te gaan of het quantitative onderzoek dezelfde resultaten zou geven.

En ten slotte werd dit onderzoek nog ingesteld, om inzicht te

verkrijgen in de andere, bij de sulfiet-gisting gevormde, producten en tevens hunne percentsgewijze verhouding te leeren kennen.

Deze vergistingen lieten we, evenals de vorige anaërobe-, in dezelfde gesloten en met stikstof gevulde apparatuur, verlopen.

Als voedingsbodem diende, een door Le Fèvre reeds beschreven vloeistof, (blz. 20) welke was samengesteld uit 1 % peptonwater, 1 % glycol, 2 % natriumsulfiet en 1 % (vooraf gesteriliseerd) krijt.

Wij konden verwachten, dat bij de sulfiet-gisting de bacteriegroei belemmerd zou worden, daarom entten we deze vergistingen met nog meer bacteriemateriaal dan bij de vorige proeven gebruikt was.

Dit bacteriemateriaal verkregen we, door een, van bouillon-agar voorziene flesch volgens Roux, met een vierentwintig uur oude bouillon-kultuur te enten, welke enting op de volgende wijze uitgevoerd werd:

Nadat de bouillon-kultuur was toegevoegd, legden we de flesch, horizontaal, met de agar naar beneden gekeerd, gedurende 15 minuten in een broedstoof van 37°; daarna lieten we de overtollige bouillon wegvloeien en plaatsten nu de flesch, gedurende 24 uur, wederom met de agar naar beneden, doch iets hellend, in de broedstoof; aldus verkregen we de geheele oppervlakte regelmatig overgroeid.

De bacteriën werden met 10 cm³ peptonwater afgeschud en deze suspentie voor het enten van de te vergisten vloeistof, gebruikt.

Bij het opwerken van deze vergistingen moest met de aanwezigheid van het natriumsulfiet rekening worden gehouden: 1e. bij de acetaldehyde-bepaling. Het acetaldehyde werd door bijdruppelen van een verzadigde bariumchloride-oplossing, in tegenwoordigheid van krijt, uit de sulfiet-verbinding in vrijheid gesteld. 2e. Bij de glycol-bepaling. Hier werd de — na verwijdering van de pepton — sterk zuur geworden oplossing, op phenolphthaleïne zwak alkalisch gemaakt (van zelf sprekend gebeurde dit, met de voor de glycol-bepaling afgepipetteerde hoeveelheid) en in deze alkalische vloeistof, alvorens te gaan verhitten, het aanwezige sulfiet

met niet aangezuurde permanganaat-oplossing, geoxydeerd. Onder deze omstandigheden ontstond uit het glycol hoogstens oxaalzuur, terwijl geen zwaveldioxyde in de kaliapparaatjes kon geraken, daar het in zwavelzuur werd omgezet. Vervolgens verhitte we, onder doorleiden van koolzuur-vrije-lucht (eerst zonder dat de kaliapparaatjes aangesloten waren, ter verwijdering van aanwezig koolzuur) en verbonden daarna de kaliapparaatjes, zuurden wederom aan met zwavelzuur en lieten verder het kaliumpermanganaat-zwavelzuur-mengsel bijdruppelen, waardoor het gevormde oxaalzuur evenals het glycol, geheel tot koolzuur werd geoxydeerd. 3e. Titreerden we het, bij de vluchtige-zuren-destillatie mede overgekomen zwaveldioxyde en trokken later de aequivalente hoeveelheid zuur af.

Het verdient nog opgemerkt te worden, dat we bij *alle* vergistingen, voordat ze geënt werden, de voedingsbodern op steriliteit onderzochten; eveneens controleerden we (door er direct na opening van de toestellen, een oogje uit te nemen en dit af te strijken op bouillon-agar en te bebroeden) of de bacteriën nog in leven waren; deze kultuur diende dan tevens, ter vaststelling van de zuiverheid van het organisme.

De resultaten van dit onderzoek zijn hieronder in tabellen vereenigd.

Reactie volgens Voges-Proskauer was negatief.

TABEL 23.
B. coli No. 4.

Anaërobe sulfiet-gisting plus krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	1,4363				
Onvergiste „	1,1056	76,98			
Vergiste „	0,3307	23,02		0,00533	0,01066
Acetaldehyde	0,0063		2,67	0,00014	0,00028
Aziijnzuur	0,1648		51,51	0,00275	0,00550
Alkohol	0,1145		46,66	0,00248	0,00496
Totaal			100,84	0,00537	0,01074

TABEL 24.

B. paratyphi A. No. 11.

Anaërobe sulfiet-gisting plus krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	1,4363				
Onvergiste „	1,1883	82,75			
Vergiste „	0,2480	17,27		0,00400	0,00800
Acetaldehyde					
Azijnzuur	0,1047		43,63	0,00174	0,00348
Alkohol	0,0905		49,17	0,00197	0,00394
Totaal			92,80	0,00371	0,00742

TABEL 25.

B. paratyphi B. No. 16.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	1,4363				
Onvergiste „	1,1569	80,55			
Vergiste „	0,2794	19,45		0,00450	0,00900
Acetaldehyde	0,0996		52,97	0,00226	0,00452
Azijnzuur	0,0636		24,81	0,00106	0,00212
Alkohol	0,0438		22,25	0,00095	0,00190
Totaal			100,03	0,00427	0,00854

TABEL 26.

B. dysenteriae Flexner. No. 37.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	1,4363				
Onvergiste „	1,3148	91,54			
Vergiste „	0,1215	9,24		0,00196	0,00392
Acetaldehyde					
Azijnzuur	0,0844		66,38	0,00141	0,00282
Alkohol	0,0245		25,05	0,00053	0,00106
Totaal			91,43	0,00194	0,00388

De uitkomsten van het acetaldehyde komen overeen met die, welke bij de andere vergistingen verkregen werden.

De Colistam leverde een gering percentage aan acetaldehyde op; voor de Paratyphi B.-stam was dit zelfs zeer hoog, overeenkomstig de resultaten der andere gistingen, waarbij voor deze stam ook steeds een grooter percentage acetaldehyde werd gevonden, terwijl ook met deze proeven bij de Paratyphi A.- en Dysenterie Flexner stammen slechts een spoor gevonden acetaldehyde kon worden aangetoond.

Vermeldenswaard is hier het feit, dat azijnzuur en alcohol in bijna gelijke verhouding ontstaan, hetgeen bij de vorige vergistingen niet het geval was. De Dysenterie Flexnerstam produceerde hier, overeenkomstig zijn gewoonte, veel meer zuur dan alcohol.

Dat het percentage vergiste glycol zoo laag blijft, kan geen verwondering baren daar het natriumsulfiet mede een giftige werking op het bacterie-organisme uitoefent.

f. Vergisting van glycol met successieue toevoegingen van 5 % peptonoplossing.

In het algemeen werd bij de anaërobe vergistingen, in verhouding tot den gevormden alcohol, een groote hoeveelheid vluchtig zuur gevonden. Daar het gevormde vluchtige zuur, azijnzuur bleek te zijn, kon het, aan alcohol evenredige gedeelte, door een hydro-oxydatie-reactie ontstaan zijn, (b.v. volgens een reactie van Cannizzaro); een ander gedeelte kon verklaard worden, doordat wij vaststelden, dat in het pepton oorspronkelijk reeds vluchtig zuur aanwezig was; dan restte nog een deel, dat — waar er geen vrije zuurstof aanwezig was — slechts verklaard kon worden uit een hydro-oxydatie-reactie, waarbij dan andere stoffen, die in het pepton aanwezig waren, gereduceerd werden. Dit kon mede de oorzaak zijn van het gedeeltelijk vergisten van het glycol; doordat de reduceerbare verbindingen opgebruikt waren, kon geen verdere vergisting meer plaats hebben.⁶³).

Braak vond bij de vergisting van glycerine, dat er na eenigen tijd stagnatie in de gas-ontwikkeling optrad; door nu peptonwater toe te voegen, verkreeg hij een nieuwe gasontwikkeling, die

na eenige dagen wederom stagneerde, om, na toevoeging van peptonwater, opnieuw aan te vangen; dit liet zich meerdere malen herhalen.

Wij wilden hetzelfde bij glycol onderzoeken, doch hierbij deed zich het bezwaar voor, dat bij de vergisting van glycol geen gasontwikkeling plaats greep; we konden dus het oogenblik, waarop stagnatie in de vergisting optrad, niet vaststellen.

Wij besloten nu, de vergisting gedurende 5 dagen zijn gang te laten gaan, daarna iederen tweeden dag 20 cm^3 5 % peptonwater toe te laten vloeien, dit vijftien keer te herhalen, om dan tot opwerken over te gaan.

Deze vergistingen voerden we uit in het, op blz. 59 beschreven toestel; in de mengcilinder brachten we 400 cm^3 van de, bij de gewone vergistingen gebruikte voedingsbodem: peptonwater van 1 %, 2 % glycol, 2 % krijt en $\frac{1}{2}$ % keukenzout. Den opzet vulden we met 200 cm^3 peptonwater van 5 %, waarna het geheel bij 110° werd gesteriliseerd. Nog warm uit de autoclaaf, leidden we stikstof door en entten na bekoeling, met een suspensie van den gewenschten bacteriestam. Wij kozen voor deze vergisting de stammen: Coli No. 4, Paratyphus B. No. 16 en Enteritidis Gärtner No. 19, daar gebleken was, dat deze het glycol nog het beste fermenteerden.

Na aansluiting van het opvangapparaat voor acetaldehyde, stelden we het geheel op in de broedkamer en lieten gedurende 5 dagen de gisting zijn gang gaan.

Na den vijfden dag voegden we — door openen van de, tusschen opzet en mengcilinder, aangebrachte kraan — om de twee dagen 20 cm^3 van de 5 % pepton-oplossing toe en herhaalden dit vijftien maal. Steeds werd twee keer per dag doorgeschud om het krijt weder in de vloeistof te suspenderen.

Nadat de 200 cm^3 5 % pepton-oplossing weggevloeid waren, werd de opzet opnieuw met 200 cm^3 gesteriliseerd en warm met stikstof verzadigd 5 % peptonwater, gevuld en stikstof door het toestel geleid om eventueel togetreden lucht weder te verdrijven.

Naast deze vergistingsproeven zetten we tevens, geheel op de zelfde wijze en gedurende den zelfden tijd, proeven in, die we

blanco-proeven zouden kunnen noemen, daar aan den boven beschreven voedingsbodem het glycol ontbrak.

De analyse-resultaten, die we van deze laatste proeven verkregen, trokken we af van die, welke bij de glycol-vergistingen gevonden werden; zoodoende de producten, die uit de pepton ontstaan waren, elimineerende.

Beide resultaten zijn in onderstaande tabellen vereenigd.

De Voges-Proskauer-reactie viel voor deze vergistingen negatief uit.

2-3 Butyleenglycol was slechts in sporen aanwezig.

TABEL 27.

B. coli No. 4.

Anaërobie vergisting met pepton toevoeging.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	9,6186				
Onvergiste „	3,1879	33,14			
Vergiste „	6,4307	66,86		0,1036	0,2072
Acetaldehyde	0,0294		0,65	0,00067	0,00134
Azijnsuur	3,2735		52,61	0,05440	0,10880
Alkohol	2,7961		58,58	0,06070	0,12140
Totaal			111,84	0,11577	0,23154

Melkzuur 0,0231 g
„ blanco 0,0409 g

Barnsteenzuur 0,5513 g
„ blanco 0,1269 g

0,0178 g minder.

0,4244 g meer.

Blanco-bepaling.

B. coli No. 4.

Met krijt en pepton toevoeging, doch zonder glycol.

Vluchtig zuur	0,4136 g	als azijsuur berekend.
Alkohol	niet aanwezig	
Acetaldehyde	„ „	
Melkzuur	0,0409 g	
Barnst.z.	0,1269 g	

TABEL 28.

B. paratyphi B. No. 16.

Anaërobe vergisting met pepton toevoeging.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	9,6186				
Onvergiste "	2,3419	24,35			
Vergiste "	7,2767	75,65		0,11727	0,23454
Acetaldehyde	0,0442		0,86	0,01000	0,02000
Azijnzuur	3,6354		51,64	0,06056	0,12112
Alkohol	2,9131		53,94	0,06326	0,12652
Totaal			106,44	0,13382	0,26764

Melkzuur	0,0437 g	Barnsteenzuur	0,7130 g
" blanco	0,0000 g	" blanco	0,0293 g
	0,0437 g meer.		0,2108 g meer.

Blanco-bepaling.

B. paratyphi B. No. 16

Met krijt en pepton toevoeging, doch zonder glycol.

Vluchtig zuur	0,2038 g	als azijnzuur berekend.
Alkohol	niet aanwezig	
Acetaldehyde	" "	
Melkzuur	" "	
Barnst.z.	0,0293 g	

TABEL 29.

B. enteritidis Gärtner No. 19.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	9,6186				
Onvergiste "	3,0523	31,73			
Vergiste "	6,5663	68,27		0,10580	0,21160
Acetaldehyde	0,0430		0,92	0,00098	0,00196
Azijnzuur	3,0662		48,26	0,05108	0,10216
Alkohol	2,7564		56,56	0,05986	0,11972
Totaal			105,74	0,11192	0,22384

Melkzuur	0,0409 g	Barnsteen-zuur	0,3577 g
" blanco	0,0166 g	" blanco	0,1469 g
	0,0243 g meer		0,2108 g meer.

Blanco-bepaling.

B. enteritidis Gärtner No. 19 **Met krijt en pepton toevoeging, doch zonder glycol.**

Vluchtig zuur	0,1968 g	als azijnzuur berekend.
Alkohol	niet aanwezig	
Acetaldehyde	„ „	
Melkzuur	0,0166 g	
Barnst.z.	0,1469 g	

Uit de verkregen resultaten blijkt wel, dat de hoeveelheid vergiste glycol sterk is toegenomen, zoodat we bij de glycol-vergistingen de oorzaak van de moeilijke vergistbaarheid eveneens moeten zoeken bij de remming van een hydro-oxydatiereactie, door het optreden van een te groote waterstof-concentratie.

Acetaldehyde was voor alle drie de gebruikte stammen in gelijke, doch geringe hoeveelheid, aanwezig, terwijl azijnzuur en alkohol in aequivalente hoeveelheden ontstonden.

In de substraten van de voorgaande vergistingen konden wij in het residu van de aetherextractie (extractie van niet vluchtige-zuren) slechts zeer geringe hoeveelheden zuur vaststellen.

Bij de vergistingen met successieve toevoegingen van pepton, was te verwachten, dat de hoeveelheden niet-vluchtig-zuur, grooter zouden zijn, zoowel indien deze zuren uit het glycol zouden zijn ontstaan, als wanneer de bron dezer zuren in het pepton gezocht moest worden; immers was de pepton-concentratie bij deze vergistingen grooter.

Inderdaad ontstonden bij deze gistingen grootere hoeveelheden melk- en barnsteenzuur.

In de volgorde B. coli, B. paratyphi B. en B. enteritidis Gärtner werden bij de proeven, waarbij glycol aan den voedingsbodem was toegevoegd, respectievelijk: 0,0231, 0,0437 en 0,0409 g melkzuur en 0,5513, 0,7130 en 0,3577 g barnsteenzuur gevonden.

Voor de vergistingen waaraan *geen* glycol was toegevoegd be droegen deze hoeveelheden in dezelfde volgorde respectievelijk:

0,0409, 0,0000 en 0,0166 g melkzuur en 0,1269, 0,0293 en 0,1469 g barnsteen­zuur, zoodat de Colistam 0,0178 g minder melkzuur en 0,4244 g meer barnsteen­zuur gevormd heeft. Voor de Paratyphi B stam vinden we 0,0437 g melkzuur en 0,2108 g barnsteen­zuur meer, en voor de Enteritidis Gärtnerstam is het 0,0243 g melkzuur en 0,2108 g barnsteen­zuur meer.

Door de toevoeging van glycol wordt dus steeds *meer* barn­steen­zuur gevormd; terwijl alleen *B. coli* *minder* melkzuur, de beide andere stammen *meer* melkzuur vormen.

Vergelijken we nog de moleculaire hoeveelheden azijn­zuur, melkzuur en barnsteen­zuur, die bij de blanco-proeven ontstaan zijn, onderling, dan zien we noch verband optreden tusschen het azijn­zuur en de beide andere zuren, noch tusschen melkzuur en barnsteen­zuur.

De moleculaire hoeveelheden zijn in de volgorde: azijn­zuur, melkzuur en barnsteen­zuur, voor:

<i>B. coli</i>	0,00689, 0,00046, 0,00107
<i>B. p. typhi</i> B.	0,00339, 0,00000, 0,00025
<i>B. enteritidis</i>	0,00328, 0,00018, 0,00124

g. Vergisting van glycol, terwijl waterstof door de gistende vloeistof werd geschud.

Bij het vorige onderzoek was gebleken, dat de toevoeging van pepton een gunstigen invloed uitoefende, zoowel t.o.v. de hoeveelheid vergiste glycol, als op de vorming van aequimoleculaire hoeveelheden azijn­zuur en alcohol. Dit meenden wij te mogen toeschrijven aan een betere opname en in reactie brengen van de gevormde waterstof.

Wij dachten aan een katalytische reductie van bestanddeelen der pepton. Om dit nader te onderzoeken, hydreerden we 15 cm³ van een 1 %-pepton-oplossing in gedestilleerd water, met behulp van een micro-hydreer-apparaat, door middel van waterstof met 50 mg Pt katalysator, volgens Adam Schreiner, en vonden, dat er 12,4 cm³ waterstof door het pepton was opgenomen. Bij een herhaling van deze proef vonden wij 12,2 cm³

Vervolgens onderzochten we den invloed van bacterie-protoc-

plasma op de opname van waterstof, door 15 cm³ van genoemde peptonoplossing, met een cultuur van Coli-bacteriën te enten en gedurende 4 dagen bij 37° te laten broeden, waarna op de boven beschreven wijze, met 50 mg Adam Sch. katalysator en waterstof, werd gehydriseerd. De opgenomen hoeveelheid waterstof bedroeg nu 13,2 cm³; blijkbaar werd geen of uiterst weinig waterstof aan het bacterieprotoplasma geadsorbeerd.

Vervolgens herhaalden we dit onderzoek, zonder dat een katalysator was toegevoegd en vonden nu dezelfde hoeveelheden voor de opgenomen waterstof.

Hier kon dus ook een adsorptie van waterstof aan het opgeloste pepton in het spel zijn.

Dit onderzochten wij, door grootere hoeveelheden van 1 %-peptonoplossingen met waterstof, door schudden op een schudmachine, te verzadigen en vervolgens het opgenomen gas, onder verwarming, weder uit te drijven (wij moesten hierbij tot koken der oplossing verhitten) en vonden nu, dat de hoeveelheden opgenomen- en uitgekookte waterstof vrijwel gelijk waren. De waterstof-adsorptie aan pepton, bleek dus mogelijk te zijn.

Het leek ons daarom van belang den invloed van een overmaat waterstof op de vergisting van glycol te onderzoeken. Om een innige vermenging van de waterstof met de vloeistof te bevorderen, lieten we het apparaat gedurende den geheelen vergistings-tijd op een schudmachine schudden, gelijk dit bij katalytische hydreeringen wordt toegepast. Het toestel beschreven we reeds op blz. 61.

Als voedingsbodem gebruikten we een oplossing, die 1 % pepton, 2 % glycol, 1/2 % keukenzout en 2 % krijt bevatte. Deze oplossing werd in de kolf van het apparaat gebracht, de kolf met een watten-prop gesloten en bij 110° gestereliseerd; direct hierna, namen we de watten-prop eraf en plaatsten het omgebogen, van slijpstukken voorziene gedeelte, dat te voren gesteriliseerd was, op de kolf.

Nadat het geheel verder in elkander gezet was, bevestigden we het op de schudmachine en leidden gedurende een half uur waterstofgas door het toestel, zonder te schudden; nadat de lucht verdrongen was, werd geënt met een afslibbing van een Colistam op

schuine bouillon-agar en het toestel gesloten.

Door, met behulp van de aangesmolten kraan, wat waterstof te laten ontsnappen, brachten we het niveau in de gecalibreerde buis op ongeveer een derde van de hoogte en stelden vervolgens, door omhoog schuiven van het reservoirtje, het niveau in het andere been ongeveer 10 cm hoger.

Na aflezing van het volumen zetten we het toestel in beweging.

De luchtdruk werd door een barograaf opgenomen, terwijl we, het constant blijven van de temperatuur, op een thermograaf aflazen.

Zoo noodig konden we door bovengenoemde kraan de verbruikte waterstof weder aanvullen.

Gedurende de zeventien dagen, dat we lieten gisten, controleerden we regelmatig het volumen en hielden het niveau in het open been van den manometer, zoo goed mogelijk 10 cm hoger dan het niveau in het gesloten been, aldus voor een vrij constanten, geringen overdruk in het toestel, zorg dragende.

Hieronder volgen de resultaten.

TABEL 30.

B. Coli No. 4.

Gisting met waterstof en krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	6,7330				
Onvergiste „	6,0856	90,38			
Vergiste „	0,6474	9,62		0,01043	0,02086
Acetaldehyde	0,0150		3,26	0,00034	0,00068
Azijnzuur	0,2266		36,18	0,00378	0,00756
Alkohol	0,2932		61,01	0,00637	0,01274
Totaal			100,45	0,01049	0,02098

Melkzuur 0,0080 g

Barnsteen zuur 0,1629 g

Opmerkelijk is de vrij groote hoeveelheid acetaldehyde, welke bij deze vergisting kon worden aangetoond; zij overtrof nog het quantum, dat we bij de sulfietgisting met denzelfden bacteriestam, (tab. 23) verkregen, met 0,59 %.

Zooals wij verwachtten was er bij deze vergisting veel meer alcohol ontstaan, (namelijk 0,00259 mol. meer), dan met het gevormde azijnzuur overeenkomt; wanneer deze hoeveelheid alcohol ontstond door reductie van acetaldehyde met de toegevoerde waterstof, was hiervoor 65,9 cm³ bij 76 cm en 37°, noodig.

Het percentage vergiste glycol is zelfs ten opzichte van de sulfietgisting zeer laag te noemen; eenerzijds kan dit veroorzaakt zijn door het voortdurende schudden, anderzijds door de remmende werking van de waterstof.

Wij merkten op, dat het gecorrigeerde gasvolumen na eenige dagen gisten toenam, om dan weder na korten tijd af te nemen, hetgeen zich eenige malen tijdens de gisting herhaalde.

Dit verschijnsel kon veroorzaakt worden, door het snel verbruiken van een opgehoopte hoeveelheid waterstof (afname van het volumen) gevolgd door een hydro-oxydatie, waarbij waterstof vrij kwam (toename van het volumen).

Een andere oorzaak kon gelegen zijn in de aanwezigheid van krijt; uit dit krijt kon, door de tijdens de vergisting ontstane zuren, koolzuur ontwikkeld worden, dat echter niet vrij kwam, doch in de vloeistof opgelost bleef en hieruit de waterstof verdrong. Trad de zuurvorming in een zekere frequentie op, dan zou dus een phase van sterke zuurvorming gepaard gaan met toename van het volumen; volgde hierop een phase van weinig of in het geheel geen zuurvorming, dan nam het regelmatige waterstofverbruik wederom de overhand en verminderde het volumen. Deze laatste oorzaak leek ons de meest voor de hand liggende. Een zelfde vergisting, doch zonder krijt, zou hier dus uitsluitel kunnen geven.

De volgende tabel bevat de uitkomsten van deze vergisting.

De resultaten stemmen goed met die van de vorige tabel, overeen; vanzelfsprekend is de hoeveelheid vergiste glycol hier nog geringer.

TABEL 31.
B. coli No. 4.

Gisting met waterstof z o n d e r krijt.

Producten	Grammen	% der toegev. glycol	% der vergiste glycol	Gram- moleculen	Berekend als gram atm. C.
Toegevoegde glycol	6,9297				
Onvergiste „	6,6612	96,13			
Vergiste „	0,2685	3,89		0,00433	0,00866
Acetaldehyde	0,0020		1,05	0,00005	0,00010
Azijnzuur	0,1126		43,35	0,00188	0,00276
Alkohol	0,1059		53,15	0,00230	0,00460
Totaal			97,55	0,00423	0,00746

Melkzuur 0,0070 g
Barnsteenzuur 0,1390 g

Opvallend is echter, dat bij deze vergisting minder acetaldehyde in het substraat aanwezig was; men zou toch in dit zure milieu verwachten, dat een geringer gedeelte van het acetaldehyde door een reactie van Cannizzaro, in azijnzuur en alkohol werd omgezet; diensengevolge moest er dan ook een grooter percentage acetaldehyde t.o.v. azijnzuur en alkohol, over blijven.

Wederom was er meer alkohol dan azijnzuur ontstaan en wel 0,00042 mol meer; dit komt overeen met 10,68 cm³ waterstof bij 76 cm en 37°.

Tijdens deze vergisting kon geen noemenswaardige toename van het volumen worden waargenomen, de waterstof werd regelmatig verbruikt, zoodat we, het onder de vorige tabel besproken verschijnsel, aan het vrij komen van koolzuur uit het krijt, moeten toeschrijven, welk koolzuur dan de geadsorbeerde waterstof verdringt.

Het bleek ons, dat gedurende deze proeven betrekkelijk grote hoeveelheden waterstof geadsorbeerd werden, dit is in overeenstemming met het onderzoek van D. D. van Slyke⁶⁴), die vond, dat belangrijke hoeveelheden waterstof in bloed en bloedserum konden oplossen.

Bij de vergisting, welke zonder krijttoevoeging verliep, verzadigden wij eerst de nog warm uit de autoclaaf genomen peptonoplossing met stikstof, schudden gedurende twee dagen met dit gas en vervingen vervolgens de, boven de vloeistof aanwezige stikstof, door waterstof, welke wederom in belangrijke mate werd opgenomen; nadat de oplossing met waterstof verzadigd was, werd met de bacterie geënt.

Bij schudden van de oplossing met stikstof, nam deze slechts weinig van dit gas op; een zelfde resultaat verkreeg Stoddard⁶⁵⁾ met een onderzoek betreffende de oplosbaarheid van stikstof in oplossingen, welke proteïnen bevatten.

h. Vergisting van glycol in peptonwater, waaraan krijt en calciumformiaat is toegevoegd.

In hoofdstuk II deelden we reeds mede, dat door E. Ch. Grey³¹⁾ een onderzoek was ingesteld naar de vergisting van glycol in tegenwoordigheid van calciumformiaat.

Grey voerde de vergisting uit in een vloeistof, die 12 g glycol, 5 g calciumformiaat, 10 g krijt en 300 cm³ van een bacterie-emulsie, welke b.v. 0,3 g (op droog gewicht berekend) bacteriën bevatte; het geheel werd met water aangevuld tot 1000 cm³.

Als resultaat verkreeg hij:

TABEL 32.

	in g	in %
Koolzuur	—	—
Mierenzuur	—	—
Azijnzuur	2,22	39,30
Melkzuur	1,50	22,13
Barnsteenzuur	—	—
Alkohol	0,020	
Residu	6,35	
Totaal	10,09	61,43

Grey meende uit de groote hoeveelheid melkzuur, die bij deze vergisting ontstond, te moeten afleiden, dat de vergisting van glycol niet op eenvoudige wijze verliep, daar er melkzuur uit het glycol gesynthetiseerd werd.

Het leek ons interessant eveneens de vergisting van glycol in een calciumformiaat bevattenden voedingsbodem te bestudeeren.

Bij de voorgaande vergistingen werd door ons, zij het in geringe hoeveelheden, melkzuur naast azijnzuur gevonden, doch eveneens melkzuur in substraten, waaraan *geen* glycol was toegevoegd. Een formiaat-gisting kon hier wellicht uitsluitel geven. Om deze proeven in overeenstemming te brengen met het voorgaande onderzoek, konden wij geen gebruik maken van de groote hoeveelheden bacteriën, zooals dit door Grey gedaan was, doch voegden wel pepton toe.

Wij stelden de volgende gistings-vloeistof samen: 12 g glycol, 5 g calciumformiaat, 10 g krijt, 10 g pepton en 5 g keukenzout, in 1000 cm³ water.

De vergisting werd uitgevoerd in een, van een verdeeling voorzien, pyrex-platbodem van ongeveer 2,5 l totalen inhoud. De kolf was gesloten met een tweemaal doorboorde rubber stop. In het eerste gat, stak een, tot aan den bodem der kolf reikende, kraan-trechter; in het tweede een driewegkraan, die aan de twee andere uiteinden voorzien was van verwijdingen voor het inbrengen van watten-proppen. Deze kolf vulden we met 2 l van den hierboven vermelden voedingsbodem en sloten de uiteinden van de driewegkraan en den trechter met watten-proppen kiemvrij af. Nadat het geheel met geopende driewegkraan gedurende een half uur bij 110° gesteriliseerd was, werd de kolf zoo warm mogelijk uit de autoclaaf genomen en stikstof door den kraantrechter ingeleid; na bekoeling entten we, met een — door afschudden met peptonwater van een, op bouillon-agar, in een flesch volgens Roux, gekweekte coli stam — verkregen bacteriënsuspensie, waarna de kolf met behulp van de driewegkraan aangesloten werd aan drie met elkaar verbonden fleschjes, die respectievelijk 200, 150 en 50 cm³ 4 N kaliloog bevatten, waarna nog een leeg fleschje volgde; het geheel diende om het ontwikkelde koolzuur tegen te houden. Het laatste fleschje was verbonden met een in een bak met

paraffine-olie staande, gecalibreerde, aan het bovineinde van een capillair voorziene, cilinder van 2 l inhoud, waarin het gevormde waterstofgas kon worden opgevangen.

Het geheele toestel plaatsten we in een broedkamer, die op 37° gehouden werd.

Vóór het enten, namen we, na eerst goed doorgeschied te hebben, 200 cm³ van den voedingsbodem uit den kraantrechter, waarin de vloeistof, door middel van een kleinen overdruk in de kolf, geperst was. Deze hoeveelheid vloeistof analyseerden we op de hoeveelheden: glycol, koolzuur, mierenzuur en ander vluchtig-zuur, die vóór de gisting aanwezig waren.

Grey heeft de bepaling van koolzuur en mierenzuur nagelaten, welke bepalingen echter wel van belang kunnen zijn om den oorsprong van het ontstane melkzuur te ontdekken.

Nadat het toestel op temperatuur was gekomen, vulden we den geheelen cilinder met paraffine-olie, sloten de capillair met behulp van een rubber slangetje met klemkraantje en lieten gedurende twaalf dagen vergisten, waarna tot het analyseeren van de gevormde producten werd overgegaan.

Bij de bepaling van het glycol in de oorspronkelijke oplossing, evenals in de gistingsvloeistof, moest rekening worden gehouden met de aanwezigheid van mierenzuur. In deze gevallen destilleerden we de vluchtige-zuren met stoom af en vulden daarna weder tot het oorspronkelijke volumen aan, alvorens de glycol-bepaling uit te voeren. De resultaten zijn in onderstaande tabel weergegeven.

TABEL 33.
B. coli No. 4.

Formiaat gisting.

Toegev. glycol	34,0600 g		
Onvergiste „	33,1570 „	97,35 % v/d toegev. glycol	
Vergiste „	0,9030 „	2,65 % „ „ „	
Acetaldehyde	0,0000 g		
Azijnzuur	0,6423 „	73,52 % v/d vergiste glycol.	Overm. t.o.v. alkohol =
Alkohol	0,2174 „	32,44 % „ „ „	0,00598 val.
		105,96 % totaal	
Koolzuur	0,0653 „		
Waterstof	188,99 cm ³		
	33,29 „	komt met 0,0653 g CO ₂ als beiden uit HCOOH ontst.	
	155,70 cm ³		
	134,12 „	komt overeen met 0,00598 val zuur door hydr. oxd. ontst.	
	21,58 cm ³	over.	
Melkzuur	0,0548 g		
Barnsteenzuur	0,0567 „		
Toegev. mierenzuur	6,3814 „		
Onveranderd „	6,1294 „	96,05 % v/h toegev. mierenzuur	
Ontleed „	0,2520 „	3,95 % „ „ „	
	0,0683 „	tot CO ₂ en H ₂ ontleed	27,10 % v/h ontl.m.z.
	0,1837 g	eventueel met acetaldehyde	
	0,0281 „	gecondenseerd tot melkzuur	11,15 % „ „ „ „
	0,1556 g	over.	

Onder deze omstandigheden was een gelijke hoeveelheid melkzuur gevormd als bij de blanco-proef van tabel 27; deze hoeveelheid melkzuur bleef verre ten achter bij die, welke door Grey gevonden werd; ook ten opzichte van het gevormde azijnzuur was de verhouding geheel anders, nl. 0,64 g azijnzuur en 0,06 g melkzuur en bij Grey respectievelijk 2,22 en 1,5 g.

Wij vonden meer alkohol dan Grey, terwijl door ons tevens barnsteenzuur gevonden werd.

De verhouding van de onvergiste- tot de vergiste glycol kwam hier overeen met die, van de door ons uitgevoerde anaërobe vergisting zonder krijt toevoeging (zie tabel 9); alleen was bij de formiaat-gisting meer azijnzuur dan alkohol gevormd.

Wij kunnen dus niet besluiten tot een meer gecompliceerde vergisting van het glycol en meenen het ontstaan van een grootere hoeveelheid melkzuur, zooals Grey die vond, te moeten verklaren, doordat tegelijkertijd met het enten met de groote hoeveelheid bacterie-emulsie, verbindingen werden toegevoegd, die later tot melkzuur ontleed werden. Ook was het mogelijk, dat het melkzuur ontstond door synthese uit een molecule acetaldehyde en een molecule mierenzuur, welk geval wij dan ook in de tabel berekenden. Er was meer mierenzuur verdwenen, dan overeenkwam met de gevormde hoeveelheden koolzuur en waterstof.

Nemen we dan nog aan, dat het gedeelte van het azijnzuur, dat niet in aequimoleculaire hoeveelheid met den alcohol ontstaan is, gevormd werd door een hydro-oxydatie-reactie, waarbij waterstof vrij komt, dan blijft tenslotte nog $21,58 \text{ cm}^3$ niet verantwoorde waterstof, over.

i. Vergisting van aethyleenoxyde.

In hoofdst. II blz. 22 beschreven wij reeds, het door Le Fèvre⁶⁶⁾ veronderstelde optreden van aethyleenoxyde, als tusschenproduct bij de vergisting van glycol.

Deze veronderstelling wilden we, zoo mogelijk, aan een experiment toetsen en kozen daartoe de vergisting van aethyleenoxyde in peptonwater.

Deze vergisting werd, wegens de groote vluchtigheid van het aethyleenoxyde, uitgevoerd in toegesmolten buizen.

Wij wilden de vergisting tot stand brengen met een Colistam No. 4, een Paratyphus B.-stam No. 16 en een Enteritidisstam No. 19 en zetten de volgende proeven in: peptonwater van 1 % met 2 % aethyleenoxyde, peptonwater van 1 % met 2 % aethyleenoxyde en 2 % krijt, (daarbij telkens een niet geënt buisje voegende), en uitsluitend peptonwater van 1 %, en peptonwater van 1 % plus 2 % krijt; alles werd onder anaërobe omstandigheden uitgevoerd.

Een gedeelte van de buizen, die aan het bovineinde tot een sterke vernauwing waren uitgetrokken, werd van de gewenschte hoeveelheid krijt voorzien, vervolgens brachten we in alle buizen dezelfde hoeveelheid peptonwater, en steriliseerden dezen.

De buizen werden daarna met een halve cm³ van een bacterie-emulsie van de bovengenoemde bacterie-stammen, geënt.

Onder vacuum kookten we dan bij 40° de aanwezige lucht uit, en vervingen deze door stikstof, waarna we de buizen in een koudmakend mengsel van —12° zetten.

Voor het toevoegen van het aethyleenoxyde bedienden we ons van de volgende techniek: het aethyleenoxyde werd eerst op steriele wijze in een ampul met langen hals gedestilleerd; vervolgens trokken we dezen hals tot een dunne capillair uit en vulden, door deze capillair in de nauwe lange halzen van kleine ampulletjes te steken, deze laatsten met de gewenschte hoeveelheid aethyleenoxyde. Om de halzen van de kleine ampulletjes, bevonden zich aan beide uiteinden, door watten-proppen afgesloten buisjes (de ampulletjes waren, vóór het vullen, met buisje en al gesteriliseerd); het, buiten de watten-prop uitstekende gedeelte van den hals werd, na vulling, dicht gesmolten, zoodat de ampulletjes tot nader gebruik bewaard konden blijven. Het behoeft geen betoog, dat tijdens het vullen, de ampulletjes in een koudmakend mengsel werden afgekoeld.

We verwijderden het omhullende buisje en braken het halsje zoodanig af, dat we een steriel gedeelte over hielden, staken dit in de vernauwing van de voorbereide vergistingsbuizen, en dreven vervolgens het aethyleenoxyde — door met de hand het ampulletje te verwarmen — in het peptonwater, waarna de buis dadelijk bij de vernauwing, werd dicht gesmolten.

Na zeven dagen broeden bij 37° openden we de buizen, entten direct een oogje van den inhoud op bouillon, om te kunnen constateeren of de bacteriën nog in leven waren en onderzochten den inhoud op acetaldehyde en pH.

Na opening konden we slechts bij één buis nog een weinig overdruk waarnemen.

Wij laten de resultaten hieronder volgen:

TABEL 34.

Vergisting van aethyleenoxyde.

				groei	pH	acetaldeh.	Pept.water + B.	
							groei	pH
Peptw. +	aethyl.ox.				8,4	sp.		
" +	" +	No. 4		—	8,5	"	+	6,8
" +	" +	" 16		—	8,4	"	+	6,9
" +	" +	" 19		—	8,5	"	+	7
" +	" +	krijt			8,7	"		
" +	" +	" +	No. 4	—	8,3	"	+	7,3
" +	" +	" +	" 16	—	8,4	"	+	7,6
" +	" +	" +	" 19	—	8,3	"	+	7,6

Opmerkelijk is de sterke toename van de pH na toevoeging van aethyleenoxyde, welk toename we eveneens opmerkten bij de buizen, waarin geen bacteriën gebracht waren.

Daarom besloten we het gedrag van aethyleenoxyde t.o.v. peptonwater, nog nader te onderzoeken; hiervoor werden de volgende proeven ingezet. Dezelfde methodiek werd gevolgd.

TABEL 35.

								pH
12 cm ³	peptw. +	aethyl.ox.	na 7 dagen	staan bij	35°			12
12 "	"	zonder	" 7 "	"	35°			6,8
12 "	water +	"	" 7 "	"	35°			6,7
	peptw. vóór	sterilisatie	zonder		35°			6,8
	" ná	"	"		35°			6,8
	water +	aethyl.ox.	"		35°			5,4
	"	zonder	"		35°			5,3
gesterilis.	"	"	"		35°			6

De zeer sterke toename van de pH van peptonwater, waaraan aethyleenoxyde is toegevoegd, wijst op het ontstaan van een verbinding van het aethyleenoxyde met bestanddeelen van het pepton.

Wanneer er dus bij de vergisting van glycol eveneens aethyleenoxyde als tusschenproduct zou ontstaan, zou dit ook aan de pepton gebonden worden, waardoor de pH zou moeten stijgen; dit namen we echter bij de vergisting van glycol, niet waar.

De bacteriën bleken de toevoeging van aethyleenoxyde niet te overleven. Dit zou eveneens op een verbinding tusschen het bacterie-eiwit en aethyleenoxyde wijzen.

Het lijkt ons derhalve niet waarschijnlijk, dat, bij de vergisting van glycol, aethyleenoxyde als tusschenproduct optreedt.

j. Vergisting van dioxaan .

Zooals nog nader in hoofdstuk IX zal worden besproken, betrokken we ook dioxaan in dit onderzoek om te kunnen vaststellen, of dit als tusschenproduct bij de vergisting van glycol zou optreden.

Het dioxaan is een kleurlooze vloeistof met kpt. van $\pm 111^{\circ}$, doch zeer vluchtig; door deze eigenschappen waren we genoodzaakt, de vergisting in een dicht gesmolten vat te laten verlopen.

De kwalitatieve vergisting ondernamen we op gelijke wijze als reeds, onder paragraaf i. van dit hoofdstuk, beschreven werd voor aethyleenoxyde.

De toevoeging van de 2 % dioxaan ging echter veel eenvoudiger. Na het dioxaan steriel gedestilleerd te hebben, pipetteerden wij de gewenschte hoeveelheid met behulp van een — in de vernauwing van de cultuur-buis passende — steriele pipet in den voedingsbodem.

Na 7 dagen broeden, onderzochten we de vloeistof op levende bacteriën, acetaldehyde en pH; de resultaten zijn in onderstaande tabel vereenigd.

TABEL 36.

		groei	pH	acetalddh.
Peptonw.	zonder dioxaan en bacteriën	—	7,1	—
„	met „ zonder „	—	7,1	—
„	„ „ + No. 4	+	6,0	sp.
„	„ „ + „ 16	+	6,3	sp.
„	„ „ + „ 19	+	6,5	—
„	zonder „ met krijt	—	7,9	—
„	met „ „ „	—	7,9	—
„	„ „ + „ + No. 4	+	6,9	sp.
„	„ „ + „ + „ 16	+	7,3	sp.
„	„ „ + „ + „ 19	+	7,3	sp.

Het dioxaan had dus geen giftige uitwerking op deze organismen; het werd er door ontleed onder vorming van zuur en in sommige gevallen van acetaldehyde. Deze resultaten wilden we nog eens nader toetsen aan een kwantitatieve vergisting.

De vergisting voerden we in dezelfde apparatuur, welke we ook voor de glycol vergistingen gebruikten, nl. een Erlenmeyer met aangesmolten rondbodern, onder anaërobie omstandigheden, uit.

Als voedingsbodern diende: 200 cm³ peptonwater van 1 %, ½ % keukenzout en 2 % krijt; hiearaan voegden we, na de sterilisatie, 2 % steriel dioxaan toe.

We voorzagen de eerste buis van het opvang-toestelletje met een verzadigde sublimaat-oplossing; door het ontstaan van een neerslag in deze buis konden we zoodoende controleeren of er dioxaan uit het gistingvat ontweek.

De tweede en derde buis werden met bisulfiet-oplossing gevuld, om het, eventueel ontwijkende acetaldehyde, vast te leggen.

Na 12 dagen broeden bij 37° bepaalden we de quanta gevormd acetaldehyde en azijnzuur.

Het vaststellen der hoeveelheden van het niet ontlede dioxaan en de gevormde alkohol, werd, wegens de groote moeilijkheden welke deze bepalingen thans zouden opleveren, achterwege gelaten.

Wij lieten het dioxaan door de Coli-stam No. 4 en door de Enteritidis Gärtner-stam No. 19, vergisten en vonden voor beide stammen slechts sporen acetaldehyde en respectievelijk 0,1141 en 0,0852 g uit dioxaan gevormd, azijnzuur.

Het blijkt dus wel, dat dioxaan door deze organismen ontleed wordt, hoewel de vergistingssnelheid achterblijft bij die van glycol.

De mogelijkheid van dioxaan als tusschenproduct bij de vergisting van glycol, werd door de resultaten van deze proeven in ieder geval niet uitgesloten, doch zou alleen bevestigd kunnen worden door het vinden van dioxaan in het vergistingssubstraat.

Daartoe zetten wij drie kolven, ieder met 1 liter van den sterielen voedingsbodern, bestaande uit: 1 % pepton (Witte), ½ % keukenzout en 2 % glycol, in; de kolven waren, evenals bij de voorgaande proeven, warm met stikstof verzadigd, en gesloten

met een stop, welke van doorboringen, waarin de gebruikelijke buizen staken, voorzien was. De afvoer was aangesloten aan het reeds eerder beschreven, met bisulfiet oplossing gevulde, apparaat voor het opvangen van eventueel ontwijkend acetaldehyde en tevens om het geheel van de lucht af te sluiten. Een van de kolven lieten wij steriel, de twee andere werden respectievelijk geënt met een suspensie van *B. enteritidis* Gärtner No. 19 en *B. coli* No. 4. Na een verblijf van tien dagen in de broedkamer bij 37°, goten wij de inhoud der kolven in perforatoren, en extraheerden, gedurende acht uur, met aether, zooals reeds op blz. 33 beschreven werd. Daar de beide substraten zwak zuur reageerden, maakten we ze vervolgens zwak alkalisch, extraheerden nogmaals gedurende acht uur en onderzochten de extracten, volgens de op bladz. 34—36 beschreven methode, op dioxaan.

Uit geen dezer kon genoemde verbinding geïsoleerd worden.

De mogelijkheid van het ontstaan van dioxaan gronden wij tevens op het volgende:

Wij namen waar, dat bij sommige vergistingen, na eenigen tijd een roode verkleuring van het substraat optrad, nadat het phosphor-wolframzuur-zwavelzuur-mengsel toegevoegd was, tevens werd de bovenste laag van het pepton-neerslag rood gekleurd, welk verschijnsel slechts optrad bij de, door indol-vormende-bacteriën veroorzaakte vergistingen. Deze roode kleur had een andere nuance, dan die, welke ontstaat bij de indol-reactie volgens Kitasato, (met zwavelzuur en kaliumnitriet-oplossing); bovendien konden wij in het gistingssubstraat, noch nitriet, met het reagens van Griess-Romijn, noch nitraat met de reactie volgens Tillmans, aantoonen.

Uit proeven bleek ons nu het volgende:

Nitriet-vrij-peptonwater, waaraan eenig indol en dioxaan was toegevoegd, gaf na eenigen tijd staan met phosph. wolfrz. opl. dezelfde roode verkleuring, welke wij na toevoeging van dit reagens aan het vergistingssubstraat, verkregen, terwijl peptonwater plus een weinig indol, de rood-kleuring door phosph. wolfrz. niet vertoonde.

HOOFDSTUK IX.

BESPREKING VAN DE VERKREGEN RESULTATEN.

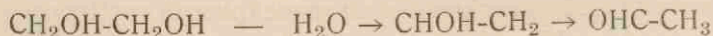
De vergisting van aethyleenglycol werd bestudeerd in de veronderstelling, dat deze eenvoudige verbinding ook een eenvoudig gistingsschema zou opleveren, waaronder te verstaan is: weinige, en direct uit glycol af te leiden gistings-producten. Hiervoor werden alleen acetaldehyde, azijnzuur en alcohol gevonden.

Daar het ontstaan dezer producten niet direct uit glycol af te leiden is, nam Le Fèvre⁶⁶⁾ aan, dat aethyleenoxyde hier als tusschenproduct zou kunnen optreden; dit ging dan door intra-moleculaire omlegging over in acetaldehyde, hetwelk op zijn beurt tot azijnzuur werd geoxydeerd.

Het ontstaan van aethyleenoxyde baseert hij op het volgende: glycol laat zich, door verhitten op 500—550° omzetten tot acetaldehyde, terwijl ook het aethyleenoxyde bij deze temperatuur hierin overgaat. Ipatiew³⁶⁾ verkreeg genoemde onzetting bij 250°, door aluminiumoxyde als katalysator te gebruiken.

Hiermede wordt echter nog niet bewezen, dat glycol, bij de vergisting, onder uittreding van de elementen van het water, in aethyleenoxyde zou kunnen overgaan.

Deze reactie is, juist door het ontstaan van een niet spanningsvrijen ring, in het laboratorium tot nu toe niet te verwezenlijken geweest; immers, onder invloed van wateronttrekkende stoffen⁶⁷⁾, ontstaat dan acetaldehyde.



Wel zou dus direct uit glycol acetaldehyde kunnen ontstaan.

Ondanks deze overwegingen hebben wij getracht de mogelijkheid van het optreden van aethyleenoxyde als tusschenproduct, experimenteel — door het te laten vergisten — te onderzoeken. Hierbij bleek ons, dat de pH van een pepton-oplossing, door de

toevoeging van aethyleenoxyde, sterk toenam en de bacteriën in deze oplossing niet in leven bleven *).

De verhooging van de pH, zouden we kunnen verklaren, doordat het aethyleenoxyde zich verbindt met de aminogroepen der bestanddeelen van het pepton en er zich aethylol-aminozuren vormen, evenals dit het geval is bij de reactie van aethyleenoxyde op ammoniak in water (o.a. Knorr ⁶⁸), waardoor dan wellicht, meer alkalisch reageerende verbindingen ontstaan; wij denken hierbij aan de mogelijkheid van lacton-vorming der carboxylgroep met de nieuwe OH-groep.

Het is niet onwaarschijnlijk, dat het aethyleenoxyde zich op dezelfde wijze met het bacterie-eiwit verbindt, waardoor dit laatste verandert en het organisme te niet gaat; dit zou de mogelijke verklaring kunnen geven voor het afsterven der bacteriën.

Op deze gronden meenen wij de vorming van aethyleenoxyde, als tusschenproduct der glycol-vergisting, te moeten afwijzen.

De mogelijkheid werd onderzocht, of een andere verbinding, die ontstaat door het uittreden van de elementen van water uit twee moleculen glycol, nl. het diaethyleen-dioxyde of 1.4-dioxaan, de rol van tusschenproduct bij deze vergisting zou kunnen spelen.

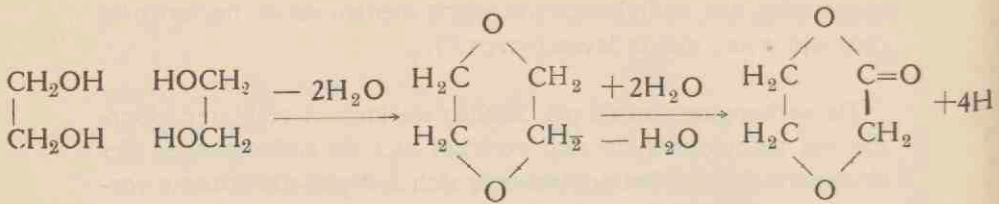
Vooraf de gemakkelijker, waarmede dioxaan, door uittreden van de elementen van water uit twee moleculen glycol, ontstaat ** ³⁸), maakt de vorming van deze verbinding onder den invloed van bacteriën, niet onmogelijk.

Wij stellen ons het chemisme der glycol-vergisting aldus voor: twee moleculen glycol gaan over in dioxaan; dit wordt, met behulp van luchtzuurstof en/of door een hydro-oxydatiereactie, tot mono-oxo-1.4-dioxaan, (een glycolzure-aethyleenester of inwendige lactonaether), geoxydeerd.

Deze stof is door Bischoff en Walden ⁶⁹) verkregen door destilleeren van de verbinding, die ontstaat als men mononatrium-glycol en monochloorazijnester op elkaar laat inwerken.

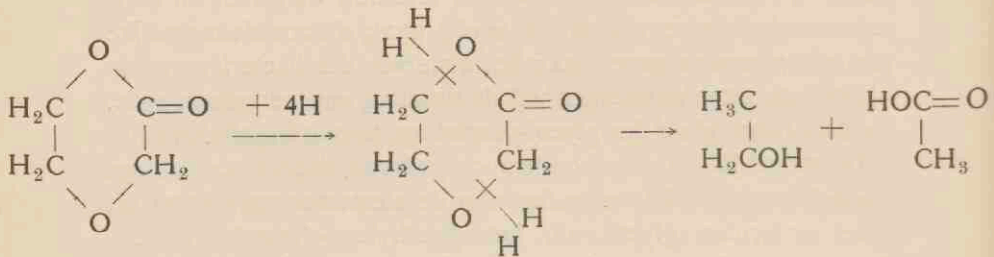
*) Zie bladz. 102—105.

***) Zie bladz. 27.

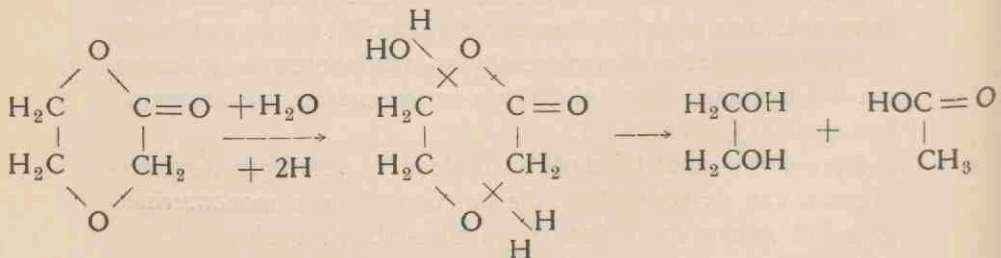


Deze verbinding zou dan de volgende drie omzettingen moeten kunnen ondergaan:

1e. Door reductie met de bij de hydro-oxydatie verkregen vier atomen waterstof, ontleding tot 1 mol. azijnzuur en 1 mol. alcohol.



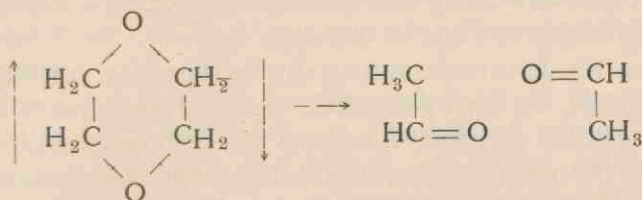
2e. Uit het lacton wordt, door hydrolyse, gevolgd door reductie, één molecule glycol teruggevormd en ontstaat tevens één molecule azijnzuur; hiervoor zijn dan slechts twee atomen waterstof noodig.



Bij de anaërobe gistingen, waar dus de oxydatie tot lacton, met behulp van een hydro-oxydatie-reactie moet verlopen, zal

er dientengevolge waterstof overblijven; evenals dit het geval zou zijn, wanneer door dezelfde oxydatie, uit acetaldehyde, azijnzuur zou ontstaan.

3e. Kan het ontstaan van acetaldehyde, door atoom-verschuiving in het molecule van het dioxaan verklaard worden:



Behalve op de reeds genoemde gronden zouden wij voor de veronderstelling, dat dioxaan als tusschenproduct bij de vergisting van glycol optreedt, nog willen aanvoeren: het ontstaan van pyronderivaten in de natuur en de vorming van heterocyclische stikstof-verbindingen door bacteriën, b.v. het chlororaphine⁷⁰⁾ door *Bacillus chlororaphis*.

Den voornaamsten steun vinden wij echter, in de, zoowel kwalitatief als quantitatief, onderzochte vergisting van dioxaan, die beschreven werd op blz. 105—107. De quantitatieve vergisting leverde echter niet dezelfde hoeveelheden azijnzuur op welke voor de overeenkomstige bacteriën, bij de vergisting van glycol gevonden werden.

Wij trachtten volgens dezelfde *) methode, welke wij toepasten om uit een synthetisch substraat, de kleine hoeveelheid toegevoegd dioxaan, te isoleeren, dit eveneens uit eenige vergistingssubstraten af te zonderen, doch het is ons tot nu toe niet gelukt, in deze substraten dioxaan aan te toonen.

Wel viel het ons op, dat bij eenige vergistingen, na toevoegen van phosphor-wolfram-zwavelzuur — waarmede wij het pepton neersloegen — het substraat een roode kleur aannam. Eveneens verkregen wij een roode verkleuring na vermenging met phosphor-wolfram-zwavelzuur, van een vloeistof, welke dezelfde samenstelling had, als de voor de vergistingen gebruikte steriele voe-

*) Zie bladz. 36.

dingsbodem, waaraan bovendien een weinig dioxaan was toegevoegd. Zonder dioxaan kleurde de vloeistof zich niet met bovengenoemd reagens.

Het zou te gewaagd zijn, hieruit tot de aanwezigheid van dioxaan in de vergistingssubstraten te besluiten; de mogelijkheid, dat de roode verkleuring door dioxaan veroorzaakt wordt is echter op grond hiervan, niet uit te sluiten.

Bezien wij de veronderstelling van het optreden van een tusschenproduct, dat eerst geoxydeerd wordt, alvorens het in azijnzuur en alcohol overgaat, in verband met de door ons verkregen resultaten en nemen wij aan, dat dit tusschenproduct dioxaan zou zijn, dan kunnen we de grootere hoeveelheid azijnzuur ten opzichte van alcohol bij de *aërobe* vergisting, op de volgende wijze verklaren: het dioxaan wordt ten deele met behulp der luchtzuurstof, ten deele door een hydro-oxydatie-reactie, geoxydeerd. Nu zal er niet voldoende waterstof aanwezig zijn voor de totale reductie van het mono-oxo-dioxaan, waardoor aequimoleculaire hoeveelheden azijnzuur en alcohol gevormd zouden worden; er vindt nu tegelijkertijd een verzeeping van een gedeelte van het lacton plaats, waardoor glycol teruggevormd wordt en slechts azijnzuur ontstaat. Door deze beide oxydatie-reactie's wordt al het dioxaan, of *bijna* al het dioxaan in zijn oxo-verbinding omgezet en blijft er weinig over voor het, door intra-moleculaire omzetting, ontstane acetaldehyde: er kan dus weinig acetaldehyde gevormd worden. Bij de *anaërobe* vergisting, kan slechts de hydro-oxydatie-reactie optreden, het, bij deze vergisting in overmaat gevormde azijnzuur, kan wederom ontstaan door een gedeeltelijke verzeeping van het lacton, maar dan blijven er nog twee atomen waterstof onverbruikt, die aan het pepton geadsorbeerd worden. Bij deze vergisting kan er niet-geoxydeerd dioxaan overblijven, dat dan acetaldehyde vormt.

De grootere hoeveelheid acetaldehyde, die ontstaat bij aanwezigheid van sulfiet, volgt uit de verschuiving van het evenwicht mono-oxo-dioxaan — dioxaan, in de richting van het dioxaan, doordat het hieruit gevormde acetaldehyde aan het sulfiet gebonden wordt. De betrekkelijk groote hoeveelheid acetaldehyde, welke gevonden werd in de substraten der gistingen, die in tegenwoor-

digheid van waterstof verliepen, vindt eveneens in een verschuiving van genoemd evenwicht in dezelfde richting zijn verklaring, aangezien de hydro-oxydatie-reactie teruggedrongen wordt door de overmaat waterstof. Het dioxaan wordt nu niet geoxydeerd, doch ontleedt in acetaldehyde, dat op zijn beurt door de aanwezige waterstof tot alcohol gereduceerd wordt, waardoor tevens de overmaat alcohol t.o.v. azijnzuur bij deze vergistingen verklaard is.

Wanneer dioxaan als tusschenproduct bij de vergisting van glycol op zou treden, kan de noodzakelijkheid van het acetaldehyde voor de vorming van azijnzuur en aethylalkohol, vervallen. Het acetaldehyde gaat dan slechts de rol van bijproduct spelen, dit stemt ook beter overeen met de resultaten, welke in tabel 2 vereenigd zijn. Bij de quantitative sulfiet-gistingen werd, behalve door de Paratyphi B.-stam 16, geen of slechts zeer weinig acetaldehyde gevonden, hoewel het ontstaan van azijnzuur en alcohol er op wezen, dat er wel een ontleding van glycol plaats plaats had.

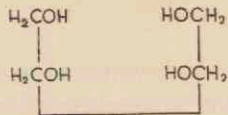
Nog opmerkelijker is het als wij de percentages glycol vergelijken, welke door B. coli st. 4 bij de volgende anaërobe-gistingen, in acetaldehyde omgezet werden:

Met	krijt	+	waterstof	3,26 %
Zonder	„	+	„	1,04 %
Met	„	+	sulfiet en stikstof	2,67 %
Met	„	+	stikstof	spoor
Zonder	„	+	„	„

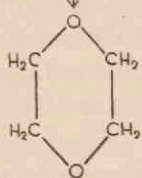
Dan blijkt bij de vergisting in een waterstof-atmosfeer zelfs meer acetaldehyde gevormd te zijn, dan bij de sulfiet-gisting ontstaan is.

Uit deze resultaten meenen wij te mogen afleiden, dat het acetaldehyde niet als tusschenproduct bij de vergisting van glycol optreedt, doch dat het bij een nevenreactie gevormd wordt.

Deze feiten zijn zeer goed te verklaren, wanneer dioxaan als tusschenproduct optreedt; door de aanwezigheid van waterstof wordt de oxydatie van dit laatste tot mono-oxo-verbinding, be-



-2 H₂O



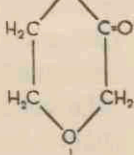
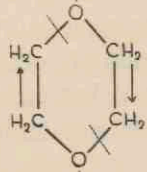
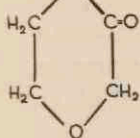
MET LUCHT ZUURSTOF

ZONDER LUCHT ZUURSTOF

+O₂

+H₂O

2 mol.



4 H

4 H

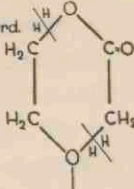
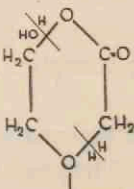
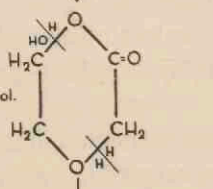
4 H

+2 H₂O

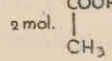
+2 H
+H₂O

2 H

2 mol.



2 mol.



aan pepton geadsorbeerd.

aërobe-gisting

anaërobe-gisting

lemmerd en kan dus meer dioxaan tot acetaldehyde omgelegd worden.

Wij vonden evenals Le Fèvre en anderen, dat het glycol moeilijk vergistbaar is. Ten deele kan dit toegeschreven worden aan een geringe giftige werking van het glycol, waardoor de groei van de bacteriën verminderd wordt, doch zeker is het, dat hier de waterstof acceptie eveneens een rol speelt *), zooals reeds door Braak bij de glycerine-vergisting onderzocht werd.

De moeilijke vergistbaarheid zou veroorzaakt kunnen worden, doordat de som der vrije energieën van de verschillende reactie's gering is; in dit geval zou de energie, die vrij komt bij de adsorptie van waterstof aan het pepton, een rol kunnen gaan spelen. Naar mate het pepton meer met waterstof verzadigd raakt komt er minder beschikbaar, waardoor de bacteriën geen voldoende energie meer kunnen ontleenen aan de reactie's om nieuwe glycol om te zetten; hierdoor komt dan de vergisting tot staan.

Dit zou tevens een verklaring kunnen geven, waarom een vergisting van glycol in een milieu zonder pepton, waar slechts anorganische voedingszouten aanwezig zijn, niet tot stand komt. Tot op heden is er echter van de thermodynamica dezer reactie's nog *tè* weinig bekend, dan dat er met zekerheid een conclusie uit getrokken kan worden.

*) Zie hoofdst. VIII § f.

Samenvatting.

Bij de vergisting van glycol door de bacteriën der Coli-typhus-groep, ontstonden steeds azijnzuur en alcohol; acetaldehyde werd alleen bij de anaërobe vergistingen gevonden; de organismen der Dysenterie-groep vormden onder deze omstandigheden steeds sporen van dit aldehyde. Door het toepassen van de zgn. sulfietgisting konden we voor 46 stammen de acetaldehyde-productie vaststellen.

Voor een Coli-, Typhus-, Paratyphus A-, Paratyphus B-, Enteritidis Gärtner- en een Dysenterie Flexnerstam, werd een kwantitatief onderzoek ingesteld naar deze vergistingsproducten.

Onderzocht werd, in hoeverre waterstof- en pepton toevoeging invloed op de vergisting uitoefenden; dit in verband met de acceptie van waterstof door het milieu.

Er werd geconstateerd, dat pepton toevoeging een vergrooing, en waterstof toevoeging een vermindering van de vergiste hoeveelheid glycol te weeg bracht. De adsorptie van waterstof aan opgeloste pepton konden wij bewijzen.

Tevens meenden wij, uit het al dan niet aanwezig zijn van acetaldehyde in de verschillende vergistingssubstraten, op te mogen maken, dat het acetaldehyde *niet* als tusschenproduct bij de vergisting van aethyleenglycol optreedt, doch de vorming door een *nevenreactie* plaats vindt.

Wij namen aan, dat er een tusschenproduct ontstaat, hetwelk eenerzijds geoxydeerd, anderzijds door intra-moleculaire atoomverschuiving, tot acetaldehyde omgezet wordt. Uit de geoxydeerde verbinding zouden dan azijnzuur en alcohol ontstaan. Voor dit tusschenproduct maakten wij het dioxaan aannemelijk, terwijl wij het optreden van aethyleenoxyde in dit verband moesten verwerpen.

LITTERATUUR-OVERZICHT.

- 1 A. von Bayer, B. **3**, 74 (1870).
- 2 E. Buchner u. J. Meisenheimer, B. **43**, 1773 (1910).
- 3 W. Loeb, Z. f. Elektrochemie **13**, 511—516; C. (1907) II, 1256.
- 4 A. Wohl, Bio. Zs. **5**, 45 (1907).
- 5 Fernbach en Schoen, C.R. **151**, 1004 (1910).
- 6 Neubauer, Dtsch. Arch. klin. med. **95**, 120 (1909). Zs. physiol. Chem. **70**, 326 (1911).
- 7 Ehrlich, Biochem. Zs. II, **57** (1906).
- 8 Neuberger en Fromherz, H. **70**, 350 (1911).
- 9 Neuberger en Hildesheimer, Bio. Zs. **31**, 170 (1911).
Neuberger en Hildesheimer, Bio. Zs. **58**, 158 (1913).
- 10 Neuberger, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle, Jena 1913.
- 11 Connstein en Lüdecke, B. **52**, 1385 (1919).
- 12 Neuberger en Faber, Bio. Zs. **78**, 238 (1916).
- 13 C. Neuberger u. J. Hirsch, Biochem. Z. **96**, 189 (1919).
- 14 Lebedew, B. **47**, 667 (1914).
- 15 A. Harden, Journ. chem. Soc. **79**, 610 (1910).
- 16 E. C. Grey, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **87**, 472 (1914).
- 17 C. Neuberger en F. F. Nord, Bio. Zs. **96**, 133 (1919); C. Neuberger en F. F. Nord en E. Wolff, Bio. Zs. **112**, 144 (1920).
- 18 W. C. de Graaff, De gemengdzure-gisting Ned. Tsch. Hyg. Microbiol. en Serologie **1**, 43—70 (1926).
- 19 M. A. Scheffer, De suikervergisting door bacteriën der Coli-groep. Diss. Delft (1928).
- 20 A. J. Kluyver, The chemical activities of microorganisms; Univ. of London Press. Ltd. (1931).
- 21 Brown, Journ. Chem. Soc. Vol. **51**, 638 (1887).
- 22 Henneberg, Die deutsche Essigindustrie Bd. 2 Nr. 19 (1898).
- 23 Seifert, Centr. f. Bakt. II Bd. **3**, 386 (1897).
- 24 Waterman, Centr. f. Bakt. II Bd. **38**, 460 (1913).
- 25 A. Harden en Mrs. D. Norris, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **84**, 492—499 (1912).

- 26 F. Visser 't Hooft, Diss. Delft (1925), 33, 34.
- 27 Siegwart Herman, Biochem. Zs. **205**, 297—305 (1928).
- 28 Ida Smedley, Maclean en Dorothy Hoffert, Biochemical Journ. **20**, 343—357 (1926).
- 29 Teizo Takahashi and Toskinobu Asai, Bull. agricult. chem. Soc. Japan **8**, 9 (1932).
- 30 Hans Mosel, Zbl. Bakt. Pars. Infectkrh. Abt. II **87**, 193—229 (1932).
- 31 E. Ch. Grey, Proc. Roy. Soc. **96 B.**, 160 (1924).
- 32 A. J. Le Fèvre, Bijdrage tot de kennis der bacteriële gisting Diss. Utrecht (1924).
- 33 Diss. L.F. blz. 22.
- 34 Diss. L.F. blz. 43, 44.
- 35 Diss. L.F. blz. 60—71.
- 36 Ipatiew, B. **36**, 2016 (1903); Ann. **335**, 197 (1904).
- 37 Eigenberger, J. prakt. Chem. **130**, 175 (1931).
- 38 A. Faworsky, J. Russ. Phys. Chem. Soc. **38**, 741 (1906); C. (1907) I, 15.
- 39 F. Ph. A. Tellegen, Dioxaan en derivaten Delft (1934).
- 40 Rimini, C. (1898) II, 277.
- 41 F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie 126 (1911).
- 42 Berthelot, C. (1904) II, 7.
- 43 A. Würtz, Ann. ch. (3) **69**, 323 (1863); J. 485 (1863); zie eveneens H. Reinboldt und R. Boy, J. prakt. Ch. (2) **129**, 273 (1931).
- 44 E. Patterno en R. Spallino, A. d. Reale ac. d. Lincei (V) **16**, 87 (1907).
- 45 Sérulas zie Schoorl organische analyse II, 5; C. (1831), 868.
- 46 H. R. Braak, Diss. Delft (1928), 63.
- 47 Schoorl organische analyse II, 48.
- 48 Harden and Mrs. D. Norris, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **84**, 492—499 (1912).
- 49 Theodore E. Friedemann and Arthur I. Kendall, The determination of Lactic acid, J. Biol. chem. Vol **82**, 24 (1929).
- 50 A. J. Le Fèvre, Diss. Utrecht (1924), 60—62.
- 51 Zie eveneens J. G. Imhof, diss. Utrecht (1932), 84.
- 52 F. B. Seibert, J. Biol. Chem. **70**, 265 (1926).

- 53 Zie eveneens J. G. Imhof, diss. Utrecht (1932), 20.
- 54 Ripper, Monatsh. f. Chem. **22**, 1079 (1900); zie eveneens Lange-Dijk, Rec. **46**, 219 (1927).
- 55 M. A. Scheffer, Diss. Delft (1928), 77; Dr. A. Tasman en Dr. A. W. Pot Antonie van Leeuwenhoek, Ned. tschr. voor Hyg. Microb. en Serologie, Deel **2**, 14 (1934).
- 56 Olmsted, J. Biol. chem. **85**, 109; C. (1930), I, 1985.
- 57 Fincke, Z. f. Unt. Nahr. u. Genussmittel **21**, 1 (1911).
- 58 Gorr en Wagnet, Bioch. Zs. **161**, 488 (1925); H. R. Braak, Diss. Delft (1928), 72.
- 59 Northrop, J. of biol. chem. **39**, 1 (1919).
- 60 M. A. Seidenfeld en P. J. Harzlik, C. (1932) II, 242; J. Pharmacol. exp. Therapeutics **44**, 109—121 (1932).
- 61 Wolf Kritchevsky, C. (1932) I, 95; C. (1931) II, 2032; J. Pharmacol. exp. Therapeutics **42**, 355—372 (1931).
- 62 Reid Hunt, C. (1932) II, 2610; Ind. engin. chem. **24**, 361 (1932).
- 63 Braak, Diss. Delft (1928), 178.
- 64 D. D. van Slijke, J. of biol. chem. **78**, 805 (1928).
- 65 James L. Stoddard, J. of biol. chem. **71**, 655, 677, 681 (1926—'27).
- 66 Le Fèvre, Diss. Utrecht (1924), 80.
- 67 P. Karrer, Lehrbuch der organischen Chemie (1928), 241.
- 68 Knorr, B. **32**, 729 (1899).
- 69 Bischoff en Walden, B. **27**, 2940 (1894); Bischoff, B. **40**, 2803 (1907); Henry, Bull. de l'Acad. royale de Belgique **482**, 558 (1902).
- 70 Kögl en Postowsky, A. **480**, 280—297 (1930); Kögl, Tönis en Groenewegen, A. **497**, 265—289 (1932).
-

STELLINGEN.

I

De door Kritschewski en Panomarewa als ware pleomorfe individuen aangeduide vormen voor *B. paratyphi B.*, moeten als teratologische vormen worden opgevat.

Zbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankh. Bd. 91, 485 (1934—'35).

Journ. of Bacter. vol. 28, 111—126 (1934).

II

De aan gedestilleerd water toegeschreven bactericide werking kan door sporen van colloïdale verontreinigingen veroorzaakt worden.

Prica, M., Zbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde und Infekt.-krankh. Bd. 91, 486 (1934—'35).

Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116, 385—396 (1934).

III

Bij het vergelijken van de, door bacteriën geproduceerde hoeveelheden gas, moet met de eventueele verandering in de, tot de vergistingen toetredende, lichtstralen rekening worden gehouden.

Guerrini, G., Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6, 124—126 (1934).

Zbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankh. Bd. 92, 197 (1935).

THE HISTORY OF

THE HISTORY OF THE UNITED STATES OF AMERICA
FROM THE FIRST SETTLEMENTS TO THE PRESENT TIME
BY CHARLES C. SMITH

THE HISTORY OF THE UNITED STATES OF AMERICA
FROM THE FIRST SETTLEMENTS TO THE PRESENT TIME
BY CHARLES C. SMITH

THE HISTORY OF THE UNITED STATES OF AMERICA
FROM THE FIRST SETTLEMENTS TO THE PRESENT TIME
BY CHARLES C. SMITH

IV

Waterstof is voor vergistingen geen indifferent gas te noemen.

V

De aanwezigheid van acetaldehyde gaat niet altijd met die van acetoïne en diacetyl gepaard.

Margaret Dampier Wetham, *The Australian J. of Exp. Biol. Medical Sc.* (1927).

VI

Vitamine B₂ is niet identiek met lactoflavine.

Elvehjem and Koehn, *J. Biol. Chem.* 108, 709 (1935).

Chick, Copping, Edgar, *Bioch. J.* 29, 722 (1935).

Gyorgy, " " 29, 741 "

" " " 29, 760 "

" " " 29, 767 "

L. J. Harris, " " 29, 776 "

VII

Zware waterstof moet worden opgevat als een isotoop van gewone waterstof.

M. Polanyi, *Nature* Vol. 135 No. 3401, 19 (1935).

VIII

Voor talrijke proeven in het onderzoek van Katsurai, betreffende den invloed van temperaturen boven de 100° op eenige anorganische colloïden, is het, voor hem blijkbaar onverwachte resultaat, vooruit te voorspellen.

T. Katsurai, *Kolloid Zschr.* Bd. 71, 169 (1935).

IX

Lactide (dilacton) komt in handelsmelkzuur niet, of althans in uiterst geringe mate voor.

R. Dietzel u. R. Krug, *B.* 58, 1307 (1925) II.

R. Eder u. Kutter, *Helv. Chim. Act.* IX, 355, 557 (1926).

M. Gehrke u. H. H. Willrath, *Zschr. f. Physk. Chem.* Bd. 142, 301 (1929).

G. I. Thurmond and G. Edgar, *The J. of Ind. and Eng. Chem.* Vol. 16, 823 (1924).

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHILOSOPHY DEPARTMENT

PHILOSOPHY 101

LECTURE NOTES

BY [Name]

DATE

CHICAGO, ILL.

U

1