Een onderzoek naar de groeifactoren van staphylococcus aureus

EEN ONDERZOEK NAAR DE GROEIFACTOREN VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

W. J. VAN WAGTENDONK

EEN ONDERZOEK NAAR DE GROEIFACTOREN VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Diss. Utrecht 1937

EEN ONDERZOEK NAAR DE GROEIFACTOREN VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS Dr. J. BOEKE, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN DER FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 8 NOVEMBER 1937, DES NAMIDDAGS TE VIER UUR

DOOR

WILLEM JOHAN VAN WAGTENDONK

GEBOREN TE BATAVIA.

DRUKK. BROEKHOFF N.V. v.h. KEMINK EN ZOON, DOMPLEIN 2, UTRECHT
1937

AAN MIJN OUDERS.
AAN LIEN.

Nu door het verschijnen van dit proefschrift mijn studie aan de Utrechtse Universiteit een einde heeft genomen, wil ik U, Oud-Hoogleraren, Hoogleraren en Lectoren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, hartelijk dank zeggen voor mijn wetenschappelijke opleiding.

Hooggeleerde Kögl, Hooggeachte Promotor, U dank ik in het bijzonder voor het vele, dat ik van U mocht leren en voor het assistentschap, dat Gij mij hebt verleend.

Verder dank ik al mijn collega's en het personeel van het Organisch-Chemisch Laboratorium voor hun medewerking.

INHOUD.

INLEIDING.

Het is van ouds bekend, dat de groei zonder uitzondering afhankelijk is van de toevoer of de productie van voedselstoffen. Nog een tiental jaren geleden moest men veronderstellen, dat dit levensverschijnsel uitsluitend gereguleerd wordt door een samenwerking van de talrijke enzymen. Eerst in de jongste tijd heeft men gevonden, dat bij de regeling van de plantaardige groei bepaalde phytohormonen respectievelijk groeistoffen een belangrijke rol spelen. Het zekere bewijs daarvoor werd het eerst bij de celstrekking geleverd. F. Kögl en zijn medewerkers A. J. Haagen Smit, H. Erxleben en D. G. F. R. Kostermans zijn, steunend op het botanisch werk van de school van wijlen F. A. F. C. Went — erin geslaagd, de vooral bij de celstrekking werkende auxinen uit verschillende bronnen in gekristalliseerde vorm af te scheiden en hun constitutie op te helderen. De belangrijkste stoffen van deze groep zijn auxine-a ($C_{18}H_{32}O_5$) en auxine-b ($C_{18}H_{30}O_4$); later werd gevonden, dat ook β-indolylazijnzuur (hetero-auxine) een werkzaamheid vertoont, welke in vele opzichten overeenkomt met die van auxine-a.

Schematisch kan men bij een plantaardige cel drie stadia in de groei onderscheiden, te weten celdeling, plasmagroei en celstrekking. Het begrip celdeling behoeft hier geen toelichting, wel echter het pas twee jaar geleden door F. Kögl en verschillende botanici ingevoerde begrip plasmagroei. Dit stadium is vooral gekarakteriseerd door de toeneming aan protoplasma, waarbij de dochtercel tot de grootte van de moedercel uitgroeit.

Een tweede groep van onderzoekingen van F. Kögl heeft zich bezig gehouden met de stoffen, welke bij de vermeerdering van de gistcellen en waarschijnlijk in het algemeen bij celdeling en plasmagroei van betekenis zijn. Hun bestaan werd in het jaar 1901 door E. Wildiers ontdekt en van hem is ook de naam „bios" afkomstig, waaronder deze groep van stoffen ook heden nog samengevat wordt.

Twee bios-componenten waren door oudere onderzoekingen reeds bekend, en wel meso-inosiet (E. V. Eastcott, 1928) en aneurine (R. J. Williams en R. R. Roehm, 1930). In het jaar 1934 hebben F. Kögl en B. Tönnis een derde bios-factor, het biotine, geïsoleerd. Het uit eigeel verkregen actieve kristallisaat is volgens een onderzoek van F. Kögl en L. Pons een methylester van de samenstelling $C_{11}H_{18}O_3N_2S$. Dat de werking van biotine niet beperkt is tot bepaalde gistrassen werd voor het eerst bewezen door een onderzoek van F. Kögl en A. J. Haagen Smit over de groei van geïsoleerde embryonen van erwten.

Het is nu reeds zeker, dat behalve inosiet, aneurine en biotine nog andere bios-factoren bestaan, en het is van belang te onderzoeken, welke van deze factoren bij de overige schimmelsoorten en bij bacteriën een rol spelen.

F. Kögl en N. Fries hebben te dien opzichte de groei van verschillende schimmelsoorten bestudeerd en ook schrijver van dit proefschrift heeft in oriënterende proeven de groei van een schimmel *(Aspergillus niger)* nagegaan. Zijn voornaamste taak was echter de studie van de groeibevorderende factoren van een pathogene bacterie, en wel van *Staphylococcus aureus*.

HOOFDSTUK I.

Andere onderzoekingen over de groeifactoren van bacteriën.

Men kan de bacteriën, al naar de samenstelling van hun voedingsbodems, in twee grote groepen verdelen. De eerste wordt gevormd door de bacteriën, welke op media van eenvoudige samenstelling kunnen groeien, terwijl de tweede die organismen omvat, welke gecompliceerde media nodig hebben om tot ontwikkeling te kunnen komen.

Op een paar uitzonderingen na behoren tot de eerste groep bacteriën, welke van medisch standpunt bekeken van weinig belang zijn, hoewel zij in economisch opzicht vaak een grote rol kunnen spelen. De pathogene bacteriën behoren voornamelijk tot de tweede groep. Het is opvallend, dat de meeste pathogene organismen juist hierin thuis horen, en men zou kunnen vermoeden, dat dit een diepere oorzaak heeft.

In vele gevallen (meningococcen, haemolytische streptococcen) is het noodzakelijk, dat aan de voedingsbodem bepaalde stoffen (ascitesvocht, bloedserum of bloed) toegevoegd worden. Slechts dan kunnen de bacteriën tot ontwikkeling komen. De hoogmoleculaire eiwitten, die in de genoemde vloeistoffen voorkomen, kunnen vervangen worden door eenvoudiger verbindingen, maar dan blijkt dat er nog bepaalde stoffen toegevoegd moeten worden om de voedingsbodem geschikt te maken voor deze bacteriën.

Zoals bij de dierlijke organismen hormonen en vitaminen een grote rol spelen, hebben wij ook bij de plantaardige organismen, volgens de recente onderzoekingen, met soortgelijke katalysatoren te rekenen. De naam bio-„katalysatoren" duidt al aan, dat deze stoffen hun invloed in zulke kleine concentraties uitoefenen, dat daarbij hun calorische waarde van geen belang kan zijn.

Reeds in 1901 werd door E. Wildiers[84]) gewezen op de belangrijkheid van factoren, welke bij de groei van micro-organismen een rol spelen. Deze onderzoeker nam waar, dat waterige extracten van gist in zeer sterke mate de groei van dit organisme in een synthetisch milieu bevorderden.

Pas 15 jaar later heeft men het onderzoek naar de groeibevorderende factoren voor micro-organismen voortgezet.

Volgens de onderzoekingen van Dorothy J. Lloyd[41, 42, 43]) zijn voor de groei van *Meningococcen* behalve aminozuren ook groeistoffen („vitamines") nodig. Zij vond, dat bij aanwezigheid van veel vrije aminozuren de *Meningococcus* zonder toevoeging van „vitamine" groeide, het vitamine was noodzakelijk wanneer in het medium weinig aminozuren aanwezig waren. Volgens haar opvatting zouden de aminozuren de essentiëele voedingsstoffen zijn, terwijl de functie van de vitaminen hierin zou bestaan, dat zij het proteïne-evenwicht in de cel gunstig beïnvloedden, waardoor de groei versneld werd. Deze vitaminen zouden in bloed en melk aanwezig zijn.

M. Flack[18]) toonde aan, dat de groeistoffen, noodzakelijk voor de groei van de *Meningococcus*, in erwten

voorkomen, terwijl F. Eberson[10]) de aanwezigheid hiervan in gist vaststelde.

M. H. Gordon en T. G. M. Hinne[21]) bevestigden het resultaat van D. J. Lloyd, dat bloed een groeibevorderende factor bevat.

Iets meer van de aard van deze stof komen we te weten door de publicatie van C. Shearer[68]). De factor is oplosbaar in water, minder in aethanol en slecht oplosbaar in aether. Bovendien is de factor thermostabiel, terwijl de activiteit niet vernietigd wordt, door de extracten gedurende 12 uur met sterk zoutzuur te koken.

Ofschoon de eigenschappen van deze groeifactoren voor het verdere onderzoek niet ongunstig leken te zijn, is het onderwerp hierna niet meer bestudeerd.

Het onderzoek naar de groeifactoren voor *haemolytische streptococcen* is ook nog niet ver gevorderd.

Onderzoekingen van B. Leichtentritt en M. Zielaskowsky[39, 40]), evenals die van S. Hosoya en M. Kuroya[25]) wezen uit, dat deze factor (of factoren) in vele dierlijke en plantaardige extracten, in vruchtensap, gist enz. voorkomt.

J. H. Mueller[48, 49, 50]) heeft pogingen in het werk gesteld, deze groeifactoren te isoleren. Daartoe ging hij uit van pepton en gehydrolyseerde gelatine. Hieruit isoleerde hij twee fracties, die de groei van *Streptococcus haemolyticus* bevorderden. Een hiervan werd door Ag_2SO_4 neergeslagen. Uit het filtraat isoleerde hij een nieuw aminozuur, het methionine ($C_5H_{11}O_2NS$), dat echter op zichzelf niet verantwoordelijk was voor de activiteit van de fractie.

L. Freedman en C. Funk[19, 20]) slaagden erin, de

groeibevorderende factoren door adsorptie aan vollers aarde of noriet uit extracten van rundvlees en gist in geconcentreerde vorm te verkrijgen.

Volgens H. R. Whitehead[81, 82, 83]) was een anorganisch phosphaat onontbeerlijk voor de groei.

H. Davidson[5]) vergeleek de eigenschappen van de groeifactor met die van het vitamine B-complex en het bios-complex van Wildiers. Bij verwarming en bij behandelen met alkali schenen de factoren stabieler te zijn dan het „vitamine B" en minder stabiel dan Wildiers' bios.

Vele onderzoekers hebben zich gewijd aan de bestudering van de groeibevorderende factoren van *Bacterium influenzae* Pfeiffer. In het jaar 1918 nam men, in overeenstemming met het toen heersende standpunt aan, dat de vitaminen bij de groei van deze bacteriën een rol spelen.

H. Agulhon en R. Legroux[1]) gaven blijk, reeds toen een zuiver inzicht in het groeistoffenprobleem gehad te hebben: „L'influence favorisante des liquides naturels (sang, sérum, ascite, etc.) sur les cultures des micro-organismes est expliquée non plus par l'introduction dans le milieu d'albumines intactes, mais par la présence de vitamines de croissance dans ces liquides"
en verder:

„D'autres microbes peuvent profiter de l'addition de solutions de vitamines. Les vitamines ne semblent pas être spécifiques pour une seule ou quelques espèces bactériennes. D'autre part il faudra rechercher les différentes sources de vitamines, étudier leur électivité, si elles en possèdent, essayer de déterminer leur nature, le mécanis-

me de leur action. Ces catalysateurs de croissance doivent-ils, comme les diastases, leur activité à un état physique particulier, ou bien seulement à leur composition chimique? Certaines de leurs propriétés, que nous avons précisées, rendent la première hypothèse assez vraisemblable."

Maar ook deze auteurs hebben slechts de aanwezigheid van een groeibevorderende factor waarschijnlijk kunnen maken, terwijl ook R. Legroux en J. Mesnard[38]) geen vorderingen gemaakt hebben.

B. influenzae Pfeiffer heeft, om normaal te kunnen groeien, een ingewikkeld complex van factoren nodig. Twee daarvan zijn scherp te onderkennen; het zijn de bekende factor X en factor V.

T. Thjötta en O. T. Avery[71, 72]) beschrijven de factor V als een vitamine-achtige stof, welke uit rode bloedlichaampjes, gist en groenten geëxtraheerd kan worden. De factor zou volgens deze auteurs thermolabiel zijn. De factor X zou ook in rode bloedlichaampjes voorkomen, maar thermostabiel zijn. Terwijl men enige tijd veronderstelde, dat factor V identiek zou zijn met „vitamine C", toonde K. Meyer[45, 46]) aan, dat ascorbinezuur geen groeibevorderende invloed op de influenzabacil had.

De factor V wordt door verschillende bacteriën (o.a. *B. haemoglobinus canis)* gesynthetiseerd, zoals uit onderzoekingen van D. J. Davis[6, 7, 8]), P. Fildes[12, 13, 14]) en F. C. O. Valentine en T. M. Rivers[75]) bleek.

De factor X hangt samen met het bloedpigment. Haemoglobine zelf is inactief, het haematine is actief. De activiteit schijnt hoofdzakelijk een gevolg te zijn van het komplex gebonden ijzer, daar de nauwverwante ijzervrije

pyrrolderivaten inactief zijn. Volgens L. T. Webster en O. Baudisch[78]), alsmede volgens O. Baudisch[2]) schijnen zelfs bepaalde Fe_2O_3-praeparaten een grote rol te spelen *).

Veel aandacht is besteed aan het vraagstuk van de groei van het *Mycobacterium tuberculosis hominis*, de verwekker van de tuberculose. Bij het kweken van deze bacterie is het vooral opvallend, dat het zeer moeilijk is om door directe overenting uit tuberculeus materiaal, van dit organisme culturen in vitro te verkrijgen.

H. G. Wells en E. R. Long[79]) schrijven:

„Massive growth in synthetic media compounded from pure chemicals indicates that in ordinary culture it is not dependent on outside sources for the accessory growth factors necessary for many higher forms of live. Nevertheless, the experience of original isolation from infective materials, and of inoculation with minute seedings teaches that some accessory factor is necessary. Synthetic media are not suitable for first isolation and cultivation in them is not successful following inoculation of a small number of bacilli."

Niettegenstaande de zeer moeilijke isolatie, blijkt het daarna mogelijk te zijn, de tuberkelbacil op betrekkelijk eenvoudige media te kweken, hetzij om tuberculine te verkrijgen, hetzij voor het onderzoek naar specifieke polysacchariden (G. A. C. Gough[22, 23])).

A. Borrel en medewerkers[3, 4]) vonden, evenals H. Schmidt[66]), dat in oude culturen van de tuberkelbacil, maar ook in culturen van schimmels, die tot het ge-

*) Uit zeer recente onderzoekingen van A. Lwoff en M. Lwoff (Comp. rend. 204, 1510 (1937)) is gebleken, dat de factor V identiek is met cozymase, terwijl de factor X het haematine is.

slacht *Mucor* behoren, groeibevorderende factoren aanwezig waren. Wangliang[76]) kwam tot dezelfde conclusie, terwijl hij bovendien de aanwezigheid van deze factoren in tomaten aantoonde.

Uit wat tot nu toe bekend is kan men de conclusie trekken, dat de tuberkelbacil direct na de overenting uit tuberculeus materiaal, bepaalde groeistoffen nodig heeft, welke de bacterie eerst in het organisme van den gastheer aantrof. Wanneer de bacterie eenmaal op een eenvoudige voedingsbodem groeit, is zij in staat deze stoffen zelf te synthetiseren.

Bij de bestudering van het groeistof-vraagstuk van *Corynebacterium diphtheriae* doet zich de bijzondere moeilijkheid voor van de grote variabiliteit van dit organisme. Sommige stammen groeien zonder moeite op media van eenvoudige samenstelling, terwijl andere haast niet in vitro te kweken zijn. Reeds N. Uschinsky[73]) gebruikte een eenvoudig medium, bestaande uit anorganische zouten, glycerine, ammoniumlactaat en asparaginezuur, waarop hij het *C. diphtheriae* kweekte. Ook hij[74]) vermeldde reeds, dat niet alle stammen op dit medium tot ontwikkeling kwamen, pas geïsoleerde bacteriën waren op deze voedingsbodem zeer lastig te kweken, terwijl oudere „an saprophytische Lebensweise gewöhnte Kulturen leicht wachsen."

Het belangrijkste werk is verricht door J. H. Mueller. Hij beperkte zich bij het onderzoek naar de groeibevorderende factoren tot één stam, *C. diphteriae Yü.* Hij fractioneerde de voor de groei noodzakelijke extracten van caseïne en vlees. Het bleek, dat voor de gebruikte stam de volgende fracties onmisbaar waren[54]):

1. uit caseïne:
   a. cystine
   b. de fractie oplosbaar in butanol
   c. tryptophaan;
2. uit vleesextract:
   een nog niet gedefiniëerde stof.

J. H. Mueller[51]) voerde een quantitatieve werkwijze in om de groei van de bacterie te bepalen. Hij schrijft daarover:

„Because of the nature of the mixtures used, commercial meat extracts and crude proteïn hydrolysate, cleanly negative controls could practically never be secured. It was felt that the amount of growth must be accurately determined, thus rendering possible the differentiations which it was necessary to make, in such manner that results could be strictly comparable even over a period of months".

Als maatstaf voor de groeitoeneming van de bacterie nam hij het N-gehalte van de bacteriecultuur, die hij met de micro-Kjeldahl-methode volgens Pregl bepaalde[51]).

Dit was zeer belangrijk, daar de meest gebruikelijke methode (de bepaling van de groei door meting van optredende troebeling) hier niet gebruikt kan worden, omdat de bacterie in de vorm van een huidje op de voedingsoplossing groeit.

Op grond van zijn onderzoekingen kwam hij tot de conclusie, dat er behalve een reeks aminozuren (l-tryptophaan, l-cystine, l-histidine-HCl, d,l-phenylalanine, d,l-methionine, glycerine, d,l-valine en d-glutaminezuur) toch nog een kleine hoeveelheid vleesextract voor de groei nodig was. Dit extract zou dan waarschijnlijk een

groeibevorderende factor bevatten. Het bleek, dat leverextract veel actiever was. Mueller stelde nu pogingen in het werk uit lever de actieve stoffen verder te concentreren.

Door praecipitatie met basisch loodacetaat in alcoholisch milieu — waarbij in hoofdzaak inactief materiaal neersloeg — en daarop volgende adsorptie aan noriet en elutie met aangezuurde aethanol, verkreeg hij een actief praeparaat, dat de factor echter nog niet in zuivere toestand bevatte.

Zoals gezegd, zijn de genoemde onderzoekingen met een bepaalde bacteriestam uitgevoerd; in dat verband moet nog opgemerkt worden, dat de verschillende stammen zeer uiteenlopen in hun behoefte aan aminozuren en groeifactoren. Bovendien schijnen ook nog andere factoren noodzakelijk te zijn voor de toxineproductie.

In de laatste jaren hebben ook Engelse onderzoekers een werkzaam aandeel gehad in de bestudering van het groeistofprobleem voor bacteriën. P. Fildes en medewerkers stelden een onderzoek in naar de groeifactoren voor *Clostridium sporogenes*. (B. C. J. G. Knight P. Fildes[31]); P. Fildes, G. M. Richardson[16]) en A. M. Pappenheimer Jr.[64])).

Het leek aanvankelijk, dat de actieve stof identiek of verwant zou kunnen zijn met de door F. Kögl en medewerkers [32], [33]) geïsoleerde auxinen of het hetero-auxine [37]). De stabiliteit van de „sporogenes factor" ten opzichte van zuur en loog wees echter uit, dat deze noch met auxine-a of auxine-b, noch met hetero-auxine identiek kon zijn. Bovendien bleek het, dat de auxinen en het hetero-auxine voor *Cl. sporogenes* niet actief waren.

De „sporogenes factor" is bovendien ook voor de groei van *Cl. botulinum* noodzakelijk [16]). Door verdere onderzoekingen van P. Fildes, G. P. Gladstone en B. C. J. G. Knight [15]) alsmede van B. C. J. G. Knight en P. Fildes [31]) bleek, dat de actieve stof door verschillende bacteriën *(Bact. aertrycke, Myco. tuberculosis hominus* en *Bact. typhosum)* en door een schimmel *(Aspergillus versicolor)* gesynthetiseerd wordt.

De factor komt in vele dierlijke en plantaardige extracten voor.

Terwijl B. C. J. G. Knight en P. Fildes [31]) als uitgangsmateriaal voor de isolatie gistextract en urine van mensen gebruikten, heeft A. M. Pappenheimer Jr. [64]) voor dit doel urine van merries toegepast. Het laatst genoemde onderzoek leidde tot de isolatie van een olieachtig zuur, dat nog in een concentratie van 0,4 γ/cm^3 actief was. Door verestering met methanol werd een inactief product verkregen. Over de structuur van de „sporogenes factor" is nog niets naders bekend.

Tenslotte zijn nog verschillende bacteriesoorten te vermelden, waarvan de groeifactoren, evenals bij de reeds genoemde haemolytische streptococcen, verwant of identiek leken te zijn met het B-vitamine.

Een dergelijk verband werd reeds door A. Itano [26]) in het jaar 1923 voor de groeifactoren van *Azotobacter chroococcum* vermoed en in 1927 door C. H. Werkman [80]) experimenteel nader getoetst. Deze auteur heeft met het natuurlijk nog ruwe praeparaat van de B-vitaminen wel een verhoogde groei gekregen; toevoeging van meer voedingsstoffen had echter hetzelfde resultaat. Hij achtte het daarom mogelijk, dat het effect door de „verontreinigingen" van het vitaminepraeparaat

veroorzaakt was, temeer omdat *Azotobacter chroococcum* (alsmede *Rhizobium leguminosaurum)* zelf B-vitamine synthetiseren.

Tegen de tot nu toe genoemde onderzoekingen over de betekenis van de B-vitaminen voor de bacteriegroei was het bezwaar in te brengen, dat de gebruikte onzuivere praeparaten naast B-vitaminen ook nog geheel andere actieve stoffen konden bevatten. In dat opzicht betekende de onderzoeking van R. A. Peters en medewerkers[65]) een vooruitgang. Deze onderzoekers hebben, op grond van vergelijkende proeven met duiven en *Streptothrix corallinus*, het zeer waarschijnlijk gemaakt, dat deze bacterie inderdaad het antineuritische vitamine voor zijn groei nodig heeft.

J. Orr-Ewing en V. Reader[63]) hebben bovendien gevonden, dat *Streptothrix corallinus* zonder vitamine B_1 tot ontwikkeling kon komen, indien op de gebruikte voedingsbodem vooraf *Meningococcus*-soorten hadden gegroeid. Zij concludeerden daaruit, dat de laatstgenoemde bacteriën het vitamine zelf konden synthetiseren en dat zij het ten dele aan de voedingsbodem hadden afgegeven.

Nadat R. J. Williams en R. R. Roehm[85]) in het jaar 1930 met het gekristalliseerde vitamine B_1 van B. C. P. Jansen en W. P. Donath bij twee gistrassen een sterk groeieffect verkregen hadden, leek het zeer waarschijnlijk, dat ook andere micro-organismen deze stof voor de groei nodig zouden kunnen hebben.

In 1935 heeft W. H. Schopfer[67]) aangetoond, dat vitamine B_1 of aneurine — zoals het nu genoemd wordt — voor een schimmel *(Phycomyces blakesleeanus)* een onontbeerlijke groeifactor is.

Dat het aneurine inderdaad ook bij de groei van bacteriën een rol speelt werd pas door onderzoekingen van de laatste twee jaren aangetoond.

Met de eigen onderzoekingen over de groeifactoren van *Staphylococcus aureus* werd in het jaar 1935 begonnen en er zal in de volgende hoofdstukken gelegenheid zijn, de sindsdien verschenen publicaties van andere auteurs nader te bespreken.

Op deze plaats moet alleen nog een publicatie van B. C. J. G. Knight[27]) over de groeifactoren van *Staphylococcus aureus* vermeld worden. Hierin deelt hij mee, dat deze bacterie bij aëroob kweken op een medium, dat behalve glucose en anorganische zouten bovendien nog cystine, tyrosine, tryptophaan en gehydrolyseerde gelatine bevatte, alleen groeien kon indien een extract van gist werd toegevoegd. Knight heeft getracht, de groeifactor uit gistextract (marmite) te isoleren, en is er ook in geslaagd tamelijk actieve praeparaten te bereiden, welke echter zeker nog niet zuiver waren.

In verband met de onderzoekingen over het biosvraagstuk, welke sedert het jaar 1931 in dit laboratorium uitgevoerd worden, leek het belangrijk, ook de groeifactoren van bacteriën nader te bestuderen. Het was niet buitengesloten, dat een bepaalde groeistof van bacteriën identiek kon zijn met één van de bios-factoren en omgekeerd. Om verschillende redenen hebben wij voor dit onderzoek eveneens *Staphylococcus aureus* gekozen, en het lag oorspronkelijk in de bedoeling, na dit niet al te moeilijk te hanteren testobject ook nog de groeifactoren van andere pathogene organismen in dit onderzoek te betrekken.

HOOFDSTUK II.

Quantitatieve bepaling van de groei van Staphylococcus aureus.

In het onderzoek van B. C. J. G. Knight[27]) werd de groei van *Staphylococcus aureus* door visuele schatting van de troebeling bepaald. Het leek echter beter, de groeitoeneming langs nephelometrische weg met behulp van de extinctiometer van W. J. H. Moll[47]) te bepalen. Deze methode heeft bij het bios-onderzoek van F. Kögl en medewerkers zeer goed voldaan[35]).

Natuurlijk was de voor het kweken en meten van gistsuspensies uitgewerkte methode niet zonder meer op dit geval toe te passen. De gist wordt namelijk in kolfjes, die met een kurk afgesloten zijn, gekweekt en kan reeds na 5 uur gemeten worden. Deze wijze van kweken kon bij de *Staphylococcus aureus* niet toegepast worden, omdat dan de kans op infectie, die bij de gist geen rol speelt, veel te groot is. Ook de in de bacteriologie gebruikelijke methode (cultuurbuizen, afgesloten met een wattenprop) kon niet toegepast worden, daar dan tamelijk veel vezels in de cultuur komen, waardoor de gevoelige nephelometrische methode onbruikbare resultaten oplevert.

Teneinde deze bezwaren te ondervangen heb ik de in figuur I getekende kolfjes gebruikt. Zij hebben een inhoud van 50 cm^3 en zijn met een glazen kapje (normaal slijpstuk) af te sluiten. Bij dit model bestond geen ge-

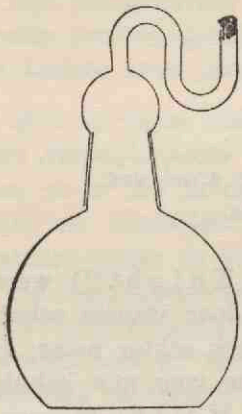


Fig. 1.

vaar, dat vanuit het kleine wattenpropje vezels in de cultuur konden vallen, terwijl toch de mogelijkheid bestond om het kolfje op steriele wijze te voorzien van voedingsoplossing, te testen praeparaten en bacteriesuspensie. Het slijpstuk kon gemakkelijk geflambeerd worden.

Om te voorkomen, dat er van voorafgaande proeven groeibevorderende factoren in de kolfjes aanwezig waren, werden voor elke nieuwe test alle kolfjes en pipetten met een chroom-zwavelzuurmengsel behandeld. Pipetten en kolfjes werden tenslotte droog gestereliseerd.

Ik gebruikte de, ook in het onderzoek van B. C. J. G. Knight[27]) toegepaste voedingsoplossing. Om caramelisering te voorkomen werd zij in twee delen afzonderlijk gestereliseerd.

1.	Na-citraat puriss.	3,00 g
	KH_2PO_4 „	4,50 g
	l-cystine (Chem. Fabr. Th. Schuchardt, Görlitz)	0,05 g
	tyrosine „reinst" (Fränkel-Landau)	0,05 g
	gehydrol. gelatine *)	25 cm^3
	ged. water	tot 600 cm^3

*) De gehydrolyseerde gelatine werd bereid door 150 g gelatine (gelatine voor bacteriologische doeleinden van de N.V. Lijm- en gelatinefabriek te Delft) gedurende 20 dagen te koken met 1500 cm^3

Deze oplossing werd met Na_2CO_3 (puriss.) op een $p_H = 7{,}4$ gebracht.

2.	$MgSO_4$ 7 aq	p. a.	0,04 g
	tryptophaan „reinst" (Fränkel-Landau)		0,02 g
	glucose	p. a. anh.	2,50 g
	ged. water		400 cm³

Deze twee oplossingen werden door een gehard filter gefiltreerd, gedurende 15 minuten op 120° verhit, en daarna bij elkaar gevoegd.

Voor dit onderzoek stond een stam van *Staphylococcus aureus* ter beschikking, welke ik door de welwillendheid van Dr. H. W. Julius van het Hygiënisch Laboratorium, wien ik van deze plaats hartelijk dank zeg, gekregen heb.

Op de hierboven beschreven voedingsbodem kwam deze bacterie in het algemeen zonder toevoeging van gistextract niet tot ontwikkeling.

De voor de test benodigde bacteriën waren steeds van een 24 uur oude cultuur, op een normale agar-voedingsbodem gekweekt, afkomstig. Met behulp van een entnaald werd de cultuur voorzichtig van de agar gestreken en in 10 cm³ voedingsoplossing gesuspendeerd. De bacteriesuspensie was nu gereed voor de test. De hoeveelheid entmateriaal werd zoveel mogelijk constant gehouden.

Van elke verdunning werd een serie van 5 kolfjes in-

---

zwavelzuur (10%). Na afloop werd dit voor het grootste gedeelte met baryt neergeslagen. Na behandeling van de zwak zure oplossing met noriet, en verwijdering van al het zwavelzuur werd de oplossing tot 500 cm³ geconcentreerd. Per liter voedingsbodem werd 25 cm³ gebruikt.

gezet. De groeimetingen begonnen, naar het voorbeeld van de biotinetest, dagelijks met de bepaling van de zogenaamde nulwaarde, blancowaarde en standaardwaarde.

Deze drie grootheden kunnen als volgt gedefiniëerd worden:

1. de *nulwaarde* is die nephelometerwaarde, welke verkregen wordt door de bacteriën in een testkolfje onmiddellijk na enting te doden met 20 cm^3 chloorkresoloplossing (1‰) en daarna te meten.
2. De *blancowaarde* is de nephelometerwaarde, welke verkregen wordt door de bacteriën in een testkolfje, waaraan geen groei bevorderende factoren zijn toegevoegd, bij 37° 48 uren aëroob te kweken en daarna te doden met 20 cm^3 chloorkresoloplossing en te meten.
3. De *standaardwaarde* is de nephelometerwaarde, welke verkregen wordt door de bacteriën in een testkolfje, waaraan 0,1 cm^3 marmite-oplossing (1%) is toegevoegd, bij 37° 48 uren aëroob te kweken en daarna te doden met 20 cm^3 chloorkresoloplossing en te meten.

De groeitoeneming wordt berekend uit de formule:

$$\frac{b - a}{a} 100,$$

waarin a de extinctie voorstelt van de kolfjes, welke de nulwaarde leveren, en b de extinctie van een willekeurige andere serie.

Het was theoretisch juister geweest, voor a niet de nulwaarde, maar de blancowaarde te nemen. In de practijk bleek echter, dat de blancowaarde sterk schommelde en meestal beneden de nulwaarde lag. De oorzaak hiervan is waarschijnlijk, dat de bacteriën in dit milieu niet alleen geen groei vertonen, maar ook eerder afsterven, waarbij plasmolyse optreedt.

Als voorbeeld is in tabel I de samenstelling van de voedingsoplossing van een reeks proeven aangegeven:

Tabel I

serie	voedingsopl.	Toegevoegd	Bacterie-susp.
nulwaarde	1,8 cm^3	0,1 cm^3 H_2O	0,1 cm^3
blancow.	1,8 cm^3	0,1 cm^3 H_2O	0,1 cm^3
standaardw.	1,8 cm^3	0,1 cm^3 stand.	0,1 cm^3
te testen verdunning	1,8 cm^3	0,1 cm^3 praep.	0,1 cm^3
zonder bact.	1,8 cm^3	0,1 cm^3 H_2O 0,1 cm^3 praep.	

De te meten praeparaten werden altijd in verschillende verdunningen getest. De verdunning, waarbij de groeitoeneming in de nabijheid van 100% lag, werd gekozen voor de berekening van de activiteit. De eenheid was per definitie vastgelegd:

Een voedingsoplossing bevat 1 eenheid (1 E) per cm^3, wanneer *Staphylococcus aureus* hierin gedurende 48 uren aëroob bij 37° gekweekt, een groeitoeneming vertoont van 100 %.

Hierdoor was het gemakkelijk, de praeparaten op eenvoudige wijze te vergelijken.

Aan het einde van de groeiperiode (48 uren) werden de bacteriën met 20 cm^3 chloor-kresoloplossing (1 ‰) gedood. De troebeling werd met de extinctiometer bepaald.

Tabel II

N°.	cm³		Ex.	% groei
O	—	Nulwaarde	0,8	—
O	—		1,0	—
O	—		0,6	—
O	—		1,2	—
O	—		0,7	—
OA	—	Blancowaarde	0,2	—
OA	—		1,0	—
OA	—		0,6	—
OA	—		0,4	—
OA	—		0,2	—
S	0,1	Standaard „marmite"	4,7	487
S			4,6	475
S			4,7	487
S			4,8	500
S			4,7	487
1	0,1	Praeparaat 5 γ/cm^3	2,0	160
2			2,0	160
3			2,1	162
4			2,2	175
5			2,0	160
6	0,1	Praeparaat 0,5 γ/cm^3	1,7	112
7			1,8	125
8			1,8	125
9			1,9	137
10			1,8	125

De cuvetten werden voor iedere meting zorgvuldig uitgespoeld en met een zemen lapje afgedroogd. De inhoud van een te meten kolfje werd voorzichtig geschud, zodat zich geen luchtbelletjes vormden, welke de meting zouden storen; daarna werd de verkregen suspensie in de cuvette gegoten en gemeten zoals in de publicatie van W. J .H. Moll is beschreven.

Als standaard gebruikte ik 0,1 cm^3 van een oplossing, die 1 % marmite bevatte. Deze hoeveelheid veroorzaakte gemiddeld een groeitoeneming van 500 %.

Hoewel het dus voor de hand had gelegen, de concentratie lager te kiezen (om 100 % groeitoeneming te bereiken) heb ik toch aan de concentratie van 1 % vastgehouden, omdat ook hier de variabiliteit van het organisme een grote rol speelde. Soms kreeg ik abnormaal lage waarden, een andere maal buitengewoon hoge. In het eerste geval zouden, als ik een lagere concentratie had gekozen, de uitkomsten onbruikbaar zijn geworden.

Ter verduidelijking van de wijze, waarop ik de activiteit van mijn praeparaten bepaalde, moge hier in tabel II (zie blz. 20), een voorbeeld volgen.

Het gemiddelde van de standaardgroei is dus 487 %, dat van het gemeten praeparaat in de laagste concentratie 125 %.

0,5 γ veroorzaakt een groeitoeneming van: $\frac{500}{487} \times 125 =$ 129 %.

0,5γ bevatten dus 1,29 E of:

1 g van het praeparaat komt overeen met 2.000.000 $\times$ 1,29 E = 2.580.000 E.

HOOFDSTUK III.

Pogingen tot isolering van de groeifactoren.

Zoals uit vele onderzoekingen van anderen reeds was gebleken, is gistextract een uitstekend uitgangsmateriaal voor de isolering van de groeifactoren voor bacteriën.

In het begin heb ik het gistextract zelf bereid. Het bleek echter spoedig, dat het voordeliger was, gistextract als zodanig uit de handel te betrekken. Ik heb evenals B. C. J. G. Knight „Marmite" gebruikt; 1 kg hiervan komt volgens mijn ervaring overeen met 20 kg gist.

Daar B. C. J. G. Knight in zijn eerste publicatie over dit onderwerp reeds een aanzienlijke concentratie van de groeifactoren bereikt had, ben ik begonnen dit voorschrift na te werken. Natuurlijk heb ik de gang van de scheiding in actief en inactief materiaal steeds gecontroleerd.

Na een voorproef met 2 kg „Marmite" was het al duidelijk, dat ik met een veel grotere hoeveelheid uitgangsmateriaal moest beginnen, om een kans op isolering van de groeifactoren te hebben.

In het kort zij hier de gevolgde werkwijze vermeld:

I. Extractie met aethanol.

50 kg „Marmite"(activiteit 10.000 E per gram) werden in 4 gelijke porties verdeeld. Deze werden elk in 8 l gedestilleerd water opgelost en gedurende 1 uur gekookt. Aan de nog warme oplossing voegde ik, onder voortdurend roeren, absolute aethanol toe, tot de vloeistof 75 %

aethanol bevatte. Nadat het neerslag bezonken was, decanteerde ik de bovenstaande vloeistof af, en behandelde het praecipitaat, na verdunnen met 5 l water, nog eenmaal met aethanol. De beide aethanoloplossingen werden verenigd en in vacuo geconcentreerd tot een volume van 5 l. Op deze wijze verkreeg ik vier porties aethanolextract, welke volgens een steekproef met 12 kg droge stof overeenkwamen.

Drooggewicht aethanolextract:	12 kg.
Activiteit	13.300 E per gram.

II. Extractie met n-butanol.

De geconcentreerde aethanolextracten werden met natriumcarbonaat alkalisch gemaakt t.o.v. lakmoes en gedurende 1 uur intensief met pas gedestilleerde butanol (6 liter per portie) geroerd. In het alkalische milieu trad zeer sterke emulsievorming op. Door centrifugeren kon echter de butanoloplossing zuiver afgescheiden worden. Het in n-butanol onoplosbare residu werd op dezelfde wijze nog vier maal met dit oplosmiddel behandeld. Deze butanolextracten werden in vacuo tot telkens 2,5 l geconcentreerd, waarbij ook het in de n-butanol opgeloste water grotendeels verwijderd werd. De ingedampte oplossingen werden in een ijs-zout-mengsel afgekoeld; het gevormde neerslag, dat hoofdzakelijk uit anorganisch materiaal bestond, werd afgefiltreerd en nog drie maal met 500 cm^3 kokende absolute aethanol uitgewassen, waarna de verkregen aethanoloplossing met het butanolextract verenigd werd.

III. Vervanging van de n-butanol door aethanol.

Het butanol-aethanol-mengsel werd nu weer aan een

destillatie onder verminderde druk onderworpen. Door telkens opnieuw met absolute aethanol te verdunnen en opnieuw te destilleren kon langzamerhand alle butanol verwijderd worden; het volume van één portie bedroeg tenslotte 2 l. Na afkoelen in ijs en zout sloeg ook nu weer hoofdzakelijk anorganisch materiaal neer, dat verwijderd werd.

Drooggewicht van de fractie oplosbaar in absolute aethanol: 1400 g.

Activiteit 35.800 E per gram.

IV. Praecipitatie met sublimaat.

De volgens III verkregen extracten van twee porties werden verenigd en in de koude met sublimaat behandeld. Daartoe werd aan de vloeistof (4 l) een verzadigde oplossing van sublimaat in absolute aethanol (2 l) onder voortdurend roeren langzaam toegevoegd. Nadat het mengsel 12 uren in de ijskast gestaan had, werd het neerslag afgefiltreerd en verscheidene malen met koude absolute aethanol uitgewassen. De kwikzouten in het filtraat werden op de gebruikelijke wijze met zwavelwaterstof ontleed, en daarna verwijderd. Na verdrijven van de zwavelwaterstof met behulp van kooldioxyde en neutraliseren met soda werd de aethanol afgedampt. De resterende stroop werd nu in gedestilleerd water opgenomen, de oplossing door toevoegen van loog op $p_H = 10$ gebracht en met pas gedestilleerde n-butanol geëxtraheerd.

V. Extractie met n- H_2SO_4.

Het butanolextract werd met een zwavelzuuroplossing (1 n) uitgeschud, waarbij de actieve stof in het zwavelzuur overging, terwijl donkerbruine verontreinigingen in

de butanol achterbleven. Het zure extract werd met soda geneutraliseerd en daarna geconcentreerd. Na afkoelen kristalliseerde uit de vloeistof tamelijk veel natriumsulfaat uit. Dit werd afgefiltreerd en verscheidene malen met absolute aethanol uitgewassen. Teneinde het resterende natriumsulfaat zoveel mogelijk te verwijderen, werd het filtraat nog met absolute aethanol behandeld, en het neergeslagen zout opnieuw afgefiltreerd. Tenslotte heb ik de filtraten en wasvloeistoffen verenigd en ingedampt, waarna een lichtgeel gekleurde stroop achterbleef.

Drooggewicht residu: 110 g.
Activiteit: 91.800 E per gram.

VI. Praecipitatie met sublimaat.

Bij de opwerking volgens Knight zou nu het materiaal aan een destillatie in hoogvacuum onderworpen moeten worden. Bij een voorproef bleek mij echter, dat de activiteit van het destillaat (100.800 E per g) niet veel beter was dan die van het uitgangsproduct (91.800 E per g). Het leek daarom gewenst, de destillatie uit te stellen en eerst te trachten, door middel van neerslagen met zouten van zware metalen, respectievelijk alcaloïdreagentia een verdere zuivering te bereiken. In tabel III (zie blz. 26) is aangegeven, in welke gevallen een neerslag optreedt.

Een voorproef toonde aan, dat door sublimaat in waterige oplossing inactieve stoffen werden neergeslagen en dat dus op deze wijze een verdere concentrering bereikt kon worden.

Aan een oplossing van de in trap V verkregen stroop in water (10 %) voegde ik een even groot volume verzadigde sublimaatoplossing (in water) toe en filtreerde daarna het gevormde neerslag af. Neerslag en filtraat

werden op de gewone wijze ontleed en het bleek inderdaad, dat alleen het filtraat actief was. De na indampen verkregen stroop behandelde ik met absolute aethanol, teneinde het organische materiaal zo goed mogelijk van keukenzout te bevrijden.

Drooggewicht residu: 58,9 g.
Activiteit: 150.300 E per gram.

Tabel III

Reagens	
$PtCl_4$	+
$AuCl_3$	+
Reinecke's zout	—
$CuSO_4$	+ +
Pikrinezuur	—
Pikrolonzuur	—
Flaviaanzuur	—
Rufiaanzuur	+
Sublimaat	+ +
Phosphor-Wolfraamzuur	+

VII. Praecipitatie met flaviaanzuur (2,4-dinitro-1, naphtol-7-sulfonzuur).

Er werd nu nagegaan, of ook de andere in tabel III vermelde neerslagen voor de verdere zuivering te gebruiken waren. Daarnaast werden dezelfde proeven ook in aethanolisch milieu uitgevoerd.

In tabel IV is aangegeven, in welke gevallen een neerslag optrad.

Tabel IV

Reagens in water		Reagens in aethanol	
$PtCl_4$	—	$PtCl_4$	+
$AuCl_3$	+	$AuCl_3$	—
$HgCl_2$	—		
$CuS0_4$	+		
Reinecke's zout	+		
Phosphor-Wo-zuur	+		
Pikrinezuur	±	Pikrinezuur	—
Pikrolonzuur	—	Pikrolonzuur	—
Rufiaanzuur	+	Rufiaanzuur	+
Flaviaanzuur	—	Flaviaanzuur	+ +

De behandeling met flaviaanzuur leek, wat quantiteit en kristallisatievermogen van het verkregen neerslag betrof, veel gunstiger dan die met de andere reagentia, en reeds bij een voorproef bleek, dat de activiteit op deze wijze sterk was op te voeren: bij deze bewerking kreeg ik uit 112 mg een residu van 15 mg, dat nog gedeeltelijk anorganisch materiaal bevatte en dat, zoals de test uitwees, de verrassend hoge activiteit van 2.600.000 E per gram bezat. Het verloop van de proef was als volgt: aan 112 mg van het in trap VI verkregen product, opgelost in 3 cm^3 absolute aethanol, werd een overmaat van een verzadigde flaviaanzuur-oplossing (eveneens in aethanol) toegevoegd. Er ontstond onmiddellijk een oranjerood kristallijn neerslag. Nadat het mengsel 24 uren in de koelkast had gestaan, werd het neerslag afgefiltreerd, drie

maal met absolute aethanol uitgewassen, gedroogd en daarna in gedestilleerd water opgelost, met enige druppels n-HCl aangezuurd en onder verwarming met wol ontleed [55]). De kleurloze oplossing werd geneutraliseerd en in vacuo ingedampt.

Daar het flavianaat zich uit een vrij verdunde oplossing in fraaie oranjerode naaldjes afscheidde, leek het niet waarschijnlijk, dat het nog veel verontreinigingen zou bevatten. Om dit uit te maken heb ik het flavianaat 2 x uit een aethanol-watermengsel (1:1) omgekristalliseerd, en daarna telkens een aliquoot gedeelte met wol ontleed en getest. Inderdaad veranderde de activiteit door omkristalliseeren — de foutengrens van 10 % in aanmerking genomen — practisch niet. Na 1 x omkristalliseren bedroeg de activiteit 3.200.000 E per gram, na 2 x respectievelijk 3.300.000 E en 3.400.000 E per gram.

Bij de analyse bleek echter, dat de verbinding ten dele uit anorganisch materiaal bestond. Er werd een asgehalte van 15,9 % gevonden.

In de as, welke geheel in water oplosbaar was, kon ik calcium- en phosphaationen aantonen. Een test wees uit, dat zowel de gloeirest als calciumphosphaat physiologisch onwerkzaam waren. Een gedeeltelijke scheiding van de organische en anorganische stoffen kon ik verkrijgen door het mengsel na de ontleding van het flavianaat met absolute aethanol te behandelen. Het in aethanol oplosbare gedeelte had een activiteit van 10.200.000 E per gram, terwijl de in absolute aethanol onoplosbare stof onwerkzaam was. Met de reeds genoemde reagentia ontstonden de in tabel V vermelde neerslagen.

De behandeling met flaviaanzuur heeft niet alleen een grote stijging van de activiteit tengevolge (van 150.000

Tabel V

Reagens in water		Reagens in aethanol	
$PtCl_4$	—	$PtCl_4$	+
$AuCl_3$	—	$AuCl_3$	—
$CuSO_4$	+		
Phosphor-Wo-zuur	+		
Pikrinezuur	—	Pikrinezuur	—
Pikrolonzuur	+	Pikrolonzuur	+
Rufiaanzuur	—	Rufiaanzuur	—
Flaviaanzuur	—	Flaviaanzuur	—

E per gram tot 10.200.000 E per gram), maar daarenboven ook een schijnbare toeneming van de absolute hoeveelheid aan actieve stof, wat bij de daarop volgende opwerking van een grotere hoeveelheid nog treffender was: hierbij werden 59 g van het product uit trap VI op dezelfde wijze met flaviaanzuur behandeld, waardoor 3,21 g ruw flavianaat verkregen werd. Na éénmaal omkristalliseren uit een aethanol-watermengsel (1:1) bedroeg de activiteit van het ontlede product 4.800.000 E per gram.

Uit een voorproefje met 82 mg van dit product bleek, dat een betere scheiding van de organische en anorganische bestanddelen verkregen kon worden door de stroop, welke na ontleding met wol achterbleef te behandelen met een mengsel van absolute aethanol en benzeen (2:1). De activiteit werd hierdoor vertienvoudigd.

Uit 82 mg flavianaat kreeg ik 34,8 mg stroop met een totale activiteit van 170.600 E. Het gewicht van het residu

na de behandeling me het aethanol-benzeen-mengsel bedroeg 16,8 mg, terwijl de activiteit gestegen was tot 50.000.000 E per gram. Deze hoeveelheid bevatte dus 840.000 E. Dit is een opbrengst van 500 %.

De oplossing van de as bevatte Ca- en phosphaationen en was wederom physiologisch onwerkzaam. Zoals te verwachten was, had toevoeging van calciumphosphaat geen invloed op de groei van *Staphylococcus aureus*. De schijnbare toeneming van het actieve materiaal is moeilijk te verklaren. De eerste veronderstelling zou kunnen zijn, dat met de anorganische fractie bestanddelen verwijderd zijn, welke op de bacteriën toxisch werkten, en op deze wijze gedurende de hele opwerking de activiteit geremd hebben.

Als tweede verklaring zou men kunnen aannemen, dat het ruwe product inactieve stoffen bevat, welke door de behandeling met flaviaanzuur in actief materiaal worden omgezet. Zo zou bijvoorbeeld een inactieve dihydro-verbinding door het flaviaanzuur tot de actieve stof gedehydreerd kunnen worden. Helaas was het niet mogelijk, deze theorie nader aan de feiten te toetsen.

Drooggewicht stroop: 568 mg.
Activiteit: 50.000.000 E per gram.

VIII. Destillatie bij verminderde druk.

Terwijl de destillatie in vacuo in een vroeger stadium geen gunstig resultaat bleek op te leveren, leek nu de zuivering van de praeparaten zover gevorderd, dat deze bewerking met succes kon worden toegepast. De eerste destillaties voerde ik uit in een klein retortje, zoals is aangegeven door F. Kögl en B. Tönnis[35]), en wel bij een druk van 0,001 mm. Er werden drie fracties opgevangen. In tabel VI is het resultaat van de destillatie vermeld.

Tabel VI

Fractie	Badtemp.	Gewicht	Activiteit
1	130°	0,709 mg	110.000.000 E/gram
2	138°	0,400 mg	226.000.000 E/g
3	145°	0,205 mg	226.000.000 E/g
residu		3,350 mg	inactief

De kleurloze olieachtige destillaten werden verenigd en in een aceton-kooolzuur-mengsel afgekoeld. Na een dag staan had zich daarin een geringe hoeveelheid fraaie kleurloze kristallen afgescheiden.

Met de reeds genoemde reagentia ontstonden de in tabel VII vermelde neerslagen.

Tabel VII

Reagens in water		Reagens in aethanol	
$PtCl_4$	+	$PtCl_4$	+
$AuCl_3$	+	$AuCl_3$	—
$HgCl_2$	+	Flaviaanzuur	±
Phosphor-Wo-zuur	—	Pikrolonzuur	+ +
Pb-acetaat	—	Br-pikrolonzuur	±
Bas. Pb-acetaat	—	Pikrinezuur	—
Bas. Hg-acetaat	+	Styphninezuur	—
Cu-acetaat	+	Rufiaanzuur	—
		Br-anilzuur	±
		J-anilzuur	—

Helaas is een groot gedeelte van dit kostbare, zeer actieve praeparaat verongelukt. Bovendien was ik door omstandigheden gedwongen, het practische werk gedurende enkele maanden te onderbreken.

Na deze periode werd de herhaling van de in dit hoofdstuk beschreven opwerking overbodig, doordat juist in dit stadium belangrijke publicaties van B. C. J. G. Knight verschenen, waarin deze mededeelde, dat de combinatie van nicotinezuur en aneurine de groei van *Staphylococcus aureus* in sterke mate bevorderde. Dit had natuurlijk invloed op de verdere richting van mijn onderzoek. Behalve dat de resultaten van Knight bevestigd behoorden te worden, moest vooral nagegaan worden, of de werkzaamheid van de actieve destillaten uitsluitend door nicotinezuur en aneurine veroorzaakt werd.

Zoals in het volgende hoofdstuk aangetoond zal worden, speelt bij de groei van *Staphylococcus aureus* behalve de reeds genoemde factoren, ook nog biotine een rol.

SCHEMA VAN DE OPWERKING VAN „MARMITE".

Marmite, 50 kg, 10000 E/g.
+ abs. C_2H_5OH tot 75%
opkoken met H_2O, 1 uur

filtraat, 13300 E/g — neerslag

alkalisch op lakmoes
extractie C_4H_9OH

Butanolfractie, 35800 E/g — residu

C_4H_9OH vervangen door abs. C_2H_5OH
(Residu van 25 kg marmite in vol. v.
4 l neerslaan met 2 l $HgCl_2$
verzadigde absolute C_2H_5OH)

Oplossing — neerslag

Hg verwijderen met H_2S, H_2S verw. CO_2

Hg-vrije opl. — HgS

Indampen, opnemen in H_2O, alkalisch tot $p_H = 10$
uitschudden met C_4H_9OH

Butanolopl. — residu

uitschudden met H_2SO_4

H_2SO_4-oplossing — residu

neutraliseren met Na_2CO_3, indampen,
Na_2SO_4 filtreren

stroop, 110 g (uit 50 kg marmite) — Na_2SO_4
91.800E/g

in vol. van 1,1 l neerslaan met evengroot vol.
verzadigde $HgCl_2$-opl.

oplossing — neerslag

Hg verwijderen met H_2S, H_2S verwijderen, neutraliseren met Na_2CO_3, indampen

stroop, 58,9 g., 150.300 E/g — Hgs.

opnemen in abs. aethanol, neerslaan met flavianzuur in aethanol opl.

flavianaat, 4.800.000 E/g — oplossing

ontleden met wol, behandelen met abs. benzeen-aethanol 1 : 2

oplosbaar, 50.000.000 E/g — onoplosbaar

hoogvacuumdest. badtemp. 130-145°, residu;
druk 0.001 mm — bevat Ca-phosphaat

stroop; na koelen in aceton-CO_2 kristallen — residu
200.000.000E/g — (inactief)

HOOFDSTUK IV.

Aneurine, nicotinezuur en biotine als groeibevorderende factoren.

In een in 1937 verschenen publicatie [28]) deelde B. C. J. G. Knight mede, dat nicotinezuur (of het nicotinezuur-amide) tot in een concentratie van 0,005 γ per cm^3 de groei van *Staphylococcus aureus* bevorderde, indien de bacterie gekweekt werd op een voedingsbodem, welke als stikstofbron behalve cystine, tyrosine en tryptophaan ook gehydrolyseerde gelatine bevatte *).

Nicotinezuur (respectievelijk nicotinezuuramide) was echter niet actief, indien het aan de zuiver synthetische voedingsbodem van P. Fildes, G. M. Richardson, B. C. J. G. Knight en G. P. Gladstone [17]) werd toegevoegd.

Het is niet mogelijk op deze voedingsbodem, welke behalve anorganische zouten en glucose een hele reeks bekende synthetisch bereide aminozuren bevat, *Staphylococcus aureus* te kweken zonder groeifactoren toe te voegen. Nu was echter het destillaat, dat Knight verkregen had, op deze synthetische voedingsbodem wel werkzaam. Hieruit concludeerde deze onderzoeker, dat zowel in het

---

*) In een recente publicatie deelde J. H. Mueller [53]) mede, dat nicotinezuur één van de groeifactoren van C. diphteriae is.

destillaat, als in de gehydrolyseerde gelatine nog meer groeifactoren aanwezig zouden zijn.

Zoals in hoofdstuk I al vermeld is, speelt aneurine een rol als groeifactor van bepaalde gistrassen. Eind 1936 verscheen een publicatie van E. L. Tatum, H. G. Wood en W. H. Peterson[69]), waarin medegedeeld werd, dat dit vitamine een groeibevorderende factor is voor *Propionibacterium pentosaceum.*

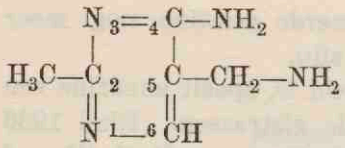
Terwijl nu aneurine op zichzelf geen invloed heeft op de groei van *Staphylococcus aureus,* heeft Knight geconstateerd, dat het in combinatie met nicotinezuur wel degelijk een groeieffect veroorzaakt. Bij tegenwoordigheid van de twee genoemde stoffen bleek, dat *Staphylococcus aureus* op de genoemde synthetische voedingsbodem een aanzienlijke groei vertoonde.

Wij werden voor het eerst met dit belangrijke feit in kennis gesteld door een particulier schrijven van Dr. B. C. J. G. Knight.

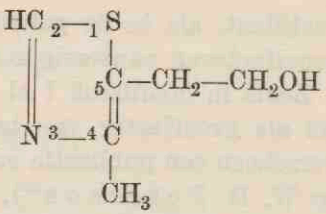
In de een maand later verschenen publicatie deelde B. C. J. G. Knight[29]) nog eenige nadere bijzonderheden mee. Terwijl Knight's destillaat in een concentratie van 20 γ per cm^3 een sterke groeibevorderende werking vertoonde („gave an abundant growth") werd dit effect reeds verkregen, wanneer aneurine en nicotinezuur respectievelijk in concentraties van 0,02 γ en 2 γ per 10 cm^3 voedingsoplossing waren toegevoegd.

Nadere gegevens over het percentage van de groeitoeneming en over de drempelwaarde van de activiteiten waren op dit tijdstip nog niet bekend.

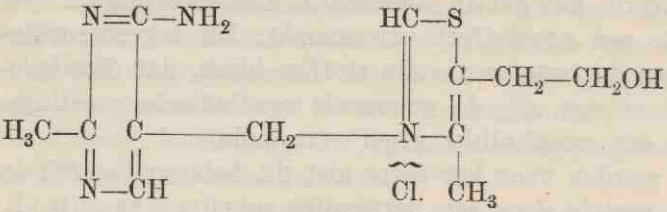
Het aneurine is uit een thiazol- en een pyrimidine-helft opgebouwd; twee delen, welke bij de afbraak en ook bij de synthese een grote rol hebben gespeeld.



4-amino-5-aminomethyl-
2-methyl-pyrimidine
I



4-methyl, 5-β-hydroxy-
aethyl-thiazol
II



aneurine-chloride
III

In een zeer recente onderzoeking van Knight[30]) werd nagegaan, of *Staphylococcus aureus* eveneens in staat zou zijn, aneurine uit deze twee verbindingen op te bouwen. Inderdaad bleek dit het geval te zijn. Ook is gebleken, dat, wanneer bijvoorbeeld in de pyrimidine-ring in de positie 4 de aminogroep door een hydroxylgroep vervangen wordt, de activiteit verloren gaat. Het organisme is dus niet in staat op de 4-plaats een hydroxylgroep door een aminogroep te substitueren. Het is dus ook niet meer verwonderlijk, dat een pyrimidine-verbinding, waarbij in positie 2 inplaats van een methylgroep een hydroxylgroep staat, evenmin door het micro-organisme ge-

bruikt kan worden om samen met het thiazol een actieve stof op te bouwen.

Na de hervatting van mijn werk was het eerste, wat op mijn weg lag, na te gaan in hoeverre de door Knight gevonden resultaten ook op dit laboratorium bevestigd konden worden.

Zoals in hoofdstuk II vermeld is, gebruikte ik voor mijn onderzoekingen eveneens de voedingsbodem, welke gehydrolyseerde gelatine bevatte. Het bleek onmiddellijk, dat, zowel nicotinezuur, als het nicotinezuuramide in een concentratie van 0,005 γ — 5 γ per cm^3 inactief waren. Blijkbaar bevatte dus mijn gehydrolyseerde gelatine geen aneurine, respectievelijk afbraakproducten van dit vitamine.

Ik heb vervolgens nagegaan, of nicotinezuur en aneurine samen even werkzaam waren als mijn actiefste praeparaten, welke door middel van een destillatie bij 0,001 mm. verkregen waren. Te dien einde heb ik de combinatie aneurine en nicotinezuur elk in concentraties van 0,005 γ — 5 γ per cm^3 aan de voedingsbodem toegevoegd.

De tabel VII vat de uitkomsten van mijn proeven samen.

Tab. VII

concentratie	H. V. dest.	Aneur. + Nicotinez.	Aneur. + Nicotz. amid.
0,005 γ/cm^3	114 %	106 %	111 %
0,05 γ/cm^3	189 %	167 %	178 %
0,5 γ/cm^3	284 %	270 %	290 %
5 γ/cm^3		685 %	708 %

Ofschoon er dus geen twijfel meer bestond, dat nicotinezuur en aneurine twee groeifactoren zijn, welke *Staphylococcus aureus* in staat stellen, op synthetische voedingsbodems te groeien, bleef toch nog de vraag open, of bovendien niet nog één of meerdere andere factoren mede een rol spelen.

Inderdaad schenen enige verkregen resultaten in die richting te wijzen. Ik had namelijk met de rest van mijn actiefste praeparaat een zogenaamde moleculairdestillatie *) uitgevoerd, waarbij vier fracties bij een badtemperatuur van 50°, 75°, 100° en 125° werden opgevangen (tabel VIII).

Tab. VIII

Fractie	Badtemp.	druk	Gewicht
1	50°	0,0005 mm	0,326 mg
2	75°	„	0,922 mg
3	100°	„	1,700 mg
4	125°	„	1,150 mg

De vier fracties werden afzonderlijk en in combinatie getest, waarbij de fracties in gelijke, in de eerste kolom vermelde concentraties werden toegevoegd. (Tabel IX).

*) Ik kon hierbij gebruik maken van een op dit laboratorium door den heer L. Pons uitgewerkt apparaat, dat in diens dissertatie beschreven zal worden.

Tab. IX

concentratie	1	2	3	4	1 + 4	2+3	1—4
0,001 γ/cm^3	106 %			124 %	169 %		
0,003 γ/cm^3	149 %			158 %	199 %		
0,005 γ/cm^3	195 %	54 %	118 %	214%	248%	141 %	222 %

Het residu was inactief.

Wanneer men de, met de laagste concentratie van aneurine en nicotinezuur, verkregen groeitoeneming vergelijkt met de groei, veroorzaakt door de laagste concentratie van de vier destillaten, valt het direct op, dat vooral bij de vierde fractie de groeitoeneming relatief hoger is.

Het was daarom niet onwaarschijnlijk, dat inderdaad nog een derde component deel uit zou maken van dit complex. Daar in gist — het uitgangsmateriaal voor de isolering van deze groeifactoren — biotine voorkomt, was het niet onmogelijk, dat deze verbinding de derde factor zou zijn. Inderdaad bleek bij een oriënterende proef, biotine — bij aanwezigheid van aneurine en nicotinezuur — een sterke groeibevorderende werking te hebben.

Bij drie componenten wordt het aantal mogelijkheden, wat de onderlinge verhouding van de hoeveelheid der drie factoren betreft, zeer groot.

Slechts enkele van de mogelijke combinaties konden onderzocht worden.

In de tabellen X en XI zijn de resultaten van vier testen vermeld. In tabel X is de concentratie van biotine de

variabele factor, terwijl de concentraties van aneurine en nicotinezuur constant gehouden zijn; in tabel XI blijft de concentratie van biotine en nicotinezuur constant, en die van aneurine variëert.

Voor de test gebruikte ik steeds de gekristalliseerde biotine-methylester, welke mij door den heer L. Pons welwillend ter beschikking was gesteld. Klaarblijkelijk

Tabel X

Biotine	Aneurine 0,05 γ/cm³ Nicotinez. 0,05 γ/cm³	Aneurine 5 γ/cm³ Nicotinez. 5 γ/cm³
—	167 %	685 %
0,005 γ/cm³	705 %	833 %
0,05 γ/cm³	730 %	847 %
0,5 γ/cm³	750 %	872 %
5 γ/cm³	795 %	919 %

Tabel XI

Aneurine	Nicotinez. 5 γ/cm³ Biotine 0,005 γ/cm³	Nicotinez. 5 γ/cm³ Biotine 0,05 γ/cm³
—	290 %	360 %
0,005 γ/cm³	540 %	590 %
0,05 γ/cm³	670 %	670 %
0,5 γ/cm³	740 %	730 %
5 γ/cm³	730 %	740 %

wordt de methylester in de micro-organismen gemakkelijk gehydrolyseerd. In elk geval is tot nu toe bij gist geen verschil geconstateerd in de werkzaamheid van de ester en van het vrije zuur. Waar in het vervolg van biotine

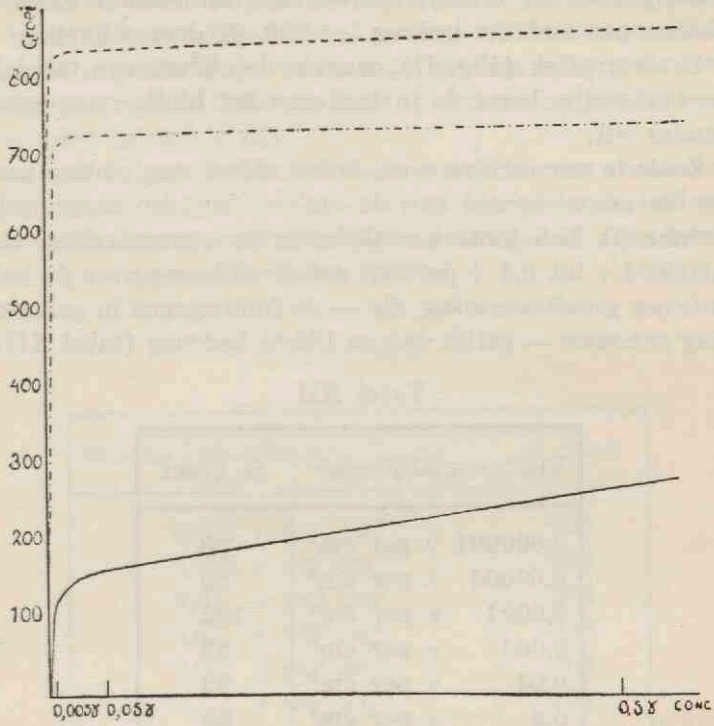


Fig. II.

———————— : Groeicurve bij toenemende concentraties van A(neurine) en N(icotinezuur) ($C_A = C_N$)

-.-.-.-.-.- : Groeicurve bij $C_A = C_N = 0.05$ γ/cm^3 en biotine in stijgende concentraties.

— — — — — — : Groeicurve bij $C_A = C_N = 5$ γ/cm^3 en biotine in stijgende concentraties.

sprake is, wordt steeds de biotine-methylester bedoeld.

De invloed van biotine is, zoals uit bovenstaande cijfers blijkt, zeer groot. Bij een concentratie van aneurine en nicotinezuur elk van 0,05 γ per cm^3 bedraagt de groeitoeneming 170 %, terwijl toevoeging van slechts 0,005 γ biotine per cm^3 dit bedrag tot 700 % doet stijgen.

In de grafiek (Fig. II), waarin de cijfers van tabel X verwerkt zijn, komt de invloed van het biotine nog sprekender uit.

Zoals te verwachten was, is het effect van biotine zonder de aanwezigheid van de andere factoren aanzienlijk kleiner. Ik heb biotine-methylester in concentraties van 0,000004 γ tot 0,4 γ per cm^3 getest en kreeg over de hele linie een groeitoeneming, die — de foutengrens in aanmerking genomen — gelijk was en 100 % bedroeg (tabel XII).

Tabel XII

Biotine-methylester	% groei
0,000004 γ per cm^3	90
0,00004 γ per cm^3	99
0,0004 γ per cm^3	102
0,004 γ per cm^3	93
0,04 γ per cm^3	99
0,4 γ per cm^3	99

Gezien het feit, dat zowel nicotinezuur als aneurine afzonderlijk toegediend geen groei veroorzaken, is het verrassend, dat biotine alleen wel degelijk groei veroorzaakt.

Waarschijnlijk is biotine alleen niet, of zeer weinig

werkzaam. Dat er toch nog een vrij aanzienlijke groei optreedt, vindt misschien zijn oorzaak hierin, dat de bacteriën een kleine hoeveelheid aneurine en nicotinezuur bevatten, welke uit de agarvoedingsbodem is opgenomen. Deze bevat behalve agar ook pepton en vleesextract. Vooral in dit laatste zullen de twee genoemde factoren in meerdere of mindere mate voorkomen en men mag veronderstellen, dat in het entmateriaal op deze wijze kleine hoeveelheden aanwezig zijn.

In een volgende reeks proeven werd bij een constante concentratie van nicotinezuur (5 γ per cm^3) de invloed van variërende concentraties biotine onderzocht (van 0,002 γ tot 0,1 γ per cm^3) (tabel XIII).

Tabel XIII

Biotine (Nicotinezuur 5 γ/cm^3)	% groei
0,002 γ per cm^3	298
0,006 γ per cm^3	338
0,01 γ per cm^3	378
0,02 γ per cm^3	382
0,06 γ per cm^3	405
0,1 γ per cm^3	408

Ook de combinaties van aneurine (0,005 γ tot 5 γ per cm^3) met biotine (in concentraties van 0,000004 γ en 0,00004 γ per cm^3) heb ik op hun werkzaamheid onderzocht (tabel XIV).

Tabel XIV

Aneurine	Biotine 0,000004 γ/cm³	Biotine 0,00004 γ/cm³
0,005 γ per cm³	71 %	108 %
0,05 γ per cm³	71 %	103 %
0,5 γ per cm³	92 %	112 %
5 γ per cm³	100 %	117 %

De combinatie biotine-nicotinezuur is dus 3 — 4 maal zo actief als die van biotine-aneurine.

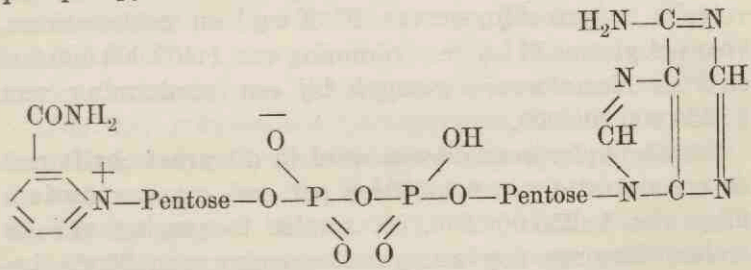
SLOTBESCHOUWING.

Volgens de in het laatste hoofdstuk vermelde onderzoekingen werden de resultaten van B. C. J. G. Knight, volgens welke nicotinezuur (nicotinezuuramide) en aneurine (vitamine B_1) belangrijke groeifactoren voor *Staphylococcus aureus* zijn, bevestigd.

Terwijl B. C. J. G. Knight bij zijn onderzoek de groei alleen door visuele schatting bepaalde, kon bij mijn proeven, met behulp van de in hoofdstuk II beschreven meetmethode, de bereikte groei quantitatief bepaald worden.

Het feit, dat aneurine en nicotinezuur bij *Staphylococcus aureus* en — zoals het zich aan laat zien — ook bij andere micro-organismen als groeistoffen fungeren, is van grote betekenis.

Door recente onderzoekingen van O. Warburg[77]) en H. von Euler[11]) is aangetoond, dat nicotinezuuramide een deel uitmaakt van de zogenaamde „Wirkungsgruppe" van de cozymase („di-phospho-pyridine-nucleotide" of „co-dehydrase I" (IV) en ook van de „co-dehydrase II" („tri-phospho-pyridine-nucleotide").



IV

Terwijl deze co-enzymen in samenwerking met de specifieke proteïnen dienst doen als overdragers van waterstof, speelt een derivaat van aneurine een rol bij de omzetting van pyrodruivenzuur tot aceetaldehyde. Door zeer recente onderzoekingen van K. Lohmann en Ph. Schuster[44]) weet men namelijk, dat de cocarboxylase identiek is met de pyrophosphorzure ester van aneurine.

Er is dus nu in twee gevallen een verband gelegd tussen groeistoffen en „Wirkungsgruppe" van een ferment, wat uit de aard der zaak een grote verdieping van ons inzicht in het chemisme van de groei betekent. Natuurlijk mogen deze resultaten niet zonder meer gegeneraliseerd worden.

Het belangrijkste resultaat van dit proefschrift is de vaststelling van het feit, dat behalve aneurine en nicotinezuur ook het door F. Kögl, B. Tönnis en L. Pons geisoleerde en gekarakteriseerde biotine één van de groeifactoren voor *Staphylococcus aureus* is. Het zal de taak van toekomstige onderzoekingen zijn na te gaan, of dit „phytohormoon" ook bij de groei van andere bacteriesoorten mede een rol speelt.

Voorlopig is het niet bekend, of de biologische reactie van het biotine ook met een bepaalde fermentwerking samenhangt. De drempelwaarde van zijn werkzaamheid ligt, volgens onderzoekingen van F. Kögl en medewerkers, voor het gistras M bij de verdunning van 1:400.000.000.000 en voor *Nematospora gossypii* bij een verdunning van 1:250.000.000.000.

Bij *Staphylococcus aureus* werd in dit proefschrift met de concentratie van 0,000004 γ per cm^3, d.i. een verdunning van 1:250.000.000.000, zonder toevoeging van de andere factoren nog een groeitoeneming van 90 % bereikt, zodat ook hier de drempelwaarde dezelfde is.

AANHANGSEL.

Over de groeifactoren van Aspergillus niger.

In de laatste jaren zijn verschillende publicaties van N. Nielsen en V. Hartelius verschenen, welke zich bezig hielden met de bestudering van de groeibevorderende factoren van *Aspergillus niger*.

N. Nielsen vond [56]), dat een voedingsoplossing, waarop *Rhizopus suinus* gekweekt was, stoffen bevatte, welke zowel de groei van de avenacoleoptile, als de productie van celmateriaal bij gist en *Aspergillus niger* bevorderden. Hij vatte deze stoffen samen onder de naam „Rhizopin".

Later [57]) vond hij, dat „Rhizopin" bestond uit de „Wuchsstoffe A", welke in aether oplosbaar zijn en gemakkelijk geoxydeerd kunnen worden, en de „Wuchsstoffe B", welke bestand zijn tegen oxydatie. De „Wuchsstoff A" is gekenmerkt door de werking op de avenacoleoptile en is — naar ons weten — identiek met β-indolylazijnzuur [34, 70]). „Wuchsstoff B" stimuleert de groei van Aspergillus niger en van gist.

Ten aanzien van het ontstaan van „Wuchsstoff B" vermelden N. Nielsen en V. Hartelius verschillende merkwaardige feiten; in het jaar 1932 schreven zij: [58])

„Die hier mitgeteilten Untersuchungen haben gezeigt, dass man auf rein chemischem Wege einen Wuchsstoff darstellen kann, der die Trockensubstanzproduktion von Aspergillus niger befördert. Dieser Wuchsstoff bildet sich, wenn Zuckerarten mit verschiedenen organischen

Säuren oder deren Ammoniumsalzen erwärmt werden. Eine notwendige Bedingung für die Wuchsstoffbildung ist die Anwesenheit von Filtrierpapier. Dieses ist wirksam auf Grund seines Gehalts an gewissen unverbrennlichen Substanzen. Auf Grund dieser Untersuchungen muss angenommen werden, dass der betreffende Wuchsstoff stickstoffrei ist."

Een jaar daarop komen ze tot de volgende conclusie [59]): „Filtrierpapier wirkt nicht, wie früher angenommen wurde, als Katalysator bei der Bildung von Wuchsstoff B. Diese Substanz bildet sich beim Erwärmen von Zucker mit gewissen organischen Säuren oder deren Ammoniumsalzen, auch wenn kein Filtrierpapier anwesend ist. Das Filtrierpapier wirkt dagegen als Co-Wuchsstoff, d. h. der Wuchsstoff B ist nur schwach wirksam, wenn der Nährlösung nicht gleichzeitig gewisse aus dem Filtrierpapier stammende Stoffe zugeführt werden. Das Filtrierpapier selbst hat keinen, oder nur ganz schwachen Einfluss auf die Trockensubstanzproduktion, wenn nicht gleichzeitig Wuchsstoff B in der Lösung anwesend ist.

Welche Stoffe die Wirkung des Filtrierpapieres verursachen, bleibt unentschieden. Möglicherweise ist es eine Mischung von verschiedenen Metallen.

Auch Zink wirkt als Co-Wuchsstoff, sodass ein Zinkzusatz die Wirkung des Wuchsstoffes B auf die Trockensubstanzproduktion fördert. Zink scheint indessen auf andere Weise zu wirken als Filtrierpapier, da die Wirkung einer optimalen Aschenmenge durch Zinkzusatz weiter verstärkt wird.

Bei der Bildung von Wuchsstoff B auf biologischem Wege durch Zucht von Rhizopus suinus ist der Einfluss

des Filtrierpapieres von gleicher Art wie bei der chemischen Wuchsstoffbildung. Wird Rhizopus suinus auf Ammoniumtartrat-Glukose ohne Filtrierpapier gezogen, so bildet sich zwar Wuchsstoff B, welcher jedoch nur dann auf die Trockensubstanzproduktion von Aspergillus niger wirken kann, wenn dem Präparat Filtrierpapier oder ein Auszug aus Filterasche oder Zink zugesetzt worden ist."

In 1935 publiceerden N. Nielsen en V. Hartelius[60]) een nieuw onderzoek, waarbij zij gevonden hadden, dat een mengsel van de chloriden van Ba, Be, Hg, Cr, Ca, Zn, Cd, Cu, Mn, Co en Li een sterkere „Co-Wuchsstoffwirkung" vertoonde dan de as van filtreerpapier. Afzonderlijk waren de meeste metalen onwerkzaam. De invloed van het filtreerpapier, respectievelijk de as, op de vorming van een groeistof verklaren de auteurs daardoor, dat de meeste der genoemde metalen hierin aanwezig zouden zijn.

Voordat ik met mijn eigen onderzoek begon, hetwelk ten doel had, de invloed van verschillende groeifactoren op *Aspergillus niger* na te gaan, heb ik enige der bovengenoemde proeven van N. Nielsen en V. Hartelius nagewerkt.

Ik bereidde de „Rhizopin"-oplossing op de door Nielsen en Hartelius aangegeven wijze[58]). Daartoe kweekte ik de schimmel *Rhizopus suinus*, waarvan mij een cultuur welwillend werd verstrekt door het Centraalbureau van Schimmelcultures te Baarn, op de volgende voedingsbodem:

$MgSO_4$ 7 aq.	p.a.	0,5 g
KH_2PO_4	puriss.	0,5 g
Glucose	p.a. anh.	10 g

NH_4-tartraat	puriss.	10 g
$FeCl_3$-opl. (1 %)		10 druppels
Gedest. water		1000 cm^3

Van deze oplossing werden telkens 25 cm^3 in Petrischalen (25 cm. diam.) gepipetteerd. Na toevoegen van twee vellen filtreerpapier (Schleicher en Schüll No. 597) van 20 cm. doorsnede werden de schalen gedurende een half uur bij 110° gesteriliseerd. Nadat de oplossingen geënt waren met een sporensuspensie van *Rhizopus suinus* — welke verkregen was door een mycelium met steriel water te schudden — werd de schimmel 5 dagen bij 33° gekweekt. Vervolgens werd de voedingsoplossing van het mycelium en het filtreerpapier afgeperst en in vacuo tot 1/5 van het oorspronkelijke volume geconcentreerd. Teneinde de zo verkregen oplossing te steriliseren werd zij door een steriel filter volgens Seitz gefiltreerd, waarna ik de werkzaamheid van de vloeistof ten opzichte van de groei van *Aspergillus niger* heb onderzocht.

Deze schimmel, *Aspergillus niger* v. Tieghem, eveneens van het Centraalbureau voor Schimmelcultures afkomstig, werd op de volgende, reeds door Nielsen en Hartelius[58]) beschreven voedingsbodem gekweekt:

$MgSO_4$ 7 aq	p.a.	0,5 g
KH_2PO_4	puriss.	0,5 g
NH_4NO_3	„	4 g
Glucose	p.a., anh.	10 g
$FeCl_3$-oplossing (1 %)		10 druppels
Gedest. water		1000 cm^3

Telkens 200 cm^3 van deze oplossing werden in erlenmeyers van 750 cm^3 gedurende ½ uur bij 110° gesteriliseerd.

De proeven voerde ik op de volgende wijze uit:

Er werden twaalf series, elk bestaande uit 20 erlen-

meyers, ingezet. Aan de ene helft van elke serie werd per kolf 4 cm^3 van de ingedampte voedingsbodem van *Rhizopus suinus* toegevoegd, terwijl de andere 10 erlenmeyers van 4 cm^3 steriel water werden voorzien. Deze laatste dienden ter bepaling van de blancowaarde na afloop van de proef.

Daarna entte ik alle kolven met 1 cm^3 sporensuspensie van *Aspergillus niger*, welke ik verkregen had door een mycelium van deze schimmel (een 4 dagen oude, rijkelijk van sporen voorziene cultuur) met 200 cm^3 steriele voedingsbodem te schudden. De culturen werden bij 33° gekweekt.

De twaalf series dienden om na te gaan, in hoeverre de productie van celmateriaal bij toediening van het „Rhizopin" ook afhing van de kweektijd. Te dien einde werd, te beginnen na 24 uren, telkens om de 12 uren een serie afgebroken en het drooggewicht van de culturen met en zonder toevoeging van Rhizopine bepaald. Na 36 uren heb ik om de 24 uren een serie voor de bepaling van het drooggewicht gebruikt.

De mycelia werden door een glasfilter van de voedingsoplossing afgefiltreerd, en met gedestilleerd water gewassen, tot het waswater neutraal reageerde ten opzichte van lakmoes. De mycelia werden daarna bij 105° tot constant gewicht gedroogd.

In tabel XV zijn de gevonden resultaten samengevat.

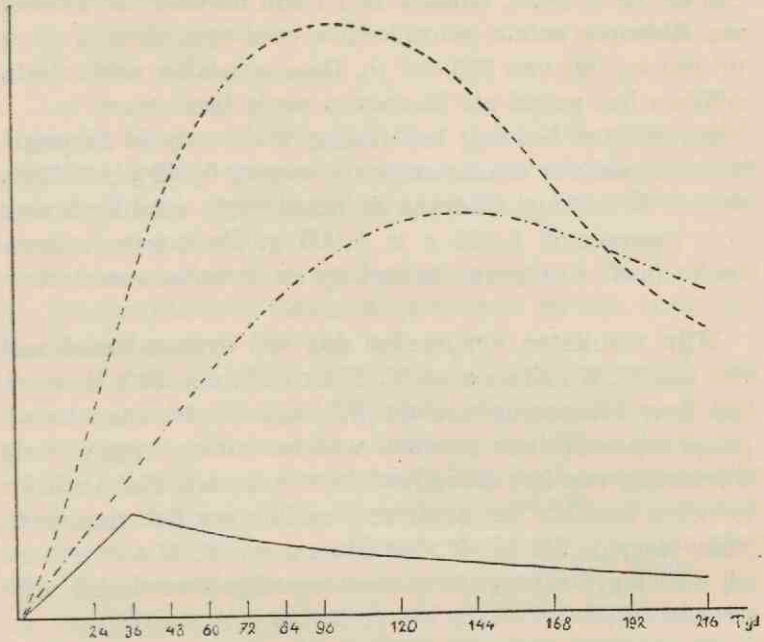
De opgegeven gewichten zijn de gemiddelden van 10 bepalingen. De fout is berekend volgens $\alpha = \sqrt{\frac{S^2}{n(n-1)}}$, waarin S de afwijking van elke bepaling van de gemiddelde waarde en n het aantal bepalingen is.

De in de laatste kolom vermelde grootheid f geeft de verhouding aan van het drooggewicht van een cultuur met „Rhizopin" en die van een cultuur zonder „Rhizopin" $(f = \frac{\text{gew. met „Rhizopin"}}{\text{gew. zonder „Rhizopin"}})$.

Tabel XV

tijd (uren)	Gewicht zonder „Rhizopin"	Gewicht met „Rhizopin"	f
24	0,116 g ± 0,006 g	0,219 g ± 0,019 g	1,89
36	0,180 g ± 0,017 g	0,492 g ± 0,015 g	2,74
48	0,256 g ± 0,017 g	0,629 g ± 0,006 g	2,45
60	0,316 g ± 0,019 g	0,661 g ± 0,013 g	2,09
72	0,364 g ± 0,006 g	0,730 g ± 0,011 g	2,00
84	0,417 g ± 0,018 g	0,717 g ± 0,036 g	1,71
96	0,463 g ± 0,014 g	0,772 g ± 0,017 g	1,63
120	0,483 g ± 0,031 g	0,703 g ± 0,006 g	1,44
144	0,533 g ± 0,014 g	0,685 g ± 0,012 g	1,28
168	0,495 g ± 0,022 g	0,559 g ± 0,020 g	1,15
192	0,465 g ± 0,014 g	0,429 g ± 0,009 g	0,92
216	0,423 g ± 0,020 g	0,366 g ± 0,025 g	0,87

Uit de tabel blijkt duidelijk, dat de culturen bij toevoeging van „Rhizopin" vooral in de loop van de eerste vier dagen een grotere toeneming van het drooggewicht tonen dan de controleculturen. Het quotiënt „f" heeft de grootste waarde (2,74) na 36 uren bereikt, om dan in de loop der volgende zes dagen geleidelijk tot 1 terug te lopen.



——————— : Curve van het quotient f.

-.-.-.-.-.- : Groeicurve van Aspergillus niger zonder toevoeging van „groeifactoren".

— — — — — — : Groeicurve van Aspergillus niger met toevoeging van „Rhizopin".

De culturen met „Rhizopin" zijn echter, zonder voorbehoud, niet met de controleculturen te vergelijken. Door toevoeging van 4 cm^3 Rhizopinoplossing werd tegelijk een zekere hoeveelheid voedingsstoffen in het substraat gebracht, zodat dus de concentratie hiervan groter werd dan die in de controlekolven. De mogelijkheid was niet uitgesloten, dat de aanwezigheid van meer voedingsstoffen ook een vermeerdering van de groei tengevolge zou hebben.

Om dit na te gaan, dampte ik 1 l van de voor het kweken van Rhizopus suinus gebruikelijke voedingsbodem in vacuo tot een volume van 200 cm^3 in. Deze oplossing werd op dezelfde wijze getest als hierboven reeds beschreven is.

Na 48 uren bedroeg het drooggewicht van de Aspergillus niger-cultuur zonder enige toevoeging 0,462 g ± 0,006 g en van de cultuur, waaraan de ingedampte voedingsbodem was toegevoegd, 0,468 g ± 0,005 g. De hogere concentratie heeft dus geen invloed op de groeivermeerdering.

Mijn resultaten vertoonden dus wel overeenkomst met die van N. Nielsen en V. Hartelius. Ook ik vond, dat door toevoeging van de „Rhizopin"-oplossing, *Aspergillus niger* sterker groeide, wat tot uiting kwam in de toeneming van het drooggewicht van de mycelia. In beide gevallen bereikte het quotiënt f na 36 uren het maximum, maar terwijl dit bij N. Nielsen en V. Hartelius bij 3,51 lag, bedroeg de overeenkomstige waarde bij mijn proeven 2,74.

Door de boven vermelde onderzoekingen van N. Nielsen en V. Hartelius was het waarschijnlijk gemaakt, dat de factoren („Wuchsstoffe B"), welke de groei van *Aspergillus niger* beïnvloeden, ook werkzaam zijn bij de vermeerdering van de gist.

Aangezien het bekend is, dat gist voor celvermeerdering en plasmagroei de verschillende bios-factoren nodig heeft, lag het voor de hand na te gaan, of de bij *Aspergillus niger* werkzame groeistof identiek was met één der factoren van het bios-complex.

Te dien einde heb ik drie componenten hiervan op hun werkzaamheid onderzocht:

1) meso-inosiet
2) biotine
3) „Bios III".

E. V. Eastcott[9]) had voor het eerst aangetoond, dat meso-inosiet identiek is met een der bios-factoren en aan F. Kögl en W. v. Hasselt[36]) is het gelukt, deze stof uit gist te isoleren.

Biotine is door F. Kögl en medewerkers[35]) uit eigeel in gekristalliseerde toestand verkregen en ook reeds gekarakteriseerd.

Van de factor III is tot nu toe nog weinig bekend; zelfs is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat men hier nog met een complex van meerdere factoren te maken heeft.

Van deze drie factoren bezit het biotine de grootste werkzaamheid; het oefent reeds in een verdunning van 1:400.000.000.000 een merkbare invloed uit op de groei van gist, terwijl de twee andere factoren afzonderlijk pas in veel hogere concentraties als groeistof fungeren.

Het was gewenst, de invloed van deze factoren op de groei van *Aspergillus niger*, zowel afzonderlijk als in verschillende combinaties, na te gaan.

Voor de proeven met biotine gebruikte ik een zeer actief praeparaat (basische halfester, activiteit 15.000.000 SE/g), hetwelk mij welwillend door den heer L. Ponster hand was gesteld.

Het praeparaat van „Bios III" was een ingedampt „koolfiltraat" zoals W. v. Hasselt het in zijn dissertatie beschreven heeft[24]) (activiteit: 50 γ/g).

Ik heb de volgende series ingezet:

1) blanco

2) 1 mg meso-inosiet /100 cm^3
3) biotine; 85 SE/100 cm^3
4) 10 mg „Bios III" /100 cm^3
5) 1 mg meso-inosiet /100 cm^3 + biotine; 85 SE/100 cm^3
6 1 mg meso-inosiet /100 cm^3 + 10 mg „Bios III" /100 cm^3.
7) biotine; 85 SE/100 cm^3 + 10 mg „Bios III" /100 cm^3
8) 1 mg meso-inosiet /100 cm^3 + biotine; 85 SE/100 cm^3 + 10 mg „Bios III" /100 cm^3.

De groeitijd bedroeg 48 uren.

Uit het volgende staatje blijkt, dat de toegevoegde factoren in genoemde concentraties, zowel afzonderlijk als

Tabel XVI

Toegevoegde factoren	gewicht	f
blanco	0,589 g ± 0,006 g	1,00
1 mg meso-inosiet /100 cm^3	0,577 g ± 0,006 g	0,98
85 SE /100 cm^3	0,546 g ± 0,004 g	0,93
10 mg III /100 cm^3	0,578 g ± 0,005 g	0,98
1 mg m-inosiet, 85 SE /100 cm^3	0,513 g ± 0,003 g	0,89
1 mg m-inosiet, 10 mg III /100 cm^3	0,578 g ± 0,007 g	0,98
85 SE, 10 mg III /100 cm^3	0,539 g ± 0,001 g	0,92
1 mg m-inosiet, 85 SE, 10 mg III /100 cm^3	0,549 g ± 0,005 g	0,93

Tabel XVII

toegevoegde factoren	gewicht na 24 uren	f	gewicht na 48 uren	f	gewicht na 72 uren	f
blanco	0,204g ± 0,017g	1,00	0,445g ± 0,020g	1,00	0,528g ± 0,032g	1,00
10 mg inos./100 cm^3	0,220g ± 0,016g	1,08	0,460g ± 0,027g	1,03	0,549g ± 0,017g	1,04
3000 SE/100 cm^3	0,209g ± 0,024g	1,00	0,533g ± 0,034g	1,20	0,501g ± 0,015g	0,95
100 mg III/100 cm^3	0,275g ± 0,028g	1,34	0,686g ± 0,021g	1,54	0,748g ± 0,010g	1,41
10 mg inos. 3000 SE /100 cm^3	0,275g ± 0,020g	1,34	0,481g ± 0,035g	1,08	0,645g ± 0,009g	1,22
10 mg inos. 100 mg III /100 cm^3	0,313g ± 0,030g	1,53	0,707g ± 0,017g	1,60	0,760g ± 0,007g	1,44
3000 SE 100 mg III /100 cm^3	0,264g ± 0,016g	1,29	0,727g ± 0,025g	1,63	0,757g ± 0,020g	1,43
10 mg inos. 3000 SE 100 mg III /100 cm^3	0,296g ± 0,020g	1,45	0,757g ± 0,024g	1,70	0,766g ± 0,015g	1,45

in combinatie, de groei van *Aspergillus niger* niet beïnvloeden.

Vervolgens heb ik dezelfde combinaties der factoren in grotere concentraties getest, namelijk:
meso-inosiet 10 mg/100 cm^3
biotine 3000 SE/100 cm^3
„Bios III" 100 mg/100 cm^3

Bij deze proeven heb ik tegelijkertijd de invloed van de kweektijd onderzocht, door de gewichten van de mycelia na 48, 72 en 96 uren te bepalen.

Het bleek echter ook hierbij, dat het bios-complex slechts een zeer gering effect op de vorming van celmateriaal heeft (tabel XVII).

Van de drie factoren vertoont feitelijk alleen „Bios III" een zeer zwakke werkzaamheid.

Ter bevestiging van deze resultaten heb ik proeven met nog hogere concentraties van biotine uitgevoerd, echter zonder een werkzaamheid van deze factor te kunnen constateren. (tabel XVIII). De kweektijd bedroeg 48 uren.

Tabel XVIII

toegevoegde factoren	gewicht	f
blanco	0,238g ± 0,010g	1,00
biotine 3.10^4 SE/100 cm^3	0,283g ± 0,014g	1,19
10 mg meso-inosiet, biotine 3.10^4 SE /100 cm^3	0,331g ± 0,013g	1,39
10 mg inosiet, biotine 3.10^4 SE /100 cm^3	0,386g ± 0,009g	1,60

Het feit, dat de onderzochte bios-factoren voor *Aspergillus niger* niet de betekenis hebben van groeistoffen, is in overeenstemming met een onlangs gepubliceerd onderzoek van N. Nielsen en V. Hartelius[62]). Deze auteurs komen tot de conclusie, dat de „Wuchsstoffe B" in twee groepen gesplitst moeten worden, nl. „Wuchsstoffe B_1", welke op de celvermeerdering van gist invloed hebben — en waarvoor dus in de overige literatuur sinds lang de benaming bios-factoren, respectievelijk bios-complex gebruikelijk is — en „Wuchsstoffe B_2", welke — slechts bij aanwezigheid van metalen als „Co-Wuchsstoffe" — de groei van *Aspergillus niger* bevorderen.

W. H. Schopfer[67]) heeft bij de schimmel *Phycomyces Blakesleeanus* gevonden, dat aneurine een bijzonder sterke groeibevorderende invloed heeft, zodat de auteur voorstelt, deze schimmel als gevoelig testobject voor de bepaling van aneurine te gebruiken. Dit feit gaf er aanleiding toe na te gaan, of misschien ook de groei van *Aspergillus niger* gestimuleerd zou worden door toevoeging van aneurine aan de voedingsbodem. Daar ik bij de proeven over de invloed van het bios-complex gevonden had, dat het meso-inosiet de groei, zij het ook in zeer geringe mate, bevorderde, heb ik tevens de combinatie meso-inosiet + aneurine getest. De gevolgde methodiek was gelijk aan de hierboven reeds beschrevene. De broedtijd was 48 uren (tabel XIX).

De resultaten wezen uit, dat de groei van *Aspergillus niger* door toediening van aneurine niet beïnvloed wordt.

In een volgende proef heb ik tenslotte nog nagegaan, of de combinatie biotine ($5\gamma/100$ cm^3), meso-inosiet (20 mg/100 cm^3) en aneurine ($5\ \gamma/100$ cm^3) misschien een be-

Tabel XIX

toegevoegde factoren	gewicht	f
blanco	74,9mg ± 3,3mg	1,00
0,05 γ aneurine/100 cm³	65,3mg ± 3,3mg	0,87
0,5 γ „ „	71,0mg ± 3,3mg	0,95
5 γ „ „	55,3mg ± 3,0mg	0,74
50 γ „ „	54,2mg ± 3,1mg	0,72
0,05 γ an., 10 mg inosiet/100 cm³	57,2mg ± 1,0mg	0,76
0,5 γ „ „	67,8mg ± 3,4mg	0,90
5 γ „ „	65,3mg ± 2,1mg	0,87
50 γ „ „	62,8mg ± 0,9mg	0,84

vordering van de groei tengevolge zou hebben. Uit de bepaling na een kweektijd van 48 uren verkreeg ik voor f de waarde: f = 1,30. De grootte van het quotiënt f is hier dus van dezelfde orde als die in de tabellen XVII en XVIII, waar alleen meso-inosiet en biotine waren toegevoegd. Onder de gegeven omstandigheden heeft aneurine dus geen stimulerende invloed op de vermeerdering van celmateriaal bij *Aspergillus niger*.

Het is tot nu toe niet gelukt, voor *Aspergillus niger* een specifieke groeistof aan te tonen, welke — in geringe hoeveelheden toegediend — voor de celvermeerdering van deze schimmel noodzakelijk is. De werkzaamheid van de ruwe „Rhizopin"-oplossingen en van het eveneens nog zeer onzuivere „Bios III' is nog geen bewijs voor de aanwezigheid van een echte groeifactor in deze extracten. In een recente publicatie[61]) hebben N. Nielsen en V. Har-

telius meegedeeld, dat toevoeging van pyrodruivenzuur en glycolzuur aan de voedingsbodem een duidelijke verhoging van het drooggewicht van *Aspergillus niger* tengevolge heeft. Ook glyoxylzuur alleen, of in combinatie met de twee genoemde stoffen, heeft een dergelijke invloed. In dezelfde richting wijzen de reeds eerder beschreven proeven van deze auteurs, waarbij door verhitten van de voedingsoplossing met organische zuren de „Wuchsstoffe B" zouden ontstaan.

Weliswaar is het niet altijd mogelijk een scherpe grens te trekken tussen de voor het organisme noodzakelijke voedingsstoffen en de specifieke actieve stoffen, zoals vitaminen en hormonen. In dit geval echter moeten m.i. pyrodruivenzuur, glycolzuur, enz. ongetwijfeld onder de noodzakelijke voedingsstoffen worden gerangschikt.

LITERATUURLIJST.

1. H. Agulhon, R. Legroux : Compt. rend. **167**, 597 (1918).
2. O. Baudisch : Biochem. Z. **245**, 278 (1932).
3. A. Borrel, A. de Coulon, L. Boez, J. Quimard : Compt. rend. Soc. Biol. **86**, 388 (1922).
4. A. Borrel, L. Boez, A. de Coulon: Compt. rend. Soc. Biol. **89**, 191 (1923).
5. A. Davidson : Biochem. Z. **150**, 304 (1924).
6. D. J. Davis : J. inf. Dis. **21**, 392 (1917)..
7. D. J. Davis : J. inf. Dis. **29**, 171 (1921).
8. D. J. Davis : J. inf. Dis. **29**, 187 (1921).
9. E. V. Eastcott : J. phys. chem. **32**, 1094 (1928).
10. F. Eberson : J. Am. med. ass. **72**, 852 (1919).
11. H. v. Euler, F. Schlenk : H. S. **246**, 64 (1936).
12. P. Fildes : Brit. J. exp. path. **2**, 16 (1921).
13. P. Fildes : Brit. J. exp. path. **4**, 265 (1923).
14. P. Fildes : Brit. J. exp. path. **5**, 69 (1924).
15. P. Fildes, G. P. Gladstone, B. C. J. G. Knight : Brit. J. exp. path. **14**, 189 (1933).
16. P. Fildes, G. M. Richardson : Brit. J. exp. path. **16**, 326 (1935).
17. P. Fildes, G. M. Richardson, B. C. J. G. Knight, G. P. Gladstone: Brit. J. ex. path. **17**, 481 (1936).
18. M. Flack : Brit. med. J. **1916** II, 682.
19. L. Freedman, C. Funk : J. metabol. Res. **1**, 457 (1922).
20. L. Freedman, C. Funk : J. metabol. Res. **1**, 469 (1922).
21. M. H. Gordon, T. G. M. Hinne : Brit. med. J. **1916** II, 78.
22. G. A. C. Gough : Biochem. J. **26**, 248 (1932).
23. G. A. C. Gough : Biochem. J. **27**, 1049 (1933).
24. W. v. Hasselt : Dissertatie Utrecht **1935**, blz. 78—80.
25. S. Hosoya, M. Kuroya : C. **1925** II, 1051.
26. A. Itano : J. bact. **8**, 483 (1923).
27. B. C. J. G. Knight : Brit. J. exp. path. **16**, 315 (1935).
28. B. C. J. G. Knight : Nature **139**, 628 (1937).
29. B. C. J. G. Knight : Biochem. J. **31**, 731 (1937).
30. B. C. J. G. Knight : Biochem. J. **31**, 966 (1937).
31. B. C. J. G. Knight, P. Fildes : Brit. J. exp. path. **14**, 112 (1933).
32. F. Kögl : Ber. **68**, 16 (1935).
33. F. Kögl : Naturwiss. **23**, 839 (1935).
34. F. Kögl, D. G. F. R. Kostermans: H. S. **288**, 113 (1934).
35. F. Kögl, B. Tönnis : H. S. **242**, 43 (1936).
36. F. Kögl, W. v. Hasselt : H. S. **242**, 74 (1936).
37. D. G. F. R. Kostermans : Dissertatie Utrecht **1935**.
38. R. Legroux, J. Mesnard : Compt. rend. **170**, 901 (1920).

39. B. Leichtentritt, M. Zielaskowsky: Biochem. Z. **131**, 499 (1922).
40. B. Leichtentritt, M. Zielaskowsky: Biochem. Z. **131**, 512 (1922).
41. D. J. Lloyd : J. path. **21**, 113 (1916).
42. D. J. Lloyd : Brit. med. J. **1916** II, 143.
43. D. J. Lloyd : Brit. med. J. **1917** I, 11.
44. K. Lohmann, Ph. Schuster : Naturwiss. **25**, 26 (1937).
45. K. Meyer : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **131**, 289 (1934).
46. K. Meyer : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **131**, 291 (1934).
47. W. J. H. Moll : Verslag Akad. Wetenschappen, Amsterdam **28**, 1001 (1919—1920).
48. J. H. Mueller : J. bact. **7**, 309 (1922).
49. J. H. Mueller : J. bact. **7**, 325 (1922).
50. J. H. Mueller : J. biol. chem. **56**, 158 (1923).
51. J. H. Mueller : J. bact. **29**, 383 (1935).
52. J. H. Mueller : J. bact. **30**, 513 (1935).
53. J. H. Mueller : J. biol. chem. **120**, 219 (1937).
54. J. H. Mueller, K. S. Klise, E. F. Porter, A. Graybid: J. bact. **25**, 509 (1933).
55. H. S. Müller : H. S. **209**, 207 (1932).
56. N. Nielsen : C. R. Lab. Carlsberg **19**, No. 5 (1931).
57. N. Nielsen : C. R. Lab. Carlsberg **19**, No. 8 (1932).
58. N. Nielsen, V. Hartelius : Biochem. Z. **256**, 2 (1932).
59. N. Nielsen, V. Hartelius : Biochem. Z. **259**, 340 (1933).
60. N. Nielsen, V. Hartelius : Biochem. Z. **276**, 183 (1935).
61. N. Nielsen, V. Hartelius : Nature **138**, 203 (1936).
62. N. Nielsen, V. Hartelius : C. R. Lab. Carlsberg **22**, No. 1 (1937).
63. J. Orr-Ewing, V. Reader : Biochem. J. **22**, 443 (1928).
64. A. M. Pappenheimer Jr. : Biochem. J. **29**, 2057 (1935).
65. R. A. Peters, H. W. Kinnersley, J. Orr-Ewing, V. Reader: Biochem. J. **22**, 445 (1928).
66. H. Schmidt : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **94**, 94 (1925).
67. W. H. Schopfer : Z. Vitaminforschg. **4**, 67 (1935).
68. C. Shearer : Lancet **1917** I, 59.
69. E. L. Tatum, H. G. Wood, W. H. Peterson: Biochem. J. **30**, 1898 (1936).
70. K. V. Thimann : J. biol. chem. **109**, 279 (1935).
71. T. Thjötta, O. T. Avery : J. exp. med. **34**, 97 (1921).
72. T. Thjötta, O. T. Avery : J. exp. med. **34**, 455 (1921).
73. N. Uschinsky : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **14**, 316 (1893).
74. N. Uschinsky : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. **21**, 146 (1897).
75. F. C. O. Valentine, T. M. Rivers: J. exp. med. **45**, 993 (1927).
76. Wangliang : Compt. rend. Soc. Biol. **112**, 429 (1933).
77. O. Warburg, W. Christian, A. Griese: Biochem. Z. **282**, 157 (1935).

78. L. T. Webster, O. Baudisch : J. exp. med. 42, 473 (1925).
79. H. G. Wells, E. R. Long : The chemistry of tuberculosis 2nd ed. 1932, blz. 10.
80. C. H. Werkman : J. bact. 14, 335 (1927).
81. H. R. Whitehead : Biochem. J. 17, 742 (1923).
82. H. R. Whitehead : Biochem. J. 18, 829 (1924).
83. H. R. Whitehead : Biochem. J. 20, 1147 (1926).
84. E. Wildiers : La Cellule 18, 313 (1901).
85. R. J. Williams, R. R. Roehm : J. biol. chem. 87, 581 (1930).

---

l.1.

STELLINGEN.

I

De bepaling van het oxydatie-aequivalent kan van grote waarde zijn bij het onderzoek naar de constitutie van biologisch belangrijke stoffen.

R. J. Williams, J. Am. Chem. Soc. **59**, 288 (1937).

II

Uit de onderzoekingen van L. H. Leonian en V. G. Lilly mag niet de conclusie worden getrokken, dat hetero-auxine in het algemeen een remmende werking heeft op de groei.

L. H. Leonian, V. G. Lilly, Am. J. bot. **24**, 133 (1937).

III

Het is niet zeker, dat het door Rosenheim en Starling verkregen Δ^5-cholesteen-diol (3,4) een „cis"-glycol is.

A. Butenandt, E. Hausmann, Ber. **70**, 1154 (1937).

IV

De conclusie van P. Hidnert, dat antimoon tussen 20° en 560° C. geen polymorfie zou vertonen, berust op zwakke gronden.

P. Hidnert: J. Research National Bureau of Standards **14**, 523 (1935).

V

J. L. Culbertson en L. L. Winter hebben niet bewezen, dat de anomaliteiten, welke optreden bij de bepaling van de dichtheden van poedervormige stoffen, toe te schrijven zouden zijn aan de vermindering van de oppervlakte-energie, veroorzaakt door adsorptie.

J. L. Culbertson, L. L. Winter: J. Am. Chem. Soc. **59**, 308 (1937).

VI

De onderzoekingen van G. I. Finch en medewerkers maken het waarschijnlijk, dat de zogenaamde „Beilby"-laag amorph is.

G. I. Finch, A. G. Quarrell, H. Wilman: Trans. Farad. Soc. **31**, 1051 (1935).

H. G. Hopkins: Trans. Farad. Soc. **31**, 1095 (1935).

C. S. Lees: Trans. Farad. Soc. **31**, 1102 (1935).

G. I. Finch, H. Wilman: Trans. Farad. Soc. **33**, 337 (1937).

VII

De vorming van antistoffen in de plant is waarschijnlijk gelijkwaardig aan die in het dierlijke organisme.

Th. Frémont, Ann. de l Institut Pasteur **58**, 531 (1937).