Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Bijdrage tot de kennis van de biochemie der dysenterie-bacteriën

https://hdl.handle.net/1874/289257

gu. 192, 1928.

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE BIOCHEMIE DER DYSENTERIE-BACTERIËN

V. H. VAN DEN BERGH

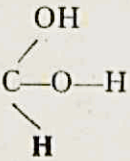
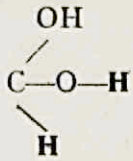
s.
cht
8

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ERRATA.

Blz. 6 regel 6 v. o. proto-plasma lees: protoplasma

Blz. 44 noot DAKES lees: PAKES
GRRY lees: GREY

Blz. 62 onderaan  lees: 

Blz. 69 regel 2—6 v. o. vervallen.
Lees hiervoor:
Toch wijst het resultaat van de sulfietgisting van het pyrodruivenzuur in de richting van een decarboxylatie, zoodat voor beide verklaringen, aangegeven op blz. 42, een plaats moet worden ingeruimd.
De eerste voorstelling geeft echter zeker de hoofdreactie weer; de tweede voorstelling moet beschouwd worden als die, van een nevenreactie, die bij de sulfietgisting eenigermate tot uiting komt, doch die bij de glucose-ontleding zeker sterk op den achtergrond treedt.

Blz. 71 regel 14 v. o. moet mogelijk ook zijn lees: moet zijn, mogelijk ook

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE BIOCHEMIE DER DYSENTERIE-BACTERIËN

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 3142

Diss. Utrecht 1928

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE BIOCHEMIE DER DYSENTERIE-BACTERIËN

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. B. J. H. OVINK, HOOGLEERAAR 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 23 JANUARI 1928, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

VICTOR HUBERT VAN DEN BERGH

GEBOREN TE DJOCJA-KARTA (JAVA)

LEIDEN — S. C. VAN DOESBURGH — 1928

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN ALLEN, DIE MIJ HET
VOLEINDEN VAN MIJN STUDIE
HEBBEN MOGELIJK GEMAAKT.

Nu het einde van mijn universitaire studie genaderd is, kan ik niet nalaten U, Hoogleeraren der Wis- en Natuurkundige Faculteit mijn oprechten dank te betuigen voor alles, wat ik onder Uw leiding heb mogen ervaren.

Hooggeleerde VAN ROMBURGH, niet alleen heb ik altijd het enthousiasme, waarmede Gij de belangstelling voor de wetenschappelijke studie der Organische Chemie bij Uw leerlingen wist wakker te roepen, gewaardeerd, doch ook voor Uw vriendschappelijke raadgevingen, die ik tijdens mijn studie van U heb mogen ontvangen, zal ik U steeds erkentelijk blijven.

De wijze, waarop Gij, Hooggeleerde KRUYT, mijn interesse voor diverse physico-chemische problemen hebt weten op te wekken, zal voor mij van onschatbare waarde blijven. Ook de manier, waarop Gij aan Uw leerzame excursies leiding wist te geven, zal ik steeds als voorbeeld voor oogen houden.

Ook U, Hooggeleerde COHEN, ben ik zeer dankbaar voor hetgeen ik onder Uw leiding op het van 't Hoff-laboratorium heb mogen leeren.

Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, indien ik uit wilde drukken, welke gevoelens ik jegens U koester, dan weet ik, dat ik veel te kort zou schieten. Gij zijt dengene geweest, die mijn oogen heeft geopend voor de grootsche en belangrijke problemen in de Microbiologie.

De tijd, dien ik bij U assistent ben geweest, is zeker een der allerbelangrijkste tijden uit mijn studie. Meer dan eens heb ik in dien tijd kunnen ervaren, welk een menschelijk medegevoel Gij paart aan een grooten, ruim-wetenschappelijken geest.

De wijze, waarop Gij zich met onvermoeide ambitie voor mij en mijn werk interesseerde, zal ik niet licht vergeten.

Dat ik den tijd van mijn assistentschap in Uw laboratorium heb mogen doorbrengen, Hooggeleerde SCHOORL, is voor mij

een reden, om erkentelijk te zijn. Ook dank ik U voor het feit, dat Gij mij vertrouwd hebt gemaakt met de microchemische analyse.

Uw hulpvaardigheid en juiste kritiek hebben mij vaak geholpen.

Gaarne gebruik ik deze gelegenheid om ook U, Hooggeleerde WENT, dank te zeggen voor hetgeen ik bij U heb mogen leeren. Van groote waarde voor mijn microbiologische ontwikkeling is zeker het schimmel-practicum, dat ik bij U heb gevolgd.

Dat ik geen discipel van U ben geworden, is aan omstandigheden te wijten. Dit neemt niet weg, dat ik mij steeds warm voor Uw Wetenschap heb geïnteresseerd en dit steeds zal blijven doen.

Hooggeleerde WESTERDIJK, U dank ik voor alles, wat ik van U als Mensch heb mogen leeren. Door Uw persoonlijkheid hebt Gij mede bijgedragen tot mijn ontwikkeling.

U, Hooggeleerde SÖHNGEN, dank ik zeer voor de gastvrijheid, die ik in Uw uitnemend laboratorium heb mogen genieten. De tijd, dien ik bij U heb doorgebracht, zal mij steeds bijblijven als een der meest aangename tijden.

Ten slotte dank ik U, waarde WILLEMSE, voor de wijze, waarop Gij mij bij het vervaardigen der microfoto's hebt bijgestaan.

INHOUD.

Bladz.

HOOFDSTUK I: *Inleiding* 1
HOOFDSTUK II: *De micro-organismen* 8
HOOFDSTUK III: *Qualitatief onderzoek naar de vergistingsproducten van glucose door niet-gasvormende vertegenwoordigers der coli-typhusgroep.*
§ 1. Indeeling der producten en reacties 16
§ 2. Experimenteel gedeelte 24
§ 3. Resultaten. 27
HOOFDSTUK IV: *Onderzoek naar de vorming van aceetaldehyde als tusschenproduct.*
§ 1. Bespreking der methoden. 31
§ 2. Experimenteel gedeelte 34
§ 3. Resultaat 36
§ 4. Andere bijproducten der sulfietgisting . . . 36
HOOFDSTUK V: *Ontleding van enkele andere stoffen.*
§ 1. Ontleding van pyrodruivenzuur 39
§ 2. Ontleding van Na-formiaat 44
HOOFDSTUK VI: *Quantitatieve bepalingen der ontledingsproducten, door dysenterie-bacteriën uit glucose gemaakt.*
§ 1. De waarde van het quantitatief onderzoek . . 46
§ 2. De gebruikte bepalingsmethoden. 48
§ 3. Experimenteel gedeelte 52
§ 4. De resultaten 56
HOOFDSTUK VII: *Theoretische beschouwingen.*
§ 1. Het chemisme 62
§ 2. Slotbeschouwingen 71
SUMMARY 76

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Wanneer we onder de „gemengd-zure gisting" hebben te verstaan, de ontleding van koolhydraten ten gevolge van de inwerking van bepaalde micro-organismen, bij welke inwerking, als complex van ontledingsproducten, ontstaat een mengsel van verscheidene zuren, dan heeft men in de vertegenwoordigers der *coli-typhus*-groep de mooiste voorbeelden van microben, die een dergelijke gemengd-zure gisting teweegbrengen.

Immers, wij tellen onder de ontledingsproducten niet minder dan vier zuren n.l.: mierenzuur, azijnzuur, barnsteenzuur en melkzuur, waarnaast veelal nog de gassen H_2 en CO_2 kunnen ontstaan.

Het valt dadelijk op, dat men de groote groep der *coli-typhus*-achtige organismen verdeelen kan in twee ondergroepen n.l.: in gasvormers (H_2 en CO_2) en in niet-gasvormers.

Tot de eerste groep behooren: *Bact. coli*, *Bact. paratyphi A* en *B*.

Tot de tweede groep: *Bact. typhi* en de verschillende soorten van *Bact. dysenteriae*.

Dit onderscheid is er één van zeer stabielen aard, zoodat men reeds langen tijd op deze wijze het in het algemeen apathogene *Bact. coli* onderscheidde van het *Bact. typhi* of *Bact. dysenteriae*.

Voor een mogelijk verschil in chemisme t. o. v. de suiker-ontleding, had men nog geen oog.

En zelfs toen het geheele gistingsprobleem — en wel in hoofdzaak de alcoholische gisting — in het brandpunt der belangstelling van de biochemici kwam te staan, en men min of meer geslaagd was in het opstellen van plausibele theoriën

over het chemisch verloop der suikerontleding, zelfs toen — en nu ook nog niet — had men geen afdoende chemische verklaring gezocht voor dit groote verschil in ontleding, teweeg gebracht door oogenschijnlijk zoo uitermate naverwante bacterie-soorten.

Eensdeels is dit te wijten aan het feit, dat de *typhus*- en *dysenterie*-bacteriën hoofdzakelijk zijn onderzocht door medici, wier interesse op een geheel ander gebied ligt, dan op dat, der zuivere biochemie. Deze onderzoekingen hebben dan ook òf clinische, òf aetiologische, òf differentiaal-diagnostische waarde, maar geven geen dieper inzicht in het chemisme zèlf.

Aan den anderen kant is het feit, dat we hier te maken hebben met virulente, pathogene organismen, mede een oorzaak, dat chemici zich zoo weinig met deze bacteriën hebben bezig gehouden.

Anders is het met *Bact. coli.*

Dit organisme, dat zoo algemeen verspreid voorkomt, zoo bijzonder gemakkelijk te isoleeren is en zoo bij uitstek zich leent tot het voortkweeken op kunstmatige voedingsbodems, ligt a. h. w. voor het grijpen en men greep er dan ook naar.

Hoewel de waarde, uitgebreidheid en bedoeling van de onderzoekingen met dit organisme gedaan, zeer uiteenloopen, kan men toch zeggen, dat deze onderzoekingen tot een resultaat hebben geleid.

Het is onnoodig, hier een overzicht te geven van al deze publicatie's, daar wij ons speciaal met de niet-gasvormers zullen bezighouden.

Waar noodig, zal de betreffende litteratuur worden aangehaald.

Ook over de para-typhioïdeeën bestaan onderzoekingen.

Zoo heeft DUCAMP (1) de ontleding van verschillende koolhydraten nagegaan.

POTTEVIN (2) vond als ontledingsproducten: alcohol, azijnzuur, melkzuur, barnsteenzuur en CO_2 en H_2; van mierenzuur wordt niet gesproken.

Daarna heeft DE GRAAFF (3) een uitgebreid en zeer con-

scientieus onderzoek ingesteld naar de ontledingsproducten door de paratyphioïdeeën gevormd.

Dit onderzoek is niet alleen qualitatief doch ook quantitatief uitgewerkt en brengt tevens naar voren, welk verband er bestaat tusschen de gevormde producten en de sterische configuratie van het koolhydraatmolecule, waar men van uit is gegaan.

Tevens wordt onomstootelijk het voorkomen van mierenzuur als ontledingsproduct aangetoond.

WAGNER (4) trachtte op vrij gebrekkige wijze tot een bepaalde quantitatieve getallenverhouding te komen tusschen de gas- en de zuurvorming.

Over de biochemie der *typhus*- en *dysenterie*-bacteriën is al heel weinig litteratuur te vinden.

SERA (5) bepaalde alleen de vluchtige zuren met de destillatiemethode van DUCLAUX en vond bij *typhus* steeds mierenzuur en azijnzuur, soms sporen alcohol, welk laatste lichaam door HARDEN (6) steeds zeer duidelijk kon worden aangetoond.

Op melkzuur heeft SERA in het geheel niet gereageerd.

Bij *Bact. dysenteriae* vond SERA (7) mierenzuur en azijnzuur steeds in wisselende verhouding.

WINTER (8) bepaalde alleen de totale zuurvorming quantitatief en onderwierp verder de cultuurvloeistof aan een stoomdestillatie, om in het destillaat qualitatief op de vluchtige zuren te reageeren, waarbij hij vond: mierenzuur, azijnzuur, hoogere vetzuren en boterzuur.

Uit dit litteratuur-overzicht blijkt wel, dat er feitelijk nog geen proeven verricht zijn met de niet-gasvormende vertegenwoordigers der *coli-typhus*-groep, speciaal met het doel, een dieper inzicht in de biochemische suikerontleding te verkrijgen.

Gaan we zeer in het kort de voornaamste gistings-theoriën na, dan moeten wij allereerst onze oogen richten op die theorie, die NEUBERG (9) (10) speciaal voor de alcoholische gisting heeft opgesteld.

In het kort kan deze theorie worden weergegeven door volgend schema:

a. $C_6H_{12}O_6 - 2\,H_2O = C_6H_8O_4$ ($CH_2OH\,.\,CO\,.\,CHOH\,.\,CH_2\,.\,CO\,.\,CHO$)
(aldolcondens. van methylglyoxaal)

b. $C_6H_8O_4 = 2\,C_3H_4O_2$ ($CH_3\,.\,CO\,.\,CHO$) (methyl glyoxaal).

c. $CH_2{:}COH\,.\,CHO + H_2O + \begin{matrix} H_2 \\ O \end{matrix} = \begin{matrix} CH_2OH\,.\,CHOH\,.\,CH_2OH \text{ (glycerine) (1)} \\ CH_3CO\,COOH \text{ (pyrodruivenzuur) (2)} \end{matrix}$
$CH_2{:}COH\,.\,CHO$

d. $CH_3CO\,COOH = CO_2 + CH_3\,CHO$ (aceetaldehyde).

e. $\begin{matrix} CH_3CHO \\ CH_3CO\,CHO \end{matrix} + \begin{matrix} H_2 \\ O \end{matrix} = \begin{matrix} CH_3CH_2OH \text{ (aethylalcohol) (1)} \\ CH_3CO\,COOH \text{ (pyrodruivenzuur) (2).} \end{matrix}$

Afgezien van het feit, dat de vorming van het methylglyoxaal via reactie *a* en *b* volmaakt hypothetisch is, kan men de verdere voorstelling inderdaad als een zeer elegante weergave van het mogelijke chemisme aanvaarden, al blijft het geheel toch steeds een werkhypothese.

Immers, is het methylglyoxaal eenmaal gevormd en heeft zich de reactie van CANNIZZARO volgens *c* ingezet, dan zal het gevormde pyrodruivenzuur onmiddellijk door de carboxylase gedecarboxyleerd worden, waarna het zoo gevormde aceetaldehyde met het methylglyoxaal een andere CANNIZZARO-omzetting ondergaat, waarbij aethylalcohol en wederom pyrodruivenzuur ontstaan. Deze laatste stof ondergaat weer de omzetting *d*, en men krijgt dus een kringloop rond de processen *a*, *b*, *d* en *e*. Reactie *c* is dus een inleidende reactie om de eerste hoeveelheid pyrodruivenzuur te vormen. Dat hierbij volgens c_1 sporen glycerine worden gevormd, wordt door de proeven bevestigd.

Hoe gelukkig NEUBERG ook is geweest in het opstellen van deze voorstelling der alcoholische gisting, zeker is hij dat niet in zijn poging de bacteriëele gisting op analoge wijze te verklaren.

Immers geeft hij als „Idealgleichung" voor de vergisting t. g. v. *Bact. coli* (11) het volgende op:

α) $2\,C_6H_{12}O_6 = 2\,CH_3\,.\,CHOH\,.\,COOH + 2\,CH_3CO\,.\,COOH + 2\,H_2$

β) $2\,CH_3\,.\,CO\,.\,COOH = 2\,CH_3\,.\,CHO + 2\,CO_2$

γ) $2\,CH_3\,.\,CHO + H_2O = C_2H_5OH + CH_3\,COOH.$

Hoe eenvoudig en plausibel dit schema ook moge lijken, het houdt zeker niet voldoende rekening met de feiten.

Als zuren zien wij hier optreden: melkzuur en azijnzuur. Waar blijven barnsteenzuur en mierenzuur?

Volgens γ moet men aannemen, dat er aequivalente hoeveelheden alcohol en azijnzuur worden gevormd. Hoe kan men het dan verklaren, dat er steeds *sporen* alcohol gevonden worden naast zeer makkelijk aantoonbare en meetbare hoeveelheden azijnzuur?

Ook gaat NEUBERG uit van de veronderstelling, dat *Bact. coli* feitelijk beschouwd moet worden als een „melkzuurgister".

Uit de proeven van VIRTANEN (12) nu blijkt, dat de hoeveelheid gevormd melkzuur varieeren kan tusschen 1% en 20%, dus dat dit zuur zeker rijkelijk *kan* optreden, maar daarom nog geen hoofdproduct *moet* zijn. Ook zijn de hoeveelheden azijnzuur en barnsteenzuur te groot om melkzuur zonder meer als hoofdproduct aan te wijzen.

Verder vindt VIRTANEN, dat *Bact. coli* in staat is methylglyoxaal onder zuurvorming te ontleden en dat ook melkzuur zich onder de gevormde zuren bevindt, doch dat het methylglyoxaal zeer zeker niet quantitatief wordt omgezet tot melkzuur, zooals NEUBERG (11) beweert te hebben gevonden.

Ook HARDEN (13) en GREY (14) hebben zich veelvuldig met de bacteriëele gisting t. g. v. *Bact. coli* bezig gehouden en belangrijk werk geleverd, doch hoewel barnsteenzuur door hen werd gevonden, hielden geen van beide rekening met dit zuur bij de opstelling van hun gistings-schema.

Beter geslaagd in het uitbreiden van NEUBERG's alcoholische gistingstheorie over de bacteriëele ontledingen is zeker wel DE GRAAFF (15) (16), die er in geslaagd is voor het ontstaan van alle gevormde producten een plausibele verklaring te vinden.

Zonder van hun concreetheid te verliezen, laten de voorstellingen van DE GRAAFF toch voldoende ruimte voor individueele interpretatie der reactie's over.

Tal van andere schemata zijn verder opgesteld, die alle om het zelfde kernpunt heen draaien en die alle in mindere of meerdere mate als gunstige werkhypothese zijn te gebruiken.

Deze te behandelen zoude ons veel te ver voeren; wij noemen nog slechts het ingewikkelde schema aangegeven door SCHOEN (17), waarin het aceetaldehyde als spil beschouwd wordt.

Tegenover deze min of meer „practische" theoriën kan men de zienswijze plaatsen van KLUYVER en DONKER (18), die van zuiver theoretischen aard is.

Uitgaande van de theorie, die WIELAND heeft opgesteld betreffende de biochemische oxydatie-processen, nemen KLUYVER en DONKER aan, dat het bacterie-protoplasma een bepaalde affiniteit bezit t. o. v. H_2, afhankelijk van de bacteriesoort. Al naar gelang van de grootte van deze affiniteit kunnen bepaalde waterstofatomen in de substraat-moleculen min of meer geactiveerd worden, waardoor een min of meer onverzadigde rest achterblijft.

Deze rest kan dit onverzadigd zijn compenseeren, hetzij door een inwendige verschuiving van valentie's (eventueel neven- en restvalentie's), hetzij door met een ander molecule in reactie te treden.

We krijgen zoo een reeks dehydratie- en condensatie-reactie's in groote variatie.

De geactiveerde waterstof, op zijn beurt kan nu òf verschoven worden naar een andere plaats van het molecule, òf een acceptor vinden in den vorm van een ander molecule uit het substraat, òf géén acceptor vinden.

Het eerste geval leidt tot intramoleculaire atoomverschuivingen door KLUYVER betiteld als: „Umlagerungsreactionen".

In het tweede geval krijgen we dehydratie-reactie's en hydratie-reactie's.

Bij de derde mogelijkheid zien we de waterstof in moleculairen toestand ontwijken. — Bij al deze reactie's speelt het protoplasma de rol van katalytischen waterstofoverdrager, onder vorming van het labiele proto-plasma-waterstof.

Deze theorie aan de practijk te toetsen behoort voorloopig tot de onmogelijkheden.

Dit neemt niet weg, dat de conclusie's, waar deze hypothese toe leidt, met de practische ervaring in overeenstemming kunnen zijn.

Het is nu niet onze bedoeling, al deze theoriën te toetsen aan de omzetting, welke de niet-gasvormers onder de *coli-typhus*-typen de koolhydraten doen ondergaan.

Het is ons veel meer te doen, om de concrete feiten naar voren te brengen.

Mochten aan de hand van deze feiten aanknoopingspunten voor theoretische beschouwing worden gevonden, dan moet men toch nog zeer voorzichtig zijn in het trekken van zijn conclusie's.

Immers, het is gemakkelijk een theorie — en vooral een gistingstheorie — op te stellen, maar of men daarmede tevens een juiste en vruchtbare theorie heeft geschapen, blijft nog een vraag.

LITTERATUUR.

1. DUCAMP, Thèse de Lille 1907.
2. POTTEVIN, Ann. de l'Inst. Pasteur *19*, 426 (1905).
3. W. C. DE GRAAFF, Tijdschr. voor vergl. Geneesk. 1917, 1918, 1919.
4. G. WAGNER, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. *90*, 37 (1920).
5. Y. SERA, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. *66*, 162 (1910).
6. A. HARDEN, Proc. Chem. Soc. XVII, blz. 57.
7. Y. SERA, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. *66*, 141 (1910).
8. WINTER, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. *70*, 273 (1912).
9. C. NEUBERG, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, blz. 442 e. v. (1924).
10. FUCHS, Die Gegenwärtige Stand des Gärungsproblems. Monographie 1922, (verlag: FERDINAND ENKE, Stuttgart).
11. C. NEUBERG en G. GORR, Bioch. Zeitschr *162*, 490 (1925).
12. A. I. VIRTANEN, Zeitschr. f. Physiol. Chem. *143*, 71 (1925). idem *155*, 251 (1926). idem *151*, 232 (1926).
13. A. HARDEN, Journ. Chem. Soc. *79*, 610 (1901).
14. E. C. GREY, Proc. Roy. Soc. *87B*, 1072 (1914); *90B*, 105 (1917).
15. W. C. DE GRAAFF, De Gemengd-zure gisting, Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microb. Ser. *1*, 43 (1926).
16. W. C. DE GRAAFF—A. J. LE FÈVRE, Bioch. Zeitschr. *155*, 313 (1925).
17. M. SCHOEN, Le Problème des Fermatations. Monographie, 1926 (MASSON et Cie, Paris).
18. A. J. KLUYVER—H. J. L. DONKER, Die Einheit in der Biochemie, Zeitschr. d. Zelle u. Gew. XIII, Heft 1, blz. 134 (1926). Zie ook: Versl. Kon. Ac. v. Wetensch. *33*, 415 (1924).

HOOFDSTUK II.

DE MICRO-ORGANISMEN.

§ 1. *Bacteriënmateriaal* (1) (2).

Aangezien het de bedoeling was, de gemengd-zure gisting der *coli-typhus*-groep nader te bestudeeren, werden vele organismen uit deze groep gebruikt en wel in hoofdzaak de *dysenterie*-bacteriën.

Het is bekend, dat men de groote groep der *coli-typhus*-achtige organismen in drie andere groepen verdeelen kan. Als maatstaf voor deze verdeeling gebruikt men de verschillende wijzen, waarop zij glucose en lactose aantasten. Men krijgt dan de volgende indeeling:

Ondergroep I: Colioïdeeën
vergisten zoowel glucose als lactose onder *zuur*- en *gas*-vorming.
Voorbeelden: *Bact. coli, Bact. aërogenes, Bact. pneumoniae.*

Ondergroep II: Paratyphioïdeeën
vergisten glucose onder *zuur*- en *gas*vorming, laten lactose onaangetast.
Voorbeelden: *Bact. paratyphi A, Bact. paratyphi B.*

Ondergroep III: Typhioïdeeën
vergisten glucose alleen onder *zuur*vorming, laten lactose onaangetast.
Voorbeelden: *Bact. typhi, Bact. dysenteriae* SHIGA KRUSE, *Bact. dysenteriae* FLEXNER, enz.

Wij zullen later zien, dat men bij een dieper-gaande bestudeering der biochemische eigenschappen dezer organismen dezelfde rangschikking terugvindt, welke ook eenigszins parallel loopt met de mate van pathogeniteit.

In hoofdzaak hebben wij het onderzoek beperkt tot de derde ondergroep, omdat het niet-ontstaan van gasvormige producten uit glucose in hooge mate onze aandacht waard is.

Wij wenschen dan ook met een nadere beschouwing der organismen met deze ondergroep aan te vangen.

Alle verkregen stammen werden, vòòr dat zij in gebruik werden genomen, aan een zuivering onderworpen, door plaatpassage.

Dysenterie-bacteriën:

Gewerkt werd met drie verschillende soorten: *Bact. dysenteriae* SHIGA KRUSE, *Bact. dysenteriae* HISS (Y) en *Bact. dysenteriae* FLEXNER, *Bact. dysenteriae* STRONG stond niet ter beschikking.

Alle stammen zijn welwillend afgestaan door het „Centraal Laboratorium voor Volksgezondheid". Hoewel aan de zuiverheid der culturen niet behoefde te worden getwijfeld, werden zij toch stelselmatig aan het bovengenoemde zuiveringsproces onderworpen.

a. Bact. dysenteriae SHIGA KRUSE.

Aantal aanwezige stammen: 3.

Morphologisch: Kort, asporogeen staafje, iets plomper dan *Bact. typhi*, aan de einden afgerond, af en toe neiging tot polymorphie, involutievormen vaker aanwezig; geen eigen beweging, geen ciliën, sterke Brown's beweging; neemt gemakkelijk kleurstoffen op, doch is gram-negatief; met verdunde fuchsine of methyleenblauw gekleurd, vertoont het organisme soms donkere, polaire korreltjes.

De kolonies op gelatine hebben dezelfde wijnblad-structuur als die van *Bact. typhi*, echter een weinig grover. Op agar zijn de kolonies rond, semi-transparant, vrij klein, glanzend en vochtig. De culturen bezitten een zeer eigenaardigen reuk.

Physiologisch: Bouillon vertoont na 24 uur een moiréachtige troebeling zonder oppervlakte-huidje. Gelatine ver-

vloeit niet. Uit pepton wordt geen indol gevormd. De kolonies zijn op CONRADI-v. DRIGALSKI-agar: blauw; op ENDO-agar: kleurloos of zwak rose, indien het substraat oorspronkelijk rose was. Glucose wordt ontleed zonder gasvorming, echter lactose, manniet, maltose worden niet aangetast. Neutraal rood blijft schijnbaar onveranderd. IJzertartraat-agar wordt niet verkleurd; nitroprussidnatrium-agar wordt blauw-groen; basisch loodacetaat-agar vertoont geen kleurverandering.

Serologisch: Door een specifiek agglutineerend serum met een titer van 1 : 8000, ontstond nog een duidelijke agglutinatie bij een verdunning van 1 : 5000.

b. Bact. dysenteriae FLEXNER.

Aantal aanwezige stammen: 4.

Morphologisch: De gelijkenis met het organisme van SHIGA KRUSE is haast volkomen; de kolonies op gelatine zijn echter dikwijls iets ronder.

Physiologisch: Indol wordt uit pepton gevormd hoewel vaak in geringe hoeveelheden. Glucose, zoowel als manniet en maltose worden ontleed, saccharose zeer zwak. Ten opzichte van bouillon, gelatine, CONRADI-v. DRIGALSKI-agar, ENDO-agar verhoudt zich het organisme als *Bact. dys.* SHIGA KRUSE. Echter is de groei over het algemeen veel krachtiger en sneller. Ook t. o. v. de ijzer-, lood- en nitroprussidnatrium-voedingsbodems is de verhouding analoog.

Serologisch: Het specifiek serum met een titer van 1 : 6000 werkte agglutineerend. Echter werd een groep-agglutinatie waargenomen, waardoor *Bact. dys.* HISS tot een verdunning van 1 : 5000 ook mede agglutineert. Dit is geheel in overeenstemming met de algemeene ervaring. Het is dan ook zeer wel mogelijk, dat men hier met twee variatie's van eenzelfde organisme heeft te maken.

c. Bact. dysenteriae HISS (Y).

Aantal aanwezige stammen: 4.

Morphologisch is er in het geheel geen verschil te bespeuren tusschen het HISS-type en het FLEXNER-type.

Physiologisch is het verschil ook zeer gering. De Indol-

vorming uit pepton is onregelmatig. De kolonies op CONRADI-v. DRIGALSKI-agar zijn meer naar den violetten kant. Glucose en manniet worden vergist, maltose en saccharose niet.

Serologisch: Een specifiek serum met een titer van 1 : 6000 bracht agglutinatie teweeg (verdunning 1 : 5000). Ook hier geldt hetzelfde als bij Bact. dys. FLEXNER is gezegd.

In het kort kunnen wij de voornaamste eigenschappen in de volgende tabel vereenigen.

TABEL I.

	SHIGA KRUZE.	FLEXNER.	HISS (Y).
beweeglijkheid	O	O	O
indol	O	+	+ soms —
melk	geen coagulatie	geen coagulatie	geen coagulatie
lactose	O	O	O
glucose	zuur	zuur	zuur
maltose	O	zuur	O
manniet	O	zuur	zuur
neutraal rood	O	soms fluoresc.	O
ijzer-voedingsb.	O	O	O
nitroprussidn.-voedingsb.	blauw-groen	blauw-groen	blauw-groen
lood-voedingsb.	O	O	O
agg. serum Shiga (verd. 1 : 5000).	+	O	O
agg. serum Flexner (verd. 1 : 5000).	O	+	+
agg. serum Hiss (verd. 1 : 5000).	O	+	+

Naast de agglutinatiereactie's kunnen dus manniet, maltose en glucose ter identificatie worden gebruikt.

Later zullen wij zien, dat *Bact. typhi* tot op zekere hoogte een overgang vormt tusschen de *dysenterie*-bacteriën eenerzijds en de *paratyphioïdeeën* (en *colioïdeeën*) anderzijds.

Tevens hebben wij in het *Bact. typhi* een organisme met eigen beweging te zien.

Daarom zullen wij de eigenschappen van dit organisme te zamen behandelen met die van de andere bacteriën.

Bact. typhi.

Aantal aanwezige stammen: 4.

Morphologisch: Kort, asporogeen staafje, met afgeronde uit-

einden en involutievormen vertoonend. Het organisme heeft 9—20 peritriche ciliën en daardoor een levendige eigenbeweging. Het neemt gemakkelijk kleurstoffen op, doch is gram-negatief. De kolonies vertoonen op gelatine de typische wijnblad-structuur, zijn vaak iriseerend en teer. Op agar zijn de kolonies meer rond, grauw-wit, glanzend en vochtig.

Physiologisch: Bouillon vertoont na 24 uur een moiréachtige troebeling, na enkele dagen een wit-achtig sediment; een oppervlaktehuidje wordt niet gevormd; glucose wordt ontleed onder zuurvorming, echter lactose niet; de kolonies op CONRADI-v. DRIGALSKI-agar zijn blauw, op ENDO-agar kleurloos; groeit goed op malachietgroen-agar en natriumtetrathionaat-agar. IJzertartraat-agar wordt in 2 dagen zwart, nitroprussidnatrium-agar wordt licht-blauw, basisch loodacetaat-agar neemt in 24 uur een zwarte tint aan.

Serologisch: Het specifieke agglutinatie serum (titer = 1:6000) agglutineerde sterk in een verdunning van 1:5000.

Bact. paratyphi A (3).

Aantal aanwezige stammen: 3.

Morphologisch: Het verschil met *Bact. typhi* is gering. De beweeglijkheid is groot; de kolonies op agar zijn veelal rondachtig, grijsachtig, gaafrandig, iriseerend.

Het percentage ronde kolonies op gelatine is grooter; de culturen hebben een loogachtigen reuk.

Physiologisch: Indol wordt uit pepton niet gevormd; bouillon is na 24 troebel, soms vormt zich later een huidje. Glucose wordt ontleed onder vorming van zuur en gas, hoewel de gasvorming niet zoo rijkelijk is als bij *Bact. paratyphi B*[1]). Ook manniet wordt vergist, echter niet saccharose en lactose. Neutraal rood wordt gereduceerd. De kolonies op CONRADI-v. DRIGALSKI-agar zijn blauw, op ENDO-agar kleurloos. Melk coaguleert niet; lakmoes-melkwei wordt in 2 × 24 uur purper zonder later alkalisch te worden. IJzertartraat-agar, noch nitroprussidnatrium- en basisch loodacetaat-agar worden binnen enkele dagen veranderd.

---

[1]) Zie b.v. Hoofdstuk I (4).

Serologisch: Wij verkregen agglutinatie met een specifiek serum met een titer van 1 : 8000 in de verdunning 1 : 8000.

Bact. paratyphi B.

Aantal aanwezige stammen: 2.

Morphologisch is er geen verschil te constateeren tusschen het *A*-type en het *B*-type.

Physiologisch is het verschil ook gering: melk wordt sterk alkalisch; lakmoes-melkwei vertoont na 3—7 dagen een alkalische reactie. IJzertartraat-agar wordt zwart, evenzoo het loodhoudend substraat, terwijl nitroprussidnatrium-agar groen wordt.

Serologisch: Met de agglutinatie-reactie (titer van het serum is 1 : 8000) zijn het *A*-type en het *B*-type scherper van elkaar te onderscheiden dan het FLEXNER-type en het HISS-type bij de *dysenterie*-bacteriën. Men krijgt hier bij de verdunning 1 : 8000 een duidelijke agglulinatie, terwijl de groepagglutinatie veel minder storend werkt.

Bact. coli.

Aantal aanwezige stammen: 3.

Dit organisme is zoo algemeen bekend, dat een nadere beschrijving schier overbodig schijnt. Alleen zij op enkele verschillen met de *paratyphioïdeeën* gewezen.

Morphologisch: De beweeglijkheid is minder heftig. De kolonies zijn op agar ronder en vertoonen op gelatine meer een gelobde rand.

Physiologisch: Indolvorming uit pepton heeft plaats. Glucose, zoowel als lactose worden vergist onder zuur èn gasvorming, evenzeer manniet. De kolonies op CONRADI-V. DRIGALSKI-agar zijn rood, evenzoo op ENDO-agar. Melk coaguleert. IJzerhoudende substraten worden eerst later zwart, nitroprussidnatrium-agar wordt blauw-groen en basisch loodacetaat-agar blijft onveranderd.

Serologisch: De agglutinatie-proef geschiedde met een serum met een titer van 1 : 6000 en een verdunning van 1 : 5000.

Het bleek, dat onder de gebruikte stammen één was, die een positieve reactie van VOSGES-PROSKAUER (4) gaf en waarbij

tevens duidelijk acetyl-methyl-carbinol kon worden aangetoond (gevormd uit glucosehoudende substraat). De reactie van VOSGES-PROSKAUER wordt toegeschreven aan het diacetyl (CH_3—CO—CO—CH_3), dat onder invloed van kaliloog in het algemeen met de groep $HN = C(NH_2)—N\langle^{R}_{H}$ (b.v. arginine, creatine, welke stoffen steeds in pepton voorkomen) een eosineachtig gekleurd lichaam vormt.

Het diacetyl wordt ontstaan gedacht uit het acetyl-methyl-carbinol (CH_3—CHOH—CO—CH_3), dat tijdens de gisting zich uit het koolhydraat vormt.

De methylrood-proef viel bij deze stam negatief uit.

Hieruit zou men dus afleiden, dat, behalve deze ééne stam, de andere gebruikte stammen — die allen het omgekeerde resultaat gaven — van faecalen oorsprong waren. Immers is dit verschil t. o. v. van de methylrood-proef en de proef volgens VOSGES-PROSKAUER als onderscheid aangenomen tusschen faecale- en non-faecale *coli* (5) (6).

De voornaamste eigenschappen kunnen wij in volgende tabel samenvoegen:

TABEL 2.

	Typhi.	Para A.	Para B.	Coli.
beweeglijkheid.....	++	++	++	+
indol	O	O	±	+
melk.....	O	O	later clarif.	coaguleert
glucose.....	zuur	z + minder gas	z + g.	z + g.
endo-agar	kleurloos	kleurloos	kleurloos	rood
conradi-agar	blauw	blauw	blauw	rood
neutraal rood.....	O	ontkl. fl.	ontkl. fl.	ontkl. fl.
ijzer-voedingsb.....	zwart	O	zwart	O
nitroprussidn.-voedingsb.	licht-blauw	O	groen	blauw-groen
lood-voedingsb.....	zwart	O	zwart	O
agg. serum typhus..... (verd. 1 : 5000).	+	O	O	O
agg. serum parat. A ..... (verd. 1 : 8000).	O	+	O	O
agg. serum parat. B ..... (verd. 1 : 8000).	O	O	+	O
agg. serum coli..... (verd. 1 : 5000).	O	O	O	+

Nadat nauwkeurig was nagegaan, of het te gebruiken bacteriën-materiaal geheel zuiver was, werden de proeven ingezet, terwijl bovendien geregeld proeven werden genomen om de zuiverheid te controleeren.

Steeds werd gewerkt met schuine agar-culturen, die 2 × 24 uur in een broedstoof van 35° c bebroed waren.

Voor de qualitatieve proeven werd op iedere 100 cm^3 substraat de bacterie-massa van één schuine agarcultuur — gesuspendeerd in steriel water — toegevoegd.

Bij de quantitatieve proeven werden steeds 5 schuine agarbuizen ieder met $2\frac{1}{2}$ cm^3 steriel water bedeeld, de bacteriën hierin gesuspendeerd en van deze verzamelde en onder steriele voorzorgen door papier gefiltreerde suspensies 10 cm^3 afgepipetteerd en bij het substraat gebracht.

Deze hoeveelheid toegevoegde entvloeistof werd later bij de bepalingen in rekening gebracht.

Men krijgt zoodoende een zeer groot aantal bacteriën in de voedingsbodem en versnelt daardoor de gewenschte vergisting.

LITTERATUUR.

1. K. B. Lehmann—R. O. Neumann, Bakteriologische Diagnostiek II, 1927.
2. Dopter—Sacquépée, Précis de Bacteriologie, 1914.
3. W. C. de Graaff, Tijdschr. Verg. Geneesk. III, 112 (1917).
4. Levine Journ. of Bacteriology, *1*, 153 (1916).
5. Standard Methods of Water-analysis 1920. Boston Amer. Public. haelth-association.
6. W. C. de Graaff, Tijdschr. Vergl. Geneesk. VII, 121 e.v. (1922).

HOOFDSTUK III.

QUALITATIEF ONDERZOEK NAAR DE VERGISTINGSPRODUCTEN VAN GLUCOSE DOOR NIET-GASVORMENDE VERTEGENWOORDIGERS VAN DE COLI-TYPHUS GROEP.

§ 1. *Indeeling der producten en reacties.*

Aangezien we hier te maken hebben met organismen, welke de gemengd-zure gisting teweeg brengen, moet bij het qualitatief onderzoek de aandacht allereerst vallen op de zuren, die kunnen ontstaan en die als de hoofdproducten moeten worden beschouwd.

Echter mag men de bijproducten en eventueel aanwezige, nog niet geheel omgezette tusschenproducten, niet over het hoofd zien.

Het geheele complex van eindproducten kunnen wij nu in de volgende groepen verdeelen:

A. *vluchtige neutrale lichamen*:
aceetaldehyde, aethylalcohol, acetyl-methyl-carbinol.

B. *vluchtige zuren*:
mierenzuur, azijnzuur.

C. *niet-vluchtige zuren*:
barnsteenzuur, melkzuur.

D. *niet-vluchtige neutrale lichamen*:
glycerine.

Op deze stoffen werden de volgende qualitatieve reacties uitgevoerd:

A. *vluchtige neutrale lichamen*:

1. op *aceetaldehyde* werd gereageerd:

a. met de reactie van RIMINI (1).

± 3 cm^3 van de te onderzoeken vloeistof worden met 0.5 cm^3 4 % nitroprussidnatrium vermengd en aan het mengsel 1 cm^3 van een 3 % piperidine (of ander secundair amine) oplossing toegevoegd; een blauwe tot paarsch-blauwe verkleuring wijst op aceetaldehyde.

b. met *p. nitrophenylhydrazine*.

Het lichtgele hydrazon smelt bij 128° c en is microscopisch duidelijk herkenbaar aan den kristalvorm (naalden).

2. op *alcohol*:

Indien aceetaldehyde aanwezig is, wordt dit eerst verwijderd door de vloeistof aan een terugvloeikoeler een half uur zacht te koken met een overmaat van een oplossing van p. nitrophenylhydrazine in 30 % azijnzuur. Hierna wordt een deel afgedestilleerd en in dit destillaat op alcohol gereageerd,

a. met de *jodoformreactie* (foto 1).

b. met de *aethylbenzoaat-reactie*, door toevoeging van benzoylchloride [1]).

c. met de reactie van BLANKSMA (2).

Bij 2 cm^3 geconcentreerde oplossing voegt men 33 mg metallisch natrium en 274 mg 1.2.4. chloordinitrobenzol. Na een oogenblik verwarmen ontstaan op den bodem kristallen van NaCl en in de vloeistof kristalliseeren de naaldjes van 2.4 dinitrophenetol bij afkoeling uit. Uit ligroïne omgekristalliseerd geven deze een smeltpunt van 85.2° C.

3. op *acetyl-methyl-carbinol*:

a. met FEHLINGS-reagens, hetwelk reeds in de koude wordt gereduceerd.

b. met de reactie van LEMOIGNE (3).

Deze reactie, die door VISSER 'T HOOFT (4) werd toegepast om snelazijn te onderscheiden van rozijn-azijn, berust hierop, dat het carbinol door $FeCl_3$ wordt geoxydeerd tot diacetyl; dit wordt overgedestilleerd en opgevangen in een

---

[1]) Deze reactie kan desnoods ook vóór de verwijdering van het aceetaldehyde geschieden.

kolfje voorzien van een ammoniakaal mengsel van nikkelchloride en hydroxylamine. Bij aanwezigheid van het carbinol ontstaat dan een rood neerslag van het nikkeldimethylglyoxim. De hoeveelheden der te gebruiken reagentia zijn als volgt: bij ± 50 cm^3 van de te onderzoeken cultuurvloeistof voegt men 10 cm^3 20 % $FeCl_3$ oplossing en men vangt op in een reageerbuis, waarin 5 druppels 10 % $NiCl_2$, 5 druppels 20 % $NH_2OH.HCl$ en 15 druppels 20 % ammoniak.

B. *vluchtige zuren.*

1. op *mierenzuur*:

a. met de reactie van SÉRULLAS (5).

10 cm^3 van het zure destillaat [1]) wordt geschud met een overmaat HgO afgefiltreerd en het filtraat verwarmd. Is mierenzuur voldoende aanwezig, dan ontstaat een wit neerslag, dat allengs grijs tot donkergrauw wordt.

b. door de reductie van $HgCl_2$.

Men voegt een overmaat van een koud verzadigde $HgCl_2$-oplossing bij de te onderzoeken vloeistof. Bij verwarming ontstaat een neerslag van HgCl, dat met NH_4OH zwart wordt.

Door toevoeging van natriumchloride wordt de gevoeligheid verhoogd tot 1 : 100 000.

c. door reductie van $KMnO_4$.

d. microchemisch met *ceriumnitraat* (6) (foto 2).

Het ceriumformiaat ontstaat veelal aan den rand van den druppel in den vorm van pentagondodekaëders (50—70 μ), vaak vervormd tot ronde schijfjes. Deze vrij zeldzame kristalvorm vertoont bij dit zout tevens een mooi polarisatiekruis, niettegenstaande hij tot het regulaire systeem behoort (foto 3).

2. op *azijnzuur*:

a. met de KAKODYL-reactie.

De drooggedampte Na-zouten worden verhit met watervrij Na_2CO_3 en met As_2O_3; de reuk van kakodyl is aanstonds merkbaar.

b. door de vorming van *amyl-* (aethyl) *acetaat* met amyl-(aethyl) alcohol en een weinig zwavelzuur.

---

[1]) Zie experimenteel gedeelte.

Fig. I
Reichert obj. 5; oc. II
150 ×

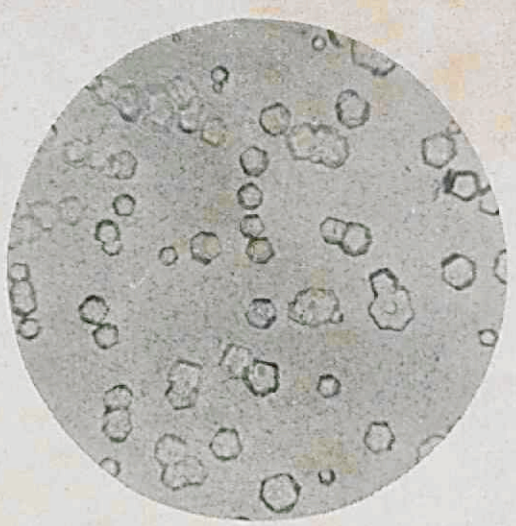


Fig. II
Reichert obj. 5; oc. II
150 ×

Fig. III
Winkel obj. 4 c; oc. 4

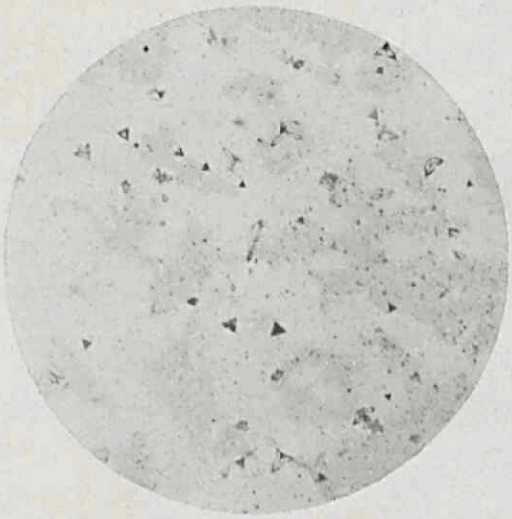


Fig. IV
Reichert obj. 3; oc. IV
95 ×

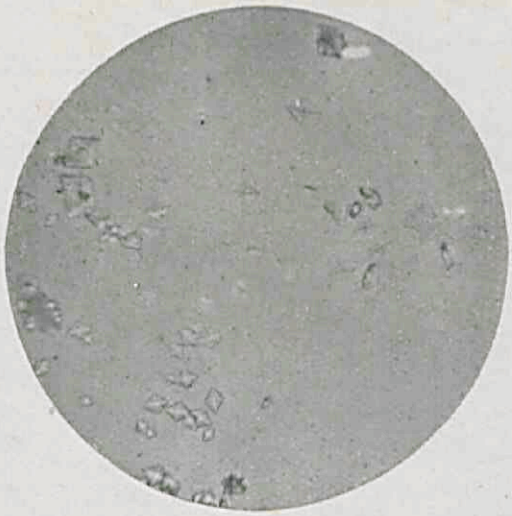


Fig. V
Reichert obj. 5; oc. II
150 ×

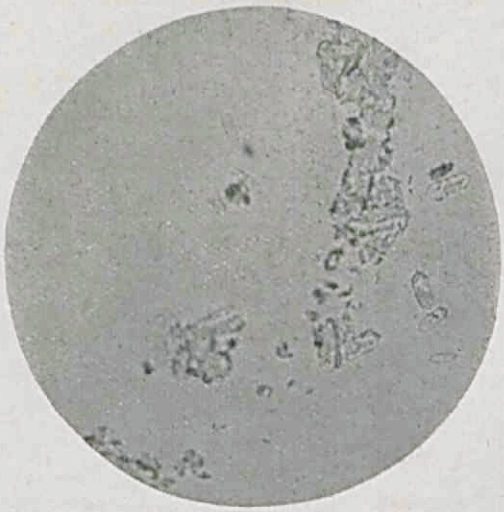


Fig. VI
Reichert obj. 3; oc. IV
95 ×

Het is hierbij gewenscht blanco-proeven met alleen den alcohol er naast uit te voeren om zoodoende den reuk te kunnen vergelijken.

c. microchemisch, met *natriumuranylformiaat.* Men krijgt uitermate scherp gevormde tetraëders van natriumuranylacetaat (foto 4).

Volgens BEHRENS (7) gebruikt men als reagens het Na-uranylpropionaat, doch SCHOORL [1]) heeft aangetoond, dat het formiaat tot veel sneller uitkristalliseeren van het acetaat leidt. Ook bleek, dat de reactie met het formiaat veel minder gestoord werd door eventueel aanwezig vrij azijnzuur en ook niet door NaCl.

C. *niet vluchtige zuren.*

1. op *barnsteenzuur*:

a. door de vorming van *bariumsuccinaat* (zie verder experimenteel gedeelte).

b. microchemisch met *loodacetaat* (8). Het ontstaan van scherp begrensde ruiten (90—120 μ, met scherpe hoeken van 70°—75°) van loodsuccinaat, wijst op barnsteenzuur (foto 5).

2. *op melkzuur*:

a. door *oxydatie* tot *pyrodruivenzuur.* Het melkzuur laat zich door een alkalische permanganaat-oplossing oxydeeren tot pyrodruivenzuur. Dit geeft in flink alkalisch milieu met nitroprussidnatrium (men voege een paar korreltjes toe) een roode verkleuring, welke verkleuring bij voorzichtig neutraliseeren omstreeks het neutrale punt in een blauwkleuring overgaat, om bij verder aanzuren geheel te verdwijnen.

b. microchemisch met *cobaltacetaat* (9). Er ontstaan bundels van rose, breede, zwaardvormige naalden (1—200 μ lang); beoordeeling na 24 uur (foto 6).

D. niet-vluchtige neutrale stoffen.

Aangezien voor deze groep eigenlijk alleen veelwaardige alcoholen (glycerine, d. manniet, d. sorbiet) in aanmerking

---

[1]) Particuliere mededeeling.

komen, werd eerst op deze stoffen gezamenlijk gereageerd door na te gaan of het residu [1]) koperoplossende eigenschappen had. Dit werd gedaan met de proef van TROMMER (10).

Daarnaast werd op glycerine gereageerd met:

a. de kleur-reactie van KOLTHOFF (11).

Een kwart van het residu wordt opgelost in 5 cm^3 water, met kool opgekookt en ontkleurd en gefiltreerd. Men voegt bij het afgekoelde filtraat 1.5—2 cm^3 4 N phosphorzuur en 2 cm^3 % $KMnO_4$ toe en laat 10 min. staan. Dan voegt men 1 cm^3 10% oxaalzuur toe en schudt. Na 1 à 2 minuten staan, is de vloeistof helder bruin en nu voegt men 1 cm^3 verdund H_2SO_4 en 5 cm^3 SCHIFF's reagens [2]) toe; na 10 min. beoordeeld men de kleur; deze is bij aanwezigheid van glycerine roodviolet.

b. de acroleïne-reactie, zooals MULLIKEN (12) deze beschrijft:

Een gedeelte van het residu wordt met 0.5 g poedervormig $KHSO_4$ tot een vaste brei vermengd. Dit mengsel wordt in een droge reageerbuis verhit en de dampen door middel van een omgebogen buisje in 4 cm^3 gedestilleerd water opgevangen. Dit water bevindt zich in een tweede reageerbuisje, dat van buiten met koud water wordt gekoeld. Na het verdrijven van de lucht worden de acroleïne-dampen in het water teruggehouden en men reageert op dit lichaam:

1. door het waarnemen van de eigenaardige reuk;
2. met de kleurreactie met ontkleurde fuchsine; 2 cm^3 van de oplossing worden met 5 cm^3 van dit reagens vermengd. Den volgenden dag opalesceert dit mengsel in een diep violet-blauwe tint. Men voegt nu een gelijk volume HCl (d = 1.2) toe. Binnen een halve minuut wordt de kleur vuil groen-bruin. Bij verdunning van circa 2 cm^3 van dat verkregen mengsel met 30 cm^3 water, verandert de kleur via geel-groen naar blauw.

Voor de andere, meest alkalische lichamen, gevormd uit het pepton, werden de volgende reactie's gebruikt.

---

[1]) Zie § 2.

[2]) d. i. met SO_2 ontkleurde fuchsine (concentratie 1 : 4000).

1. voor *ammoniak en aminen*:
de reactie met NESSLER's *reagens*.
2. voor *indol*:
de reactie van EHRLICH (13).

Hiervoor worden 10 cm^3 vloeistof vermengd met 5 cm^3 sterk HCl (d = 1.2) en op dit mengsel schenkt men voorzichtig 2 cc. van een oplossing van p. dimethylaminobenzaldehyde.

Aanwezigheid van indol verraadt zich door het optreden van een rood-violette zône.

Aangezien deze lichamen niet worden beschouwd als vormingsproducten der eigenlijke koolhydraat-vergisting, is aan hen ook geen verdere aandacht besteed.

Enkele der genoemde reactie's verdienen nog een kleine opmerking.

De reactie van RIMINI is — als menige kleurreactie — weinig specifiek. Ook wat de kleur betreft, krijgt men lang niet altijd dezelfde nuanceering. De waarde van deze reactie is daarom veel geringer, dan men op het eerste gezicht zou meenen.

Gelukkig blijft de keuze tusschen de mogelijk ontstane aldehyden beperkt tot aceetaldehyde en met groote mate van onwaarschijnlijkheid formaldehyde en methylglyoxaal (als tusschenproduct). Formaldehyde nu, geeft in het geheel geen verkleuring en methylglyoxaal roept een intensief roode kleur te voorschijn.

Deze omstandigheden maken, dat men de reactie van RIMINI in dit geval zeker als een voorproef mag bezigen. Gesteund door de hydrazonvorming komt men tot zekerheid.

Ook bij de reactie's op alcohol — zooals bij alle andere reactie's — is er naar gestreeft een tamelijk algemeene, maar vaak gevoelige reactie te combineeren met een specifieke, maar soms minder gevoelige reactie.

Voor de reactie van BLANKSMA heeft men grootere hoeveelheden alcohol noodig om de gewenschte, geconcentreerde oplossing te verkrijgen. Vandaar, dat bij de geringe sporen aanwezigen alcohol, deze reactie veelal negatief uitviel, terwijl de jodoform-reactie nog positief was.

Van de reacties op mierenzuur is de microchemische wel de meest specifieke en tevens de gevoeligste, mits er geen storende invloeden in het milieu aanwezig zijn. Inderdaad zijn deze vaak onnaspeurbare invloeden zeer vaak aanwezig. Gevolg hiervan is, dat het zeer zelden voorkomt, dat men mooi gevormde pentagoondodekaëders krijgt. In verreweg de meeste gevallen ontstaan òf grove combinatie-lichamen, òf meer of minder dikke, ronde plaatjes òf soms in het geheel niets. Vallen in dit laatste geval de andere reacties op mierenzuur alle positief uit, dan mag men per analogie met de parallel loopende onderzoekingen gevoegelijk aannemen, dat mierenzuur toch aanwezig is.

Ook de microchemische reactie op melkzuur met cobaltacetaat is aan moeilijkheden onderhevig.

Echter heeft men hier meer met een vertraging der kristallisatiesnelheid te maken, zoodat veelal na 24 uur de gewenschte kristallen aanwezig zijn.

Zooals uit § 3 blijken zal, viel de proef t. o. v. het oplossend vermogen van koper steeds negatief uit.

Niettegenstaande dit resultaat werden toch steeds de qualitatieve proeven op glycerine uitgevoerd om volkomen zekerheid te hebben of dit lichaam al of niet aanwezig was.

Aan de aanwezigheid van d. manniet resp. d. sorbiet is verder geen aandacht besteed. Immers staan deze beide lichamen — mochten zij ook al ontstaan — niet zoo direct in het gistingsproces. De eenige verklaring voor haar ontstaan kan men vinden, als men aanneemt, dat het hexosemolecule zèlf als waterstof-acceptor gaat optreden en zoodoende gereduceerd wordt.

Bij de vergisting van d. glucose heeft men dan veel meer kans d. sorbiet te vinden dan d. manniet. Immers ontstaat door de chemische reductie van d. glucose ook d. sorbiet, terwijl het d. manniet veel meer bij reductie van d. fructose ontstaat.

Hierbij komt, dat de *dysenterie*-bacteriën wel d. manniet aantasten, doch d. sorbiet ongemoeid laten.

Doch, zooals gezegd, is aan deze stoffen geen verdere aandacht besteed te meer, daar al de proeven t. o. v. het koperoplossend vermogen negatief uitvielen.

In het residu echter, zooals wij dat op de in § 2 beschreven wijze hebben verkregen, zit ook nog de onvergiste glucose. Deze stof werd verwijderd als ozason en nadat dit was afgefiltreerd, werd van het filtraat het koperoplossend vermogen bepaald.

Om echter zeker te zijn, dat de overmaat phenylhydrazine geen storenden invloed had, werd de volgende reeks proefjes uitgevoerd.

1. Een druppel glycerine werd in 5 cm^3 water opgelost. Deze oplossing werd alkalisch gemaakt met 2 cm^3 10% NaOH en daarna langzaam 1 cm^3 van een oplossing van kopersulfaat (6.93%) toegevoegd.

De oplossing was helder en donkerblauw.

2. Dezelfde proef werd herhaald met ± 10 à 20 mg glucose.

De oplossing was helder en donkerblauw.

3. Aan 5 cm^3 van het reagens van DÉNIGÈS [1]) werd 2 cm^3 verzadigde NaCl oplossing en 5 cm^3 10% NaOH toegevoegd (reactie moet flink alkalisch zijn). Daarna werd 1 cm^3 kopersulfaatoplossing bijgedruppeld.

Er ontstond een bruin-groen neerslag. — Dit neerslag werd afgefiltreerd.

Het filtraat was helder, volkomen kleurloos.

4. Zelfde proef werd herhaald met 10 à 20 mg zoutzure phenylhydrazine en natriumacetaat.

Geel-groen neerslag, het filtraat was helder, kleurloos.

5. Circa 25 mg glucose werden in 5 cm^3 water opgelost, hieraan 5 cm^3 van het reagens van DÉNIGÈS toegevoegd. Nadat het ozason ontstaan was, werd afgefiltreerd, het helder filtraat weer alkalisch gemaakt en kopersulfaat toegevoegd.

Er ontstond een geel-groenig neerslag. — Dit neerslag werd afgefiltreerd.

Filtraat was helder, kleurloos.

6. Een druppel glycerine werd opgelost in 5 cm^3 water,

---

[1]) De bereiding van dit reagens is als volgt:

Aan een oplossing van 10 g Na-acetaat en 20 cm^3 ijsazijn in 100 cm^3 water voegt men 5 cm^3 phenylhydragine en 5 cm^3 natrium-bisulfietoplossing (35 %) toe. Na omschudden filtreert men af en heeft zoo een vrij bestendig reagens (1.4).

hieraan 5 cm³ van het reagens van DÉNIGÈS toegevoegd, werd alkalisch gemaakt en kopersulfaat toegevoegd.

Het geheel zag donkergroen en troebel. — Neerslag werd afgefiltreerd.

Het filtraat was helder, donkerblauw.

7. Een druppel glycerine en circa 25 mg glucose werd in 5 cm³ water opgelost en proef 5 herhaald.

Het geheel zag donkergroen, troebel. — Neerslag werd afgefiltreerd.

Het filtraat was helder, donkerblauw.

Uit deze 7 proefjes blijkt, dat het phenylhydrazine niet storend werkt en men dus op deze wijze het eventueel aanwezige glucose verwijderen kan.

§ 2. *Experimenteel gedeelte.*

Als substraat voor al de proeven werd gebruikt peptonwater, waaraan het koolhydraat werd toegevoegd.

Voor het maken van het peptonwater werd steeds pepton „Witte" gebruikt.

Het is vrijwel gewoonte, om voor normale doeleinden peptonwater te bereiden van 1%.

Van deze gewoonte zijn wij afgestapt; het peptonwater, waarmede werd gewerkt, bevatte niet meer dan $^1/_3$% pepton.

De redenen hiervoor waren de volgende:

1. Daar pepton nog steeds tot de vrijwel ondefinieerbare stoffen behoort, kan men nooit een inzicht krijgen, of en hoe er omzettingen plaats kunnen grijpen, tengevolge van bacteriewerking, die storend werken op, of nadeelig zijn voor het opstellen van een gistingsschema. Daarom is het wenschelijk zoo min mogelijk onbekende stoffen toe te voegen.

2. Het is een bekend feit, dat bacteriën, die twee of meer bronnen ter voeding tot hunne beschikking hebben, deze bronnen vaak minder volledig aantasten, dan wanneer één dier bronnen in zeer groote overmaat aanwezig is. Het is dus waarschijnlijk, dat, wanneer de bacteriën met minder pepton zich moeten tevreden stellen, zij zich met grooter volledigheid aan de afbraak van het koolhydraat zullen wijden. Het gevolg

is, dat de mogelijkheid tot vorming van hinderlijke producten uit het pepton zal verminderd worden.

Een nadeel is, dat de geheele groeisnelheid vermindert, doch dit nadeel biedt geen bezwaren.

De bereiding van het substraat geschiedde nu aldus: 1.25 g pepton werd opgelost in 500 cc. water en dit 5 minuten op 117°—120° c verwarmd. Hierna werd de oplossing gefiltreerd en werd 5 gram vooraf gesteriliseerd krijt toegevoegd en het geheel $^1/_2$ uur op 112° c gesteriliseerd. Nu werd 10 gram glucose ingebracht en een half uur bij een zwakke overdruk (102° c—103° c) gesteriliseerd om den volgenden dag nog eens in stroomende waterdamp nagesteriliseerd te worden. Nadat, na 2 × 24 uur in een stoof van 37° c te hebben gestaan, de kolf steriel bleek te zijn, werd tot het enten overgegaan. Het bleek, dat de glucose gedurende het verhitten op 102°—103° ten deele aan verharsing onderhevig was. Echter was de verharsingsgraad niet méér, dan wanneer men de oplossing gedurende drie dagen telkens $^1/_2$ uur op 100° verhitte, zooals de gefractioneerde sterilisatie van suikerhoudende substraten voorschrijft. Een en ander volgde uit de kleur van de oplossing en de verandering van de rotatie.

Ook bleek, dat de grootste infectiebron het krijt is; vandaar, dat dit afzonderlijk werd gesteriliseerd. De toe te voegen hoeveelheid werd in een met een wattenpropje afgesloten stopfleschje droog gesteriliseerd gedurende een half uur bij 170° c.

Het enten geschiedde met culturen op schuine agar, die 2 × 24 uur bij 37° c bebroed waren; 5 schuine agarculturen werden in steriel water „gesuspendeerd" en de verkregen suspensies bij het substraat gevoegd. De kweektijd werd gesteld op 14 dagen. Na dien tijd werd met de analyse begonnen.

Daar door het toegevoegde krijt alle zuren in den vorm van hunne calciumzouten aanwezig waren, kon men de cultuurvloeistof dadelijk aan een destillatie onderwerpen om de neutrale vluchtige stoffen af te scheiden.

De volledige inhoud van de cultuurkolf werd in een destilleerkolf met hoog aangezette zijbuis overgebracht en circa 350 cm³ afgedestilleerd, welke onder ijskoeling werden opgevangen. Dit destillaat werd nog 4—6 keer aan een destillatie onder-

worpen, totdat men 40—60 cm^3 voldoende geconcentreerd destillaat verkrijgt.

Vooral met het oog op de zeer geringe hoeveelheden alcohol en aldehyde was deze herhaalde destillatie noodig.

In de zoo verkregen eindvloeistof werd gereageerd op de vluchtige stoffen A.

De in de kolf achtergebleven cultuurvloeistof (circa 150 cm^3) werd met een zeer kleine overmaat zwavelzuur aangezuurd (tot juist blauwkleuring op congopapier), zoo noodig afgefiltreerd van het gevormde gips en aan een stoomdestillatie onderworpen tot een volume van circa 750 cm^3 was overgegaan.

Een klein deel van dit zure destillaat werd gebruikt voor de reactie a. op mierenzuur; de rest werd geneutraliseerd met NaOH en drooggedampt. Met het vaste residu werden de reacties op de vluchtige zuren B uitgevoerd.

De nu overgebleven rest in de kolf der stoomdestillatie werd een weinig ingedampt, zoo noodig afgefiltreerd en gedurende 3 dagen met aether in een wijde perforator geperforeerd.

De aetherische oplossing bevat nu de niet-vluchtige zuren C.

Deze oplossing wordt drooggedampt, het residu opgenomen in alcohol 96%, één tot twee druppels phenolphtaleïne toegevoegd en met een verzadigde bariet-oplossing behandeld tot duidelijke roodkleuring.

Hierbij slaat het bariumsuccinaat neer, mits men er voor zorgt, dat de concentratie van de alcohol boven de 70% blijft. Voor elke 10 cm^3 barietwater moet men dus minstens 50 cm^3 alcohol 96% toevoegen.

Men filtreert het gevormde bariumsuccinaat af, lost het op in HCl, dampt op een waterbad deze oplossing droog en onderwerpt het zoo verkregen residu aan een sublimatie, waarbij prachtige veervormige kristalcomplexen van het barnsteenzuur ontstaan.

Dit sublimeeren gebeurt het beste met een klein, niet al te diep porceleinen kroesje, bedekt met een horlogeglas, dat met den hollen kant naar boven erop wordt gelegd en waarop men met water gedrenkte watten legt; onder het geheel komt een microvlammetje.

Op het sublimaat wordt de reactie b. op barnsteenzuur uitgevoerd.

Het alcoholische filtraat wordt ingedampt op een waterbad, het residu in water opgenomen en, na voorafgaande filtratie, hiervan de rotatie nagegaan en er mede de reacties op melkzuur uitgevoerd.

Ten slotte blijft de rest der perforatie over, waarin zich mogelijk de niet-vluchtige neutrale lichamen D bevinden en eventueel nog onvergiste glucose.

Deze rest wordt voorzichtig geneutraliseerd met $BaCO_3$, afgefiltreerd en droog gedampt. Het residu extraheert men in een Soxlethapparaat met alcohol van 90%.

Het alcoholextract wordt met kool ontkleurd, daarna drooggedampt en — na verwijdering van eventueel aanwezige glucose als ozason — met het residu de acroleïnereactie alsmede de kleurreactie van KOLTHOFF op glycerine gedaan.

§ 3. *Resultaten.*

In hoofdzaak zijn de *dysenterie*-bacteriën aan een onderzoek onderworpen.

De *para-typhus*-stammen (15) en ook de *coli*-bacteriën (16) waren reeds eerder bestudeerd.

Echter leek het ons gewenscht toch vertegenwoordigers van deze organismen, alsmede van de *typhus*, in hetzelfde onderzoek te betrekken, om zoodoende tot een vergelijking van deze verschillende organismen te komen.

Daarbij hebben wij ons bepaald, tot het bestudeeren der niet-gasvormige producten, aangezien de gasvormige producten geproduceerd door de *coli*- en *para-typhus*-organismen reeds algemeen bekend zijn en steeds uit CO_2 en H_2 bestaan. Het feit, dat zoowel *typhus*- als *dysenterie*-bacteriën geen gas produceeren, maakt echter, dat juist een bestudeering van haar biochemische eigenschappen er mogelijk toe kan leiden, aangaande de phase der gasvorming eenig licht te verkrijgen.

Verder zij erop gewezen, dat alle proeven aëroob, daarna anaëroob werden gedaan. Over de opstelling der anaërobe proeven vindt men meer in Hoofdstuk V: „Quantitatief Onderzoek".

In het kort zijn de resultaten in het volgend schema samen te vatten.

TABEL 3.

Ontledingsproducten van glucose.

	Aceet-aldehyde.	Aethyl-alcohol.	Acethyl-methyl-carbinol.	Azijn-zuur.	Mieren-zuur.	Barn-steen-zuur.	Melk-zuur.	Glyce-rine.	Gasv. producten. (CO_2+H_2)
Bact. Coli (3 stammen)	Sp.	Sp.	—[1])	+	+	+	+	—	+
Bact. parat. B (2 stammen)	Sp.	Sp.	—	+	+	+	+	—	+
Bact. parat. A (3 stammen)	Sp.	Sp.	—[1])	+	+	+	+	—	+
Bact. typhi (4 stammen)	Sp.	Sp.	—	+	+	+	+	—	—
Bact. dysenteriae Flexner (4 stammen).	Sp.	Sp.	—	+	+	+	—	—	—
Bact. dysenteriae Hiss (4 stammen) ...	Sp.	Sp.	—	+	+	+	—	—	—
Bact. dys. Shiga Kruse (3 stammen)	Sp.	Sp.	—	+	+	+	—	—	—

[1]) Eén stam gaf een positieve reactie op acetyl-methyl-carbinol.

Uit vorenstaande tabel blijkt duidelijk, dat we hier met de gemengd-zure gisting te maken hebben.

Echter doet zich het eigenaardige verschijnsel voor, dat de melkzuurvorming bij de *dysenterie*-bacteriën plotseling ophoudt, of althans in die mate sterk achteruit is gegaan, dat het in de gegeven omstandigheden buiten de grens van aantoonbaarheid is gekomen.

Nog grootere zekerheid over het al of niet aanwezig zijn van melkzuur krijgt men feitelijk eerst bij de quantitatieve analyse.

Ook treft het plotselinge verdwijnen der gasvormige ontledingsproducten vanaf de *typhus*-organismen.

De *typhus*-bacteriën staan in dat opzicht dus tusschen de *dysenterie*-organismen eenerzijds en de *coli*-, *paratyphus*-groepen anderzijds in.

Met de *dysenterie*-soorten heeft het organisme de niet-gasvorming gemeen, aan den anderen kant produceert het gelijkwaardige hoeveelheden melkzuur als de *coli-paratyphus*-bacteriën.

Verder blijkt uit tabel 3, dat ook de *paratyphus A*-organismen soms in staat zijn acetyl-methyl-carbinol te produceeren.

Men zou hier dus eveneens een scheiding in twee groepen kunnen maken, zooals bij de *coli*-bacteriën wel eens geschiedt; echter heeft de benaming „faecaal" en „non-faecaal", welke men daar aantreft, hier geen zin.

De vraag, in hoeverre *Bact. paratyphus B* en mogelijk ook *Bact. typhi* en *Bact. dysenteriae* in dezelfde twee groepen te verdeelen zouden zijn, moet in het midden worden gelaten.

Daartoe zoude men een zeer veel grooter aantal stammen moeten onderzoeken.

Het resultaat der anaërobe-proeven is volmaakt identiek met dat, der aërobe-proeven. Een verschil komt althans in qualitatief opzicht niet voor.

Tabel 3 voldoet dus zoowel voor de *aërobe* als voor de *anaërobe* dissimilatie.

LITTERATUUR.

1. RIMINI, Chem. Gentr.bl. 1898, II, blz. 277.
2. J. J. BLANKSMA, Chem. Weekbl. 1914, blz. 206.
3. M. LEMOIGNE, Ann. Inst. Past. *27*, 856 (1913).
4. FR. VISSER 'T HOOFT, Chem. Weekbl. *22*, 272 (1925).
5. SÉRULLAS, Chem. Centr.bl. 1831, blz. 868.
6. BEHRENS—KLEY, Organische Microchemische analyse 1922, blz. 311.
7. BEHRENS—KLEY, idem, blz. 314.
8. BEHRENS—KLEY, idem, blz. 334.
9. BEHRENS—KLEY, idem, blz. 336.
10. TROMMER, Ann. de Chemie, *39*, 360 (1841).
    Zie ook: SCHOORL, Organische analyse II, blz. 98 (1921).
11. I. M. KOLTHOFF, Pharm. Weekbl. *61*, 1497 (1924).
12. MULLIKEN, Identification of pure Org. compounds I, blz. 169 (1902).
13. EHRLICH, D. Med. Wochenschr. 1901.
14. DÉNIGÈS, Bull. Soc. pharm. de Bordeaux, *52*, 513 (1912).
    Zie ook: SCHOORL, Organische analyse II, blz. 102 (1921).
15. Zie Hoofdstuk II (6).
16. A. J. LE FÈVRE, Diss. Utrecht 1924.

HOOFDSTUK IV.

ONDERZOEK NAAR DE VORMING VAN ACEETALDEHYDE ALS TUSSCHENPRODUCT.

§ 1. *Bespreking der methoden.*

Zooals uit de resultaten van de qualitatieve proeven blijkt, kan aceetaldehyde — zij het dan ook slechts in uiterst geringe hoeveelheid — worden aangetoond.

Bij de alcoholische gisting is het, voornamelijk door de onderzoekingen van NEUBERG [1]) en zijn leerlingen, een vaststaand feit geworden, dat aceetaldehyde als tusschenproduct optreedt.

Immers is dit het kernpunt van het geheele gistingsschema, door NEUBERG (1) opgesteld.

Hij toch, neemt als „Vorstufe" van het aceetaldehyde steeds het pyrodruivenzuur aan. Dit keto-zuur zou onder invloed van het enzyme, de „*carboxylase*", CO_2 afstaan en overgaan in aceetaldehyde, dat op zijn beurt met een molecule methylglyoxaal en een molecule H_2O een omzetting van CANNIZZARO ondergaat en zoo aethylalcohol en weer pyrodruivenzuur levert [1]).

Zoo ziet men de bron van het koolzuur bij de alcoholische gisting in de ontleding van het pyrodruivenzuur duidelijk voor zich.

Ook bij de *coli*-achtige organismen is met zekerheid aceetaldehyde aangetoond.

En ook hier kan men de CO_2-bron zoeken in de vorming van het aldehyde uit pyrodruivenzuur (2).

---

[1]) Zie Hoofdstuk I (9).

NORD (3) heeft gewerkt met *Bact. coli*, *Bact. dysenteriae*, *Bact. lactis aerogenes*, en ook hij vindt aceetaldehyde.

Dat aceetaldehyde door NORD bij *Bact. dysenteriae* is gevonden, is, zooals aanstonds zal blijken, door ons bevestigd.

Echter rijst de vraag, op welke manier het aceetaldehyde wordt gevormd.

Immers behooren de soorten van *Bact. dysenteriae* en ook de *typhus*-organismen tot de *niet* gasleverende organismen.

Men kan nu dadelijk twee vragen stellen, n.l.: wordt het aceetaldehyde niet uit pyrodruivenzuur gevormd, zooals NEUBERG het aangeeft? Of is dit wèl het geval, wordt er dus wèl CO_2 gevormd, maar wordt dit CO_2 direct in de een of anderen vorm gebonden, zoodat het niet gasvormig kan ontwijken?

Men voelt, dat dit een gewichtige vraag is, en dat het dus de moeite waard is, met zekerheid te kunnen zeggen of aceetaldehyde als tusschenproduct moet worden beschouwd of niet.

Nu bestaan er enkele methoden, waarmede men — door toevoeging van een bepaalde stof aan het substraat — het aldehyde kan vastleggen, zoodat het aan de verdere ontleding ontsnapt.

1. KOSTYTSCHEW (4) gebruikt zinkchloride om het aldehyde vast te leggen.

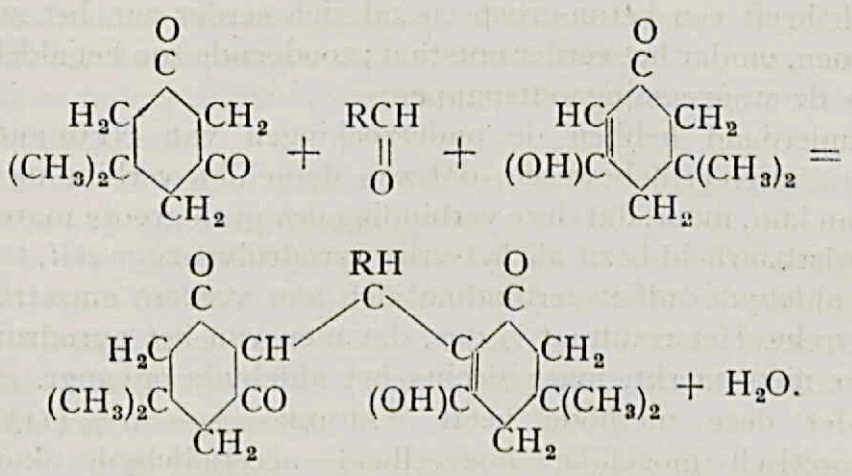
Toevoeging van geringe hoeveelheden $ZnCl_2$ (hoogstens 0.5 %) werken de condensatie van het aceetaldehyde in den hand en dit condensatieproduct (volgens KOSTYTSCHEW paraldehyde resp. metaldehyde) zou niet verder verwerkt worden door de toegevoegde gist. Door destillatie krijgt men het normale aceetaldehyde terug.

Aangezien het ons toescheen, dat deze methode niet voldoende was uitgewerkt en bovendien de uitkomsten van enkele ingezette proeven minder betrouwbaar uitvielen, zijn wij niet verder op deze methode ingegaan.

Daarbij komt, dat de hoeveelheid toe te voegen $ZnCl_2$ aan zeer nauwe grenzen is gebonden. Neemt men een weinig te veel, dan wordt de geheele gisting belemmerd. Voor bacteriëele gisting is deze toe te voegen hoeveelheid in het geheel niet bekend.

2. Een verbinding, die door NEUBERG en REINFURTH (5) is gebruikt om bij de alcoholische gisting aceetaldehyde vast te leggen is het *dimethylhydroresorcine* (dimethyl-cyclohexaandion) (6).

Onder afsplitsing van één molecule water vereenigt zich deze verbinding, kortweg *dimedon* genoemd, met het aldehyde volgens onderstaand schema:



Het ontstane condensatieproduct, het *aldomedon* (afkorting van: *aethylideenbis-dimethylhydroresorcine*), is vrijwel onoplosbaar, terwijl de oplosbaarheid van het dimedon zelf aanzienlijk grooter is.

Deze omstandigheid, gepaard met het feit, dat noch koolhydraten, noch ketonen de bovenstaande condensatie vertoonen, zouden deze verbinding tot een zeer geschikt reagens voor het aceetaldehyde maken, ware het niet, dat het dimedon een bacteriegift is en dus de concentratie van deze stof te gering moet worden genomen, om tot een voldoend zekere indentificatie van het gevormde aldomedon te kunnen komen.

3. Rest ons dus de reeds door DUMAS (7) aangeduide, maar door NEUBERG en FÄRBER (8) en door NEUBERG en REINFURTH (9) uitgewerkte sulfietgisting.

Hieronder heeft men te verstaan: de vergisting van koolhydraten in tegenwoordigheid van secundaire sulfieten.

In tegenstelling met de bisulfieten en het vrije zwaveligzuur, zijn de secundaire sulfieten tot in grootere concentraties nog onschadelijk voor bacteriën.

Hiernaast hebben de sulfieten — evenals de bisulfieten — het vermogen, aldehyden en ketonen aan zich te binden volgens de vergelijking:

$$RCHO + Na_2SO_3 + H_2O = RCH(OH) . O . SO_2Na + NaOH.$$

Nu kan men zich afvragen, of het sulfiet geen verbinding aangaat met het mogelijk aanwezige pyrodruivenzuur. Dit toch heeft een keton-groep en zal zich eerder aan het sulfiet binden, omdat het eerder ontstaat; zoodoende zou het aldehyde aan de waarneming ontsnappen.

Inderdaad hebben de onderzoekingen van NEUBERG en REINFURTH (10) bewezen, dat een dergelijke verbinding ontstaan kan, maar, dat deze verbinding een even groote mate van vergistbaarheid bezit als het vrije pyrodruivenzuur zèlf, terwijl de aldehyde-sulfiet-verbinding zich aan verdere omzettingen onttrekt. Het resultaat is dus, dat men van het pyrodruivenzuur niets merkt, maar slechts het aldehyde opvangt.

Met deze methode heeft NEUBERG 75—80 % (11) der theoretisch mogelijke hoeveelheid aceetaldehyde kunnen krijgen.

Deze methode leent zich, èn door het hooge rendement èn door het afwezig zijn van bacteriegiften (mits binnen bepaalde grenzen) het beste voor het vastleggen van het aceetaldehyde bij de onderhavige onderzoekingen.

§ 2. *Experimenteel gedeelte.*

Als substraat werd gebruikt een 0.3 % pepton-oplossing.

Aangezien men voor het toevoegen van het natriumsulfiet een alkalisch reageerende oplossing verkrijgt, heeft men rekening te houden met het verharsen van de glucose.

Daarom is hier de volgorde van sterilisatie een weinig anders gekozen.

Men gaat uit van een 0.6 % pepton-oplossing.

Bij 50 cm^3 van deze oplossing voegt men 1 g $CaCO_3$ en 2 g Na_2SO_3 en steriliseert, in een Erlenmeyer van 200 cm^3, 20 min. op 112° C.

Daarnaast neemt men 2 g glucose en lost deze op in 50 cm^3

water en steriliseert deze oplossing op de gewone manier bij 100° c.

Deze tweede oplossing voegt men nu steriel bij de eerste en controleert gedurende 2 × 24 uur de steriliteit.

Nu wordt geënt met een suspensie van de gewenschte bacterie en gedurende 10 dagen in een stoof van 37° c gezet.

Daarna wordt de analyse uitgevoerd.

De inhoud van de Erlenmeyer wordt in een destilleerkolf gebracht, waarin zich 10 g $CaCO_3$ bevindt.

De complexe aldehyde-sulfietverbinding dissocieert hierdoor gemakkelijker.

Om de overmaat sulfiet neer te slaan, voegt men 20 cm^3 van een 25 % $BaCl_2$-oplossing toe.

Men verwarmt de kolf nu voorzichtig en vangt het destillaat op in een kolfje met langen hals, dat geheel in ijs staat. In dit kolfje brengt men 5 cm^3 96 % aceetaldehyde-vrijen alcohol. De allonge rijkt tot den bodem en mondt dus uit onder de oppervlakte van den alcohol.

Heeft men circa 50 cm^3 overgedestilleerd, dan onderwerpt men dit destillaat aan een tweede destillatie onder dezelfde voorzorgen, tot 25 cm^3 zijn overgegaan.

Hierin reageert men op aceetaldehyde:

a. met de reactie van Rimini.

b. met een geconcentreerde oplossing van p. nitrophenylhydrazine in 30 % azijnzuur.

Steeds verkregen wij met de reactie van Rimini een donkerblauwe verkleuring, die bij de *coli-* en *paratyphus* organismen, alsmede bij het Flexner-type zelfs intensief is te noemen.

Ook het hydrazon ontstond rijkelijk. Doch hierbij moest vlug gewerkt worden, omdat het oorspronkelijke kanariegele neerslag zeer gemakkelijk overging in een oranje-roode, kristallijne massa met een veel hooger smeltpunt (195°—201°).

Het verkregen gele hydrazon smolt — na omkristallisatie uit een azijnzuur-watermengsel — bij 126° c (ongecorrigeerd).

Naast het bepalen van dit smeltpunt, werd ook het mengsmeltpunt met zuiver hydrazon nagegaan. Dit bleef steeds constant.

Het spreekt van zelf, dat ook blanco parallelproeven werden

ingezet, om zeker te zijn, dat het aldehyde niet uit het pepton afkomstig was. Deze blanco proeven vielen allen negatief uit.

§ 3. *Resultaat.*

Het resultaat was nu, dat bij alle onderzochte stammen van *Bact. dysenteriae* FLEXNER (4 stammen), *Bact. dys.* HISS (4 stammen), *Bact. dys.* SHIGA KRUSE (2 stammen) met volmaakte zekerheid aceetaldehyde is aangetoond.

Eigenaardig is, dat het SHIGA KRUSE-type sterk in groei achterblijft bij de andere twee soorten. Hierdoor was de hoeveelheid aceetaldehyde dan ook veel geringer.

Dit feit, dat bij het qualitatieve onderzoek niet zoo sterk naar voren trad, komt bij het quantitatieve gedeelte sterker tot uiting.

Ter verkrijging van vergelijkingsmateriaal is de sulfietgisting ook ingezet met *Bact. coli*, *Bact. paratyphi A* en *B* en *Bact. typhi*.

Ook hier kregen wij steeds een zeer duidelijk positief resultaat.

Dat LE FÈVRE (12) bij *coli-* en *paratyphus B* veel meer aceetaldehyde vond dan bij *paratyphus A*, *typhus* en *dysenterie*-bacteriën — bij welke organisme hij slechts van sporen spreekt — is mogelijk te wijten aan de veel geringere hoeveelheid entmateriaal, door hem aan de suikeroplossingen toegevoegd.

Met uitzondering van *Bact. dys.* SHIGA KRUSE — die door groeisnelheid achterstond — hebben wij een dergelijk sprekend verschil niet kunnen constateeren.

§ 4. *Andere bijproducten der sulfietgisting.*

Reeds bij hun vroegere onderzoekingen vonden NEUBERG en FÄRBER (13), dat bij de gisting in alkalisch milieu niet alleen het aceetaldehyde-gehalte sterk vergroot werd, doch dat hiermede gepaard ging een verhooging van de glycerine-productie.

CONNSTEIN en LÜDECKE (14) hebben dit practisch uitgewerkt om glycerine in het groot te fabriceeren.

Dit geschiedde reeds in het begin van den oorlog en zij schrijven er o.a. van:

„Unsere Arbeiten sind aus der Not der Zeit entstanden und verdanken ihren Ursprung der Ueberlegung, dasz die Versorgung der europäischen Zentralmächte mit Glyzerin infolge der Blockade in ganz kurzer Zeit völlig ungenügend sein würde; da die wirtschaftliche Versorgung der Welt mit Glyzerin bisher ausschlieszlich auf der Fettspaltung in Seifen- und Stearinfabriken beruhte, so muszte bei der geringen Versorgung der Zentralmächte mit technischen Fetten ein Versagen der Glyzerinversorgung und damit eine ungeheure Erschwerung der Munitionsversorgung die Folge sein."

Het is diep te betreuren, dat het dergelijke beweegredenen zijn, die de uitvinders hebben gedwongen, dezen gistingsvorm in practijk te brengen.

Hoe het zij, het feit is er, en het is een belangrijk feit voor de alcoholische gisting.

Brachten CONNSTEIN en LÜDECKE de practische toepassing, het waren NEUBERG en REINFURTH (1), die ons de theoretische beteekenis gaven. Zij toch vonden, dat aceetaldehyde en glycerine in correlatieve hoeveelheden werden gevormd, n.l. steeds in de verhouding 1 : 1.

Hun uitleg is aldus:

„Durch die bewirkte Blockierung des Azataldehyds, welche durch biologische Agentien nicht aufgehoben werden kann, wird nun aber der letzte Akt des Gärungsvorganges, die Hydrierung des Azetaldehyds zu Alkohol, vereitelt. Dadurch wird aber die normalerweise gegen den Azetaldehyd gerichtete Reduktionsleistung auf einen anderen Weg verwiesen. Wasserstoff wird bei dem Vorgang nicht entwickelt; die gebildete Kohlensäure wird nicht reduziert. Glyzerin ist dann eben das einzige, von der Theorie vorausgesehene Hydrierungsprodukt. Glyzerin erscheint so als Reductionsäquivalent der Brenztraubensäure, die in Kohlensäure und Azetaldehyd zerfällt."

Het was nu interessant, om na te gaan, of bij de gisting, die door de *dysenterie*-bacteriën teweeg werd gebracht, bij de sulfietgisting naast het aceetaldehyde ook glycerine werd gevormd.

Hiervoor onderging de cultuurvloeistof een andere bewerking.

Was de kweektijd afgeloopen, dan werd de cultuurvloeistof gesteriliseerd $\frac{1}{4}$ uur op 100° c en daarna bedeeld met een overmaat $BaCl_2$ om het sulfiet neer te slaan. Dan met een overmaat Na_2SO_4 om het barium te verwijderen. Na filtratie werd zwak aangezuurd met zwavelzuur en met aether geperforeerd gedurende 36 uur.

De uitgeaetherde vloeistof werd in een scheitrechter van den aether afgescheiden en — na neutralisatie met $BaCO_3$ en filtratie van het ontstane $BaSO_4$ — op een waterbord drooggedampt.

Het residu werd in een „Soxleth" geëxtraheerd met 90 % alcohol gedurende 6—8 uren.

Het verkregen alcoholische extract werd drooggedampt en met het residu de reacties op glycerine, aangeduid op blz. 20, uitgevoerd.

Het bleek, dat bij géén der *dysenterie*-soorten glycerine aanwezig was.

Daar deze proeven alleen zijn uitgevoerd met de *dysenterie*-bacteriën, mag deze uitkomst niet zoo maar getransponeerd worden op de andere bacteriën der *coli-typhus* groep.

LITTERATUUR.

1. C. Neuberg—Elsa Reinfurth, Bioch. Zeitschr. *89*, 365 en 389 (1918).
2. A. J. Le Fèvre, Diss., Utrecht 1924.
3. C. Neuberg en F. F. Nord, Bioch. Zeitschr. *96*, 133 (1919).
4. S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem., *79*, 131 (1912).
5. C. Neuberg—Elsa Reinfurth, Bioch. Zeitschr., *106*, 281 (1920).
6. D. Vorländer, B. B. *30*, 1801 (1897). Ann. *294*, 253 (1896).
7. J. B. Dumas, Ann. de chem. et phys. (5e serie), *3*, 57 (1874).
8. C. Neuberg—E. Färber, Bioch. Zeitschr. *78*, 238 (1917).
9. C. Neuberg—Elsa Reinfurth, Bioch. Zeitschr. *89*, 389 (1918).
10. C. Neuberg—Elsa Reinfurth, Ber. *53*, 1039 (1920).
11. C. Neuberg—Elsa Reinfurth, Bioch. Zeitschr. *89*, 365 (1918); *92*, 234 (1918).
    Ber. *52*, 1677 (1919).
12. A. J. Le Fèvre, loc. cit. (2).
13. C. Neuberg—E. Färber, loc. cit. (8).
14. W. Connstein—K. Lüdecke, Ber. *52*, 1385 (1919).

HOOFDSTUK V.

ONTLEDING VAN ENKELE ANDERE STOFFEN.

§ 1. *Ontleding van pyrodruivenzuur.*

a. Voorproeven.

We hebben reeds medegedeeld, dat het pyrodruivenzuur in het gistingsschema van NEUBERG een zeer belangrijke rol speelt.

Ent hij pyrodruivenzuur met gist of gist-perssap, dan krijgt hij een quantitatieve omzetting in aceetaldehyde en CO_2 (1).

Ook *Bact. coli* vergist pyrodruivenzuur onder vorming van azijnzuur, CO_2 en H_2, hetgeen zoo te verklaren is, dat eerst een decarboxylatie plaats vindt, waarbij aceetaldehyde en CO_2 ontstaan en daarna een hydroxydatie van het aldehyde (2):

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C = O \\ \diagdown \\ \quad H \end{array} + HOH \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ COOH \end{array} + H_2.$$

Hoe staat het nu met de niet-gasvormers?

Om deze vraag te beantwoorden, werd de volgende voedingsbodem bereid:

Een 4 % pyrodruivenzuur-oplossing werd met 5 % Na_2CO_3 geneutraliseerd t. o. v. lakmoes en 20 min. bij 110° c gesteriliseerd.

Daarna werd deze vloeistof gemengd met een gelijke hoeveelheid steriel 0.6 % pepton-oplossing en gedurende 15 min. bij 105° nagesteriliseerd.

Met deze oplossing werden gistbuisjes gevuld en geënt met verschillende vertegenwoordigers der *coli-typhus*-groep.

Het resultaat was als volgt:

TABEL 4.

Bact. coli (3)	neutraal, gas	Bact. typhi (3)	zeer zw. groei
Bact. parat. B (2) ..	neutraal, gas	Bact. dys. Fl. (4) ..	zuur, geen gas
Bact. parat. A (3) ..	neutraal, gas	Bact. dys. Hiss (4)	zw. zuur[1]), geen gas
		Bact. dys. Sh. K (3)	geen groei

Uit deze tabel blijkt duidelijk, dat er een groot verschil bestaat tusschen de gasvormers en de niet-gasvormers.

Door den buitengemeen slechten groei van *Bact. typhi* en *Bact. dys.* SHIGA KRUSE op dit substraat kunnen we alleen het FLEXNER- en HISS-type vergelijken met de gasvormers.

In de eerste plaats treft ons dan het wegblijven der gasvormige producten.

Aangezien het aanwezige pepton sterk als buffer fungeert en de kleuromslag van den indicator daardoor bij het neutraliseeren met soda onscherp wordt, zou de mogelijkheid kunnen bestaan, dat er slechts een gradueel verschil in gasontwikkeling bestaat en dat de hoeveelheid gevormd CO_2 bij de tweede groep zoo gering is, dat het geheel als bicarbonaat in oplossing blijft, terwijl dit bij de eerste groep niet het geval is.

Naar rato zou dan de hoeveelheid H_2 ook zeer veel geringer moeten zijn.

Doch deze opmerking is onhoudbaar, als men het frapante verschil in reactie in aanmerking neemt. Blijft bij de eerste groep de reactie neutraal (voorzoover de bufferende oplossing een juiste interpretatie der kleur toelaat), het substraat bij de tweede groep (speciaal bij het FLEXNER-type) is zeer duidelijk rood gekleurd, hetgeen ondubbelzinnig wijst op een sterke vermeerdering van het aantal zuurgroepen.

In deze omstandigheden is het lastig aan te nemen, dat het eventueel gevormde CO_2 in oplossing zal blijven.

---

[1]) Ook bij Bact. dys. Hiss was de groei zeer gering.

Wij kunnen dus met recht zeggen, dat pyrodruivenzuur door de gasvormers onder gasontwikkeling, door het FLEXNER- en HISS-type *zonder* gasontwikkeling, doch onder vermeerdering van zuurgroepen ontleed wordt.

Per analogie mogen wij dit laatste ook zeggen van het SHIGA KRUSE-type en vermoedelijk is hetzelfde met *Bact. typhi* het geval. Om dit nader te controleeren zou men na moeten gaan of *Bact. dys.* SHIGA KRUSE en *Bact. typhi* zich aan dezen voedingsbodem laten aanpassen.

b. Qualitatief onderzoek naar de ontledingsproducten.

Uit deze resultaten volgt logisch de vraag: „Waar moet de vermeerdering van het aantal zuurgroepen aan worden toegeschreven?"

Om deze vraag te beantwoorden dient een onderzoek naar de ontledingsproducten te worden ingesteld.

Bij deze proeven werd niet het natriumzout van pyrodruivenzuur gebruikt, doch het calciumzout.

In plaats van de 4 % pyrodruivenzuur-oplossing met soda te neutraliseeren, werd de dubbele hoeveelheid $CaCO_3$ — noodig voor de neutralisatie — toegevoegd, ook hier werd deze oplossing apart gesteriliseerd en daarna gemengd met eenzelfde hoeveelheid 0.6 % peptonwater en telkens 100 cm^3 in Erlemeyers van 200 cm^3 inhoud gedaan.

Nadat de steriliteit gecontroleerd was, werd een reeks kolfjes geënt met *Bact. dysenteriae* FLEXNER en bij 37° c zoowel aëroob als anaëroob gekweekt.

Na 14 dagen werd de inhoud der Erlenmeyers geänalyseerd.

Het resultaat zoowel bij de aërobe als bij de anaërobeproeven was qualitatief volkomen gelijk.

Gevonden werd:

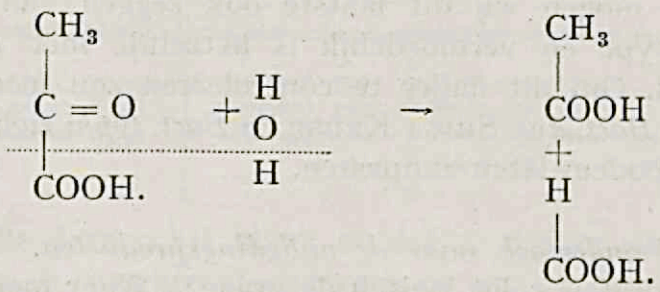
vluchtige neutrale lichamen: alcohol —
aceetaldehyde —

vluchtige zuren: mierenzuur +
azijnzuur +

niet-vluchtige zuren: afwezig.

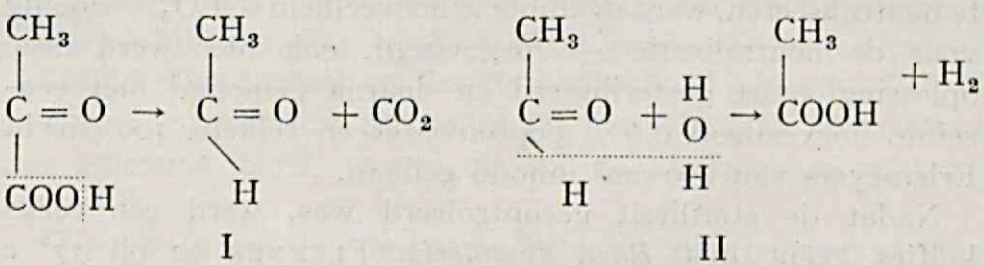
c. *Sulfietgisting van pyrodruivenzuur.*

Zetten wij de formule van pyrodruivenzuur naast die van mierenzuur en azijnzuur, dan lijkt het optreden van deze beide laatste zuren naast elkaar theoretisch evident.

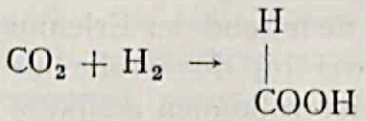


Dit zou dus een geheel andere splitsing van het pyrodruivenzuur zijn, als plaats vindt door de inwerking van de carboxylase.

Hiernaast echter, zou men de theorie kunnen huldigen, dat men wel degelijk met een decarboxylatie te doen heeft met navolgende hydroxydatie en dat het CO_2 dan optreedt als waterstofacceptor n.l.:



I II



III

Hierbij moet men dan aannemen, dat zoowel reactie II als reactie III een zeer groote reactiesnelheid bezitten. Immers, verliep reactie II langzaam, dan zoude er in eenzelfde tijdsverloop te weinig H_2 gevormd worden om reactie III tot stand te laten komen. En verliep reactie III langzaam, dan zoude een overmaat gasvorming CO_2 en H_2 naast elkaar blijven

bestaan. In beide gevallen moet dit leiden tot een gasvormig ontwijken, hetzij van CO_2, hetzij van CO_2 en H_2 te zamen, tenzij men aan wil nemen, dat er een koolzuur-resp. een waterstof-acceptor aanwezig is, die als CO_2-resp. H_2-„overdrager" dienst doet.

Een andere noodzakelijk gevolg van deze opvatting zoude zijn, dat men, indien er inderdaad aceetaldehyde primair gevormd wordt, dit met een „Abfangverfahren" te constateeren is.

Om dit na te gaan, werd de sulfietgisting van het pyrodruivenzuur ingezet.

Ook bij deze proeven is uitgegaan van calciumpyruvinaat, terwijl tevens 2% Na_2SO_3 werd toegevoegd.

Na gebleken steriliteit werd geënt met een 2 × 24 uur oude agarcultuur van verschillende vertegenwoordigers der *coli-typhus*-groep.

Na 10 dagen begon de analyse als beschreven in hoofdstuk IV.

Het resultaat is als volgt:

TABEL 5.

Bact. coli	+++	Bact. typhi	±
Bact. parat. B	++	Bact. dys. Flexner	+
Bact. parat. A	++	Bact. dys. Hiss	+
		Bact. dys. Shiga Kruse	±

De gasvormers gaven een rijkelijke hoeveelheid aceetaldehyde; de verkleuring volgens RIMINI was uiterst intensief, met p. nitrophenylhydrazine ontstond een fink neerslag.

FLEXNER en HISS gaven pas na drie keer destilleeren (zie blz. 27) een duidelijke verkleuring volgens RIMINI en een matig neerslag van het hydrazon.

SHIGA KRUSE en *Bact. typhi* gaven ook na vier keer destilleeren — waarbij een volume van slechts 5 cm³ werd verkregen — een zeer twijfelachtige verkleuring volgens RIMINI en in 't geheel geen neerslag van het hydrazon.

Dit is echter in hoofdzaak te wijten aan den slechten groei, die deze organismen op pyrodruivenzuur vertoonen.

Desniettegenstaande moet men erkennen, dat ook bij de niet-gasvormers aceetaldehyde wordt gevormd.

Of nu de normale vergisting per sé óók over het aceetaldehyde moet loopen, kan men eigenlijk zóó niet bewijzen. Want bij de sulfietgisting schept men noodzakelijk andere omstandigheden, die mogelijk het chemisme der ontleding in geheel andere banen leiden.

Een dergelijk „Abfangverfahren" is dan ook niet bewijzend voor het optreden van aceetaldehyde als tusschenproduct noch bij de normale glucose-vergisting, noch bij de normale pyrodruivenzuurvergisting (3).

§ 2. *Ontleding van natriumformiaat.*

Het is ook van belang te weten, hoe de verschillende microorganismen, behoorende tot de *coli-typhus*-groep, zich verhouden t. o. v. het mierenzuur of de zouten daarvan.

Immers is à priori te verwachten, dat de gasvormers in staat zullen zijn het mierenzuur te ontleden onder vorming van CO_2 en H_2, terwijl de niet-gasvormers dit vermogen zullen missen.

Om dit na te gaan, werd peptonwater bereid, waaraan natriumformiaat werd toegevoegd in verschillende concentraties.

Zooals in onderstaand tabelletje te zien is, bleek onze verwachting inderdaad uit te komen.

TABEL 6.

	Hoeveelheid Na-formiaat in %.			
	0.5	1.0	1.5	2.0
Bact. coli[1]	+	+	+	+
Bact. parat. B.	+	+	+	+
Bact. parat. A.	±	±	+	+
Bact. typhi	O	O	O	O
Bact. dys. Flexner	O	O	O	O
Bact. dys. Hiss	O	O	O	O
Bact. dys. Shiga Kruse	O	O	O	O

+ = gas. O = geen gas. ± = weinig gas.

[1]) Dit is in overeenstemming o. a. met de proeven van DAKES en JOLLYMAN (4) en van GRRY (5).

De hoeveelheid gas was echter bij de gasvormers niet zoo groot als wij hadden verwacht.

't Chemisme kan men zich zoo voorstellen:

$$HCOONa + H_2O \rightarrow HCOOH + NaOH$$

$$HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2$$

$$NaOH + CO_2 \rightarrow NaHCO_3.$$

Door de derde reactie is de geringe gasontwikkeling te verklaren.

LITTERATUUR.

1. C. Neuberg, Bioch. Zeitschr. *71*, 1 (1915).
2. Zie Hoofdstuk IV (2).
3. Coolhaas, Diss., Wageningen 1927 (stelling II).
4. Pakes—Jollyman, Journ. Chem. Soc. *79*, I, 386 (1901).
5. E. C. Grey, Proc. Roy. Soc. *87B*, 461 (1914).

HOOFDSTUK VI.

QUANTITATIEVE BEPALING DER ONTLEDINGS-PRODUCTEN, DOOR DYSENTERIE-BACTERIËN UIT GLUCOSE GEMAAKT.

§ 1. *De waarde van het quantitatief onderzoek.*

Nadat qualitatief was nagegaan, welke producten de *dysenterie*-bacteriën uit glucose vormen, was het ook interessant te weten, in welke hoeveelheden deze stoffen werden geproduceerd.

Immers, krijgt men door het qualitatieve onderzoek een inzicht in de *soort* van ontleding, die men voor zich heeft, door de quantitatieve verhoudingen der ontledingsproducten kan men te weten komen, welke reactie of welk reactie-complex op den voorgrond treedt.

Echter mag men niet verwachten, dat men bij het onderzoek van diverse stammen van eenzelfde bacteriesoort steeds in dezelfde verhouding de ontledingsproducten zal aantreffen. Ja, zelfs bij éénzelfden stam vindt men haast evenveel variaties in de verhoudingen, als men analyses doet.

Hier toch heeft men met levende substantie te maken, met levend protoplasma, dat door allerlei in- en uitwendige omstandigheden als individualiteit, variabiliteit, aanpassing, concentratie, pH, temperatuur en wat dies meer zij, aan veranderingen onderhevig is.

Wil men zuiver exacte waarneming doen, dan zoude men den invloed al dezer factoren òf in rekening moeten brengen òf moeten elimineeren, door het geheele complex van factoren steeds constant te houden.

Het behoeft wel geen betoog, dat dit vooralsnog tot de onmogelijkheden behoort.

Gelukkig begeert men in de microbiologie vooralsnog een dergelijke mathematische juistheid niet.

Wil men in groote lijnen het verloop van bepaalde ontledingen nagaan, dan heeft men allereerst op de hoofdproducten te letten en op hunne onderlinge, globale verhouding.

Komt bij de eene analyse 1 % van het eene hoofdproduct méér voor en van een ander 1 % minder, dan bij een tweede analyse, dan legt dit practisch geen gewicht in de schaal daar deze individueele fluctuatie — mits natuurlijk binnen redelijke grenzen — het inzicht in het gistingsschema niet zal benadeelen.

Kunnen bij een bepaalde ontleding enkele stoffen slechts als sporen worden aangetoond, dan heeft het voor het bepalen van de groote lijnen, waarlangs de ontleding verloopt, in het geheel geen zin deze sporen quantitatief te bepalen.

Hierbij komt nog, dat men te maken heeft met een cultuurvloeistof van uitermate gecompliceerde samenstelling, die een geheel complex van organische stoffen bevat.

De quantitatieve methodiek in de organisch-analytische chemie is nog niet zóó ver geperfectioneerd, dat in een dergelijke gecompliceerde vloeistof de diverse bestanddeelen tot 0.2 % nauwkeurig kunnen worden bepaald.

Deze proeffouten nu, maken het bepalen van sporen eener verbinding nutteloos, omdat men in het geheel geen betrouwbare cijfers verkrijgt.

Anders wordt het echter met de qualitatieve interpretatie der sporen.

Immers zij kunnen aanwijzingen geven, dat het organisme óók in staat geacht kan worden een anderen „ontledingsweg" te bewandelen, waarbij het in sporen aanwezig bijproduct tot een belangrijk hoofdproduct kan worden, mits de omstandigheden maar juist worden gekozen.

Een zeer duidelijk voorbeeld is wel de sulfietgisting, waarbij aceetaldehyde en glycerine als hoofdproducten optreden, terwijl zij in het normale gistingsverloop verre op den achtergrond blijven.

Omgekeerd treedt het normale hoofdproduct (alcohol) bij de sulfietgisting geheel terug.

Het is nu zeker niet onmogelijk, dat men op soortgelijke wijze elk bijproduct tot hoofdproduct kan maken en zoodoende die speciale „ontledingsweg" beter kan bestudeeren.

Het is maar de vraag, of men voor elk dezer wegen de juiste omstandigheden vinden kan en — wat nog meer is — of men dan in staat is die omstandigheden te realiseeren.

Bij ons onderzoek hebben wij ons bepaald bij het normale verloop der glucose-ontleding, waarbij de uitwendige omstandigheden, practisch gesproken, gelijk werden gehouden.

§ 2. *De gebruikte bepalings-methoden.*

De stoffen, die quantitatief bepaald moesten worden, waren de volgende:

Glucose (vòòr en nà den kweektijd), mierenzuur, azijnzuur, barnsteenzuur en calcium (vòòr en nà den kweektijd om uit de vermeerdering den totalen zuurgraad te berekenen).

Glucose werd bepaald met de methode van SCHOORL (1).

20 cm^3 van het glucosehoudende peptonwater werden behandeld met 5 cm^3 $\frac{1}{2}$ N loodacetaat en na enkele minuten met 5 cm^3 verzadigde Na_2SO_4-oplossing. Na 6 minuten werd door een droogfilter afgefiltreerd en van het — in een droog kolfje opgevangen — filtraat 10 cm^3 afgepipetteerd.

Deze hoeveelheid werd al of niet verdund, naarmate de hoeveelheid glucose meer of minder werd verwacht.

Bij 10 cm^3 van deze vloeistof voegt men 10 cm^3 FEHLING I en 10 cm^3 FEHLING II, vult aan tot 50 cm^3 met gedestilleerd water, brengt in 3 min. aan de kook, kookt 2 min. door en koelt in stroomend water af.

Na toevoeging van 3 gK.J. en 15 cm^3 4 N H_2SO_4 wordt het vrijgekomen jodium met 0.1 N thiosulfaat getitreerd.

Het verschil van het verkregen cijfer met dat, van de blanco proef, werd omgerekend in glucose.

Mierenzuur en azijnzuur.

Daar alle, dus ook de vluchtige, zuren als hunne Ca-zouten aanwezig waren, werden deze laatsten (d. i. mierenzuur en azijnzuur) als volgt bepaald:

50 cm^3 cultuurvloeistof werden in een kolf zwak aangezuurd met H_2SO_4 (tot juist blauw op congopapier) en aan een stroomdestillatie onderworpen, tot bijna 1 l destillaat was verkregen. Nadat koeler en allonge met gedestilleerd water waren uitgewasschen, werd tot 1 l aangevuld.

Van dit destillaat werd de zuurgraad bepaald door 200 cm^3 op phenolphtaleïne te titreeren met 0.1 N NaOH.

Daarna werd 2 × 200 cm^3 (dubbelproef) met de bepaalde hoeveelheid NaOH geneutraliseerd zonder toevoeging van phenolphtaleine [1]), aan de kook gebracht en 5 cm^3 verzadigde $HgCl_2$-oplossing toegevoegd plus 0.250 g natriumacetaat.

Nadat het geheel 5 minuten had doorgekookt, werd het 2 uur op een kokend waterbad gezet en daarna den nacht over bij kamertemperatuur ter zijde gezet.

Nu werd door een gewogen filter gefiltreerd, dit 2 uur bij 105° gedroogd en gewogen.

Deze calomelmethode heeft het groote voordeel, dat het gewicht van het calomel ongeveer 10 keer zoo groot is als het overeenkomstige gewicht van het mierenzuur, zoodat een gewichtsfout bij de calomelbepaling ook circa tien keer zoo gering wordt.

Wat het eerste gedeelte betreft, de stoomdestillatie, daarbij heeft men het bezwaar, dat de zuren — en vòòral het azijnzuur — hardnekkig in de kolf blijven zitten, waardoor men te lage uitkomsten krijgt.

Dit kan men voorkomen, door de stoomdestillatie krachtig en lang voort te zetten. Echter krijgt men dan het bezwaar, dat het volume van het destillaat zòò groot wordt, dat de zuren daarin in te verdunden toestand voorkomen, waardoor men groote titratiefouten maakt.

---

[1]) Het bleek n.l. uit voorproeven, dat het phenolphtaleine — hoewel zwak — òòk een reduceerend vermogen t. o. v. $HgCl_2$ bezat, zoodat het gewicht aan calomel te hoog zou uitvallen.

Men kan het achterblijven der zuren in de kolf echter ook op een andere wijze tot het minimum beperken, indien men de volgende voorzorgen neemt:

a. de spanning van den stoom moet groot zijn, zoodat de waterdamp met kracht door de vloeistof heen geblazen wordt.

b. de hals van de kolf en het voorste gedeelte van den koeler — dus vrijwel van den maniscus van de vloeistof in de kolf tot aan de plaats, waar de waterkoeling begint — moet men geheel met watten omsluiten om warmteverlies tegen te gaan.

c. de hoeveelheid toegevoegde zwavelzuur moet zóó gekozen zijn, dat de organische zuren volkomen vrij zijn gemaakt, doch dat men de vloeistof in de kolf rustig tot de helft kan indampen, zonder dat men voor verkoling of ontleding (vooral van het mierenzuur) behoeft te vreezen.

Gedurende de stoomdestillatie dampt men twee keer de te destilleeren vloeistof tot de helft in met behulp van een klein vlammetje.

Indien men nu steeds op dezelfde wijze en met hetzelfde apparaat werkt, en indien men zorgt, dat de stoomdestillatie minstens $2^1/_2$ uur duurt, dan krijgt men inderdaad voldoende juiste resultaten.

Ook zij er op gewezen, dat de maatkolf, waarin het destillaat werd opgevangen, steeds met stroomend water werd gekoeld, terwijl de allonge tot bijna den bodem reikte en daardoor al spoedig onder de oppervlakte van het destillaat kwam.

Is nu het mierenzuur met de calomel-methode bepaald, dan wordt het azijnzuur berekend, door de hoeveelheid mierenzuur af te trekken van den gezamenlijken zuurgraad van het destillaat.

Het *barnsteenzuur* werd grafimetrisch als bariumsuccinaat bepaald:

25 cm^3 cultuurvloeistof werden, na zwak aanzuren met H_2SO_4, met aether geperforeerd gedurende 48 uur.

Het aetherisch extract werd drooggedampt en het residu opgelost in 100 cm^3 96% alcohol. De heldere oplossing werd boven een kleine vlam zacht aan het koken gebracht en na toevoeging van 2—3 druppels phenolphtaleïne zoo warm mogelijk geneutraliseerd met verzadigde bariet-oplossing.

Daarna werd nog een minuut gekookt om het neerslag gelegenheid te geven goed samen te vlokken en nu de kolf voorzien van een doorboorde kurk, waarin een buisje met natronkalk.

Na volledige afkoeling werd het neerslag door een Goochkroes gefiltreerd, drie keer met 96% alcohol uitgewasschen en daarna één keer met aether en bij 100° c gedroogd.

Het buisje met natronkalk is noodig om de vorming van $BaCO_3$ door de CO_2 van de lucht tegen te gaan. Dit toch kan licht gevormd worden, indien men met de neutralisatie iets te ver is gegaan en is eveneens onoplosbaar in alcohol, zoodat de uitkomst te hoog zoude zijn.

Het *calcium* werd bepaald, om een contrôle te hebben op de totale hoeveelheid zuur.

Immers, is de oplosbaarheid van het toegevoegde krijt zeer gering. Door de ontleding van het koolhydraat worden zuren gevormd, die direct oplossend werken op het krijt.

Gevolg is, dat na een bepaalde kweektijd het gehalte van in oplossing aanwezig calcium verhoogd is. Deze verhooging is een directe maatstaf voor de totale hoeveelheid zuur.

De hoeveelheid hieruit berekende zuur-aequivalenten moet dus gelijk zijn aan de som van de zuur-aequivalenten, berekend uit de hoeveelheid barnsteenzuur en den zuurgraad van het destillaat, bij de stoomdestillatie verkregen.

Hierin heeft men dus een contrôle, of inderdaad alle aanwezige zuren bepaald zijn.

De cultuurvloeistof werd door een hard filter van zwevende krijtdeeltjes gefiltreerd en 20 cm^3 van dit heldere filtraat, na toevoeging van 0.250 g NH_4Cl, aan de kook gebracht. Bij kookhitte voegt men 10 cm^3 verzadigde ammoniumoxalaatoplossing toe en kookt enkele minuten door. Het neerslag werd gefiltreerd door een trechter met wijden steel, met heet water uitgewasschen tot de oxalaat-reactie in het waschwater verdwenen is. Het filter werd doorgestoken en het neerlsag met heet water in een kolf gespoten. Daarna werd het filter met 25—30 cm^3 warm verdund zwavelzuur (1 : 4) uitgewasschen en met heet water nagespoeld.

De zoo verkregen warme, heldere vloeistof werd met 0.1 N kaliumpermanganaat getitreerd.

§ 3. *Experimenteel gedeelte.*

a. *Apperatuur.*

Al de quantitatieve proeven met den glucosehoudenden voedingsbodem zijn genomen onder streng anaërobe omstandigheden.

Daarvoor was noodig een gemakkelijk afsluitbare ruimte, die gevonden werd in een vacuum-exsiccator. Echter was den omvang van de aanwezige vacuum-exsiccatoren niet altijd

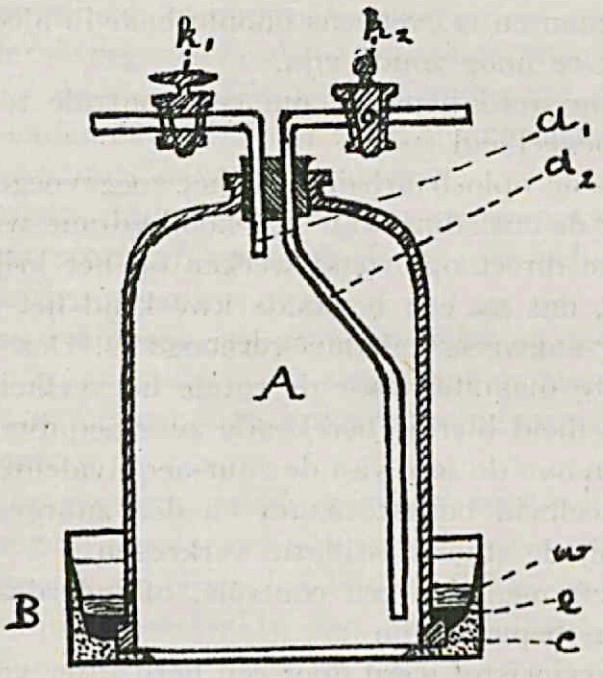


Fig. I.

groot genoeg om al de contrôle-kolfjes (zie onder *b*) te kunnen bevatten. In dat geval maakten wij gebruik van een groote glazen klok A (fig. I), welke stond in een smeedijzeren bak B.

Op den bodem van dezen bak was een ring van plasticine aangebracht (C), waarin de onderkant van de kolk werd vastgedrukt. Aan den bovenkant was de klok voorzien van een dubbel doorboorde kurk, met een korte (d_1) en een lange (d_2), langs den wand omgebogen buis. Deze buizen konden met een kraantje (k_1 en k_2) dicht gemaakt worden.

b. *Het gebruik.*

Nadat de kolven — behandeld en geënt als beschreven zal

worden onder *c* —, benevens 10 g pyrogallol in den exsiccator, respectievelijk in de klok waren gebracht, werd de inhoud van den exsiccator, resp. klok, leeggezogen, tot een vacuum van circa 2 cm. Dan werd de kraan k_1 verbonden met een waschfleschje, gevuld met een oplossing van 10 g pyrogallol in 100 cm^3 10% natronloog en dit waschfleschje aan een stikstofbom geschakeld.

Door voorzichtig het ventiel van de bom en de kraan k_1 open te zetten, werd de stikstof in den exsiccator, resp. klok, gebracht.

De andere kraan k_2 werd verbonden met een kleine manometer om tegen het einde den druk te kunnen nagaan.

Was de exsiccator, resp. klok, geheel gevuld, dan werd de manometer verwijderd, de kraan k_2 opengezet en met matige snelheid nog een kwart uur stikstof doorgeleid.

Nu werd de exsiccator, resp. klok, weer leeggezogen en wederom gevuld, waarna ten derde male werd leeggezogen. Bij de derde vulling werd het ééne, reeds gebruikte waschfleschje vervangen door drie andere, gevuld met versch gemaakte pyrogalloloplossing.

Telkenmale werd eerst een voldoenden tijd stikstof door de waschfleschjes alleen geleid, om zeker te zijn, dat zich daarin geen lucht meer bevond.

Na de derde vulling werd zwak aangezogen, zoodat een zeer kleine onderdruk ontstond en nu door buis d_2 100 cm^3 10% natronloog gezogen, waarin zich het vooraf in de klok gebrachte pyrogallol oploste.

Dit werd gedaan, om zeker te zijn, dat de inwendige ruimte anaëroob bleef.

Na dit alles werd om de klok dan nog een laag kwik (e) gegoten in den bak, aan den buitenkant der klok en hierboven een laag water (w) om het verdampen van het kwik tegen te gaan.

Deze waterlaag werd voortdurend aangevuld.

Op deze wijze voorbereid, werd het geheel in een stoof van 37° c gezet en daarin een bepaalden tijd gelaten.

c. *Het verloop van de proef.*

Ook voor de quantitatieve proeven werd een 0.3% peptonwateroplossing gebruikt, waaraan door inwegen circa 2% glucose werd toegevoegd.

Het steriliseeren gebeurde in principe als beschreven staat op blz. 25.

Echter zijn er enkele punten, die in het oog dienen gehouden te worden.

Ter bepaling van het glucosegehalte vóór en nà den kweektijd moeten we twee volmaakt identieke vloeistoffen hebben, waarvan de eene geënt, de andere niet geënt wordt.

Ten tweede moeten we een contrôle blanco proef hebben, om te zien, of het peptonwater verandert door de inwerking der bacteriën. Daarom werd het substraat als volgt behandeld en verdeeld:

600 cm^3 peptonwater van 0.3% werd gemaakt en 6 g krijt toegevoegd. Dit werd gesteriliseerd 20 min. op 115° c. Door schudden werd het krijt homogeen gesuspendeerd en nu zoo vlug en steriel mogelijk 100 cm^3 gebracht in een steriele Erlenmeyer-kolf van 150 cm^3 (kolf I).

Bij de overgebleven 500 cm^3 werd 10 g glucose gebracht en dit tegelijk met kolf I gesteriliseerd als beschreven staat op blz. 25.

Nu werd door schudden het krijt weer homogeen gesuspendeerd en zoo nauwkeurig mogelijk 350 cm^3 in een steriele Erlenmeyer-kolf van 500 cm^3 gebracht (kolf II). Op deze kolf is n.l. een empirisch vastgestelde streepverdeeling aangebracht.

De rest ($\pm$ 150 cm^3) werd gebracht in een steriele Erlenmeyer van 200 cm^3 (kolf III).

Zoo verkrijgt men dus drie kolven: in I bevindt zich alleen peptonwater, waarvan de voorgeschiedenis zooveel mogelijk gelijk is aan die van de rest van het substraat, II en III bevatten volmaakt identieke glucose-peptonoplossingen.

Het entmateriaal is in hoofdstuk II beschreven. Kolf II werd nu door middel van een steriele pipet bedeeld met 10 cm^3 suspensie. Alle bepalingen hierin gedaan moeten dus met de factor $\frac{36}{35}$ vermenigvuldigd worden. Kolf I werd met $1^1/_2$ cm^3 suspensie geënt, terwijl kolf III ongeënt bleef. Alle drie de kolven werden nu in den exsiccator, resp. klok, gezet.

Met het oog op de glucosebepaling is nagegaan, of men met geënt peptonwater een andere blanco-waarde verkrijgt, dan met ongeënt peptonwater. Dit bleek in het geheel niet het

geval te zijn, terwijl het verschil met zuiver water ook zeer gering is.

Kolf I had dus feitelijk wel achterwege kunnen blijven, doch, om zoo zuiver mogelijk gelijke voorwaarden te scheppen, is hier toch mede doorgegaan.

Aangezien onder anaërobe omstandigheden den groei zeer veel trager is [1]) — vooral bij *Bact. dysenteriae* SHIGA KRUSE — varieerde de kweektijd van 14—28 dagen.

Daarna werd met de analyse begonnen, waarbij al dadelijk een complicatie komt, n.l.: men heeft hier met pathogene organismen te maken; het zoude dus onverantwoordelijk zijn met de analyse te beginnen zonder voorafgaande sterilisatie.

Gelukkig zijn de *dysenterie*-bacteriën weinig resistent tegen warmte, zoodat een korte sterilisatie van één kwartier bij 100° c voldoende is, om deze pathogene organismen in deze omstandigheden te dooden. Echter krijgt men hierdoor een mogelijke verandering in de bestanddeelen en wel voornamelijk in het glucosegehalte.

Door een lichte verharsing gaat het gehalte achteruit en men krijgt dan geen voldoende kloppende koolstofbalans.

Aangezien kolf II ongeïnfecteerd is gebleven, heeft het geen zin deze kolf aan een sterilisatie te onderwerpen.

Hierbij komt, dat men niet weet, of de verharsingsgraad in de geïnfecteerde en de ongeïnfecteerde kolf na den kweektijd wel even groot is.

Men komt dus zuiverder tot een resultaat, door de geënte kolf III een kwartier te verhitten op 100° c Daarna het glucosegehalte, benevens de hoeveelheden der andere producten te bepalen en een deel van het substraat ten tweede male een kwartier op 100° c te verhitten en weer het glucosegehalte te bepalen.

Het verschil tusschen beide glucosebepalingen geeft aan de hoeveelheid glucose, die door de sterilisatie verdwenen is. Deze hoeveelheid wordt dan bij de uitkomst van de eerste bepaling opgeteld.

---

[1]) Zie Hoofdstuk VII.

§ 4. *De resultaten.*

Als voorbeeld moge hier één analyse volgen.

1e Proef met *Bact. dys.* FLEXNER.

A. *Glucosebepaling*:

a. in kolf III (ongeënt, onvergist):

bij 20 cm^3 substraat worden 5 cm^3 Pb-acetaatoplossing ($^1/_2$ N) en 5 cm^3 Na_2SO_4 oplossing (verzadigd) gepipetteerd.

Na filtratie wordt 10 cm^3 filtraat in een maatkolf verdund tot 50 cm^3; 10 cm^3 van deze verdunning wordt behandeld met 10 cm^3 Fehling I en 10 cm^3 Fehling II, aangevuld tot 50 cm^3 en gekookt. Na reductie en toevoeging van NaJ en H_2SO_4 is noodig:

18.35 cm^3 en 18.35 cm^3 d.i. gemiddeld 18.35 cm^3 thio(0.1029 N).

Voor de blanco proef (het peptonwater uit kolf I onderging na sterilisatie dezelfde behandeling) was noodig:

26.95 cm^3 en 26.97 cm^3, d. i. gemiddeld: 26.96 cm^3 thio.

Verschil is dus: 26.96 — 18.35 cm^3 = 8.61 cm^3 thio (0.1029 N) of omgerekend op $^1/_{10}$ N wordt dit:

8.61 × 0.1029 = 8.86 cm^3 N/10 thio.

Uitgerekend met de tabel van SCHOORL wordt dit:

56.4 mg Cu of 28.4 mg glucose.

Dus in 100 cm^3 substraat zit:

75 × 28.4 = 2130.0 mg glucose.

b. in Kolf II (geënt, vergist):

zelfde verdunning als boven.

Noodig na 1e keer steriliseeren:

20.34 cm^3 en 20.39 cm^3 thio, d. i. gem. ... 20.37 cm^3 thio

noodig na 2e keer steriliseeren:

20.53 cm^3 en 20.58 cm^3 thio, d. i. gem. ... 20.56 cm^3 thio

verschil is: 0.23 cm^3 thio

d. i. het gevolg van één keer steriliseeren.

Dus vòòr de eerste keer steriliseeren zou noodig zijn: 20.37 — 0.23 = 20.14 cm^3 thio.

Het verschil met de blanco proef is dus:

$$26.96 - 20.14 = 6.82 \text{ cm}^3 \text{ thio } (0.1029 \text{ N}).$$

Volgens de tabel van SCHOORL komt dit overeen met 22.5 mg glucose.

Dus omgerekend op het oorspronkelijk volume zit er in 100 cm³ substraat $\frac{36}{35}$[1]) $\times 75 \times 22.5 = 1732.5$ mg glucose.

De hoeveelheid vergiste glucose is dus:

$$2130.0 - 1732.5 = \textit{397.5 mg glucose.}$$

B. *Vluchtige zuren.*

50 cm³ substraat worden, na zwak aanzuren, met stoom gedestilleerd en het destillaat tot 1000 cm³ aangevuld.

Voor 200 cm³ destillaat is noodig: 3.67 cm³ en 3.71 cm³ NaOH (0.1288 N).

d. i. gemiddeld: 3.69 cm³, 0.1288 N NaOH of 4.75 cm³ N/10 NaOH.

De *totale hoeveelheid* vluchtige zuren in 100 cm³ substraat komt dus overeen met:

$$\frac{36}{35} \times 10 \times 4.75 = \textit{48.88 cm}^3 \textit{ N/10 NaOH.}$$

Mierenzuur. — De calomel-bepaling in 200 cm³ destillaat geeft: 0.0501 g en 0.0515 g HgCl, d. i. gem. 0.0508 g

Dus zit in 100 cm³ substraat:

$$10 \times \frac{46}{473} \times 50.8 \times \frac{36}{35} = \textit{50.8 mg mierenzuur.}$$

Azijnzuur. — 50.8 mg mierenzuur correspondeeren met $\frac{50,8}{4,6} = 11.04$ cm³ N/10 NaOH.

Dus bevatten 100 cm³ substraat:

$$(48.88 - 11.04) \times 6 = \textit{227.0 mg azijnzuur.}$$

C. *Barnsteenzuur.*

Na perforatie en behandeling met barietwater is het gewicht van het verkregen Ba-succinaat (uitgaande van 25 cm³ substraat):

0.0551 g en 0.0563 g, d. i. gemiddeld: 55.7 mg.

Dus bevindt zich in 100 cm³ substraat:

$$4 \times \frac{118}{253} \times 55.7 \times \frac{36}{35} = \textit{106.9 mg barnsteenzuur.}$$

---

[1]) Het volumen werd na den kweektijd en na de eerste sterilisatie eerst bij kamertemperatuur gecontroleerd.

D. *Calciumbepaling.*

Voor het opgeloste Ca-oxalaat (uitgaande van 10 cm³ substraat) is noodig:

vòòr de vergisting (kolf III):

0.45 cm³ en 0.45 cm³. $KMnO_4$ d.i. gem. 0.45 cm³ $KMnO_4$ (0.0989 N), nà de vergisting (Kolf II):

7.16 cm³ en 7.18 cm³, d. i. gem. 7.17 cm³ $KMnO_4$.

De vermeerdering is dus: $7.17 \times \frac{36}{35} - 0.45 = 6.92$ cm³ 0.0989 N $KMnO_4$.

De toename aan calcium per 100 cm³ substraat is dus:

$10 \times 0.0989 \times 6.92 \times 20.04 =$ *137.2 mg ca.*

Rekenen we het toenemen aan calcium uit via de gevonden hoeveelheden der zuren, dan krijgen we:

mierenzuur + azijnzuur (= 48.88 cm³ N/10 NaOH).
Correspondeeren met ..... 97.9 mg Ca.
106.9 mg barnsteenzuur corresp. met ..... 36.3 mg Ca.

Samen: 134.2 mg Ca.

De overeenkomst is dus bevredigend.

Met deze gegevens kunnen wij nu de koolstofbalans opmaken, die er als volgt komt uit te zien:

FLEXNER I (Kweektijd: 14 dagen).

Vergiste h.h. glucose per 100 cm³	Gevonden producten per 100 cm³			
397.5 mg glucose dit is: $^2/_5 \times 397.5 =$ *159 mg C.*	alcohol:	spoor		
	aldehyde:	spoor		
	mierenzuur:	50.8 mg	=	13.3 mg C.
	azijnzuur:	227.0 mg	=	90.8 mg C.
	barnsteenzuur:	106.9 mg	=	43.5 mg C.
	totaal:			*147.6 mg. C.*
	dit is: *92.8* %.			

Hieronder volgen de resultaten der andere proeven:

Flexner II (Kweektijd: 20 dagen).

Verlies aan glucose per 100 cm³	Gevonden producten per 100 cm³			
1807.5 — 1305.0 = 502.5 mg glucose	alcohol:	spoor		
	aldehyde:	spoor		
dit is: *201 mg C.*	mierenzuur:	64	mg =	16.7 mg C.
	azijnzuur:	274.2	mg =	109.7 mg C.
	barnsteenzuur:	137.6	mg =	55.9 mg C.
	totaal:			*182.3 mg C.*
	dit is: *90.7 %.*			

Flexner III (Kweektijd: 14 dagen).

Verlies aan glucose per 100 cm³	Gevormde producten per 100 cm³			
1612.5 — 1180.5 = 432.0 mg glucose	alcohol:	spoor		
	aldehyde:	spoor		
dit is: *173 mg C.*	mierenzuur:	66.2	mg =	17.3 mg C.
	azijnzuur:	197.6	mg =	79.0 mg C.
	barnsteenzuur:	150.4	mg =	61.2 mg C.
	totaal:			*157.5 mg C.*
	dit is: *91.0 %.*			

Hiss I (Kweektijd: 14 dagen).

Verlies aan glucose per 100 cm³	Gevonden producten per 100 cm³			
2179.5 — 1924.4 = 255.1 mg glucose	alcohol:	spoor		
	aldehyd:	spoor		
dit is: *102.0 mg C.*	mierenzuur:	20	mg =	5.2 mg C.
	azijnzuur:	182.9	mg =	73.2 mg C.
	barnsteenzuur:	50.2	mg =	20.4 mg C.
	totaal:			*98.8 mg C.*
	dit is: *96.9 %.*			

SHIGA KRUSE I (Kweektijd: 24 dagen).

Verlies aan glucose per 100 cm³	Gevormde producten per 100 cm³			
2156.7 — 1900.5 = 256.2 mg glucose dit is: *102.5 mg C.*	alcohol:	spoor		
	aldehyd:	spoor		
	mierenzuur:	35.0 mg	=	9.1 mg C.
	azijnzuur:	148.1 mg	=	59.2 mg C.
	barnsteenzuur:	65.6 mg	=	26.7 mg C.
	totaal:			*95.0 mg C.*
	dit is: *92.7* %.			

SHIGA KRUSE II (Kweektijd: 28 dagen).

Verlies aan glucose per 100 cm³	Gevormde producten per 100 cm³			
1572.5 — 1254.0 = 318.5 mg glucose dit is: *127.4 mg C.*	alcohol:	spoor		
	aldehyde:	spoor		
	mierenzuur:	36.2 mg	=	9.4 mg C.
	azijnzuur:	201.0 mg	=	80.4 mg C.
	barnsteenzuur:	69.2 mg	=	29.1 mg C.
	totaal:			*118.9 mg C.*
	dit is: *93.3* %.			

Met uitzondering van proef 4 (HISS) wordt bij alle proeven circa 92 % van de koolstof teruggevonden.

De rest moet men zoeken in:

a. de sporen van andere gevormde stoffen,

b. de vermeerdering van het bacterie-protoplasma.

De hoeveelheid glucose, die aangetast wordt, blijkt zeer gering te zijn.

Zelfs bij FLEXNER, die het snelste groeit, wordt in 20 dagen tijds niet meer dan 28 % van de aanwezige glucose verteerd.

SHIGA KRUSE tast slechts 20 % aan in 28 dagen.

Dit maakt het geheele verloop der quantitatieve analyse niet gemakkelijker.

Gaan we de onderlinge moleculaire verhouding der gevonden zuren na, dan zien we daarin een kleine overeenstemming.

Bij FLEXNER zijn deze verhoudingen voor de drie zuren respectievelijk:

1.1 mol. mierenzuur : 3.8 mol. azijnzuur : 0.9 mol. barnsteenz.
1.4 mol. mierenzuur : 4.6 mol. azijnzuur : 1.2 mol. barnsteenz.
1.4 mol. mierenzuur : 3.3 mol. azijnzuur : 1.3 mol. barnsteenz.

Bij SHIGA KRUSE zijn de verhoudingen resp.:

0.8 mol. mierenzuur : 2.5 mol. azijnzuur : 0.6 mol. barnsteenz.
0.8 mol. mierenzuur : 3.35 mol. azijnzuur : 0.6 mol. barnsteenz.

De proef met HISS gedaan, geeft als verhouding:

0.4 mol. mierenzuur : 3.0 mol. azijnzuur : 0.4 mol. barnsteenz.

Nemen we de hoeveelheid gevormd mierenzuur als eenheid aan, dan krijgen we de volgende moleculaire verhoudingen:

TABEL 7.

	Mierenzuur.	Azijnzuur.	Barnsteenzuur.
FLEXNER.....	1	3.5	0.8
	1	3.3	0.9
	1	2.4	0.9
SHIGA KRUSE.....	1	3.1	0.8
	1	4.2	0.8
HISS.....	1	7.5	1.0

Uit dit tabelletje blijkt duidelijk, dat azijnzuur het hoofdproduct is, terwijl mierenzuur en barnsteenzuur in nagenoeg dezelfde moleculaire hoeveelheden ontstaan.

Dat de hoeveelheid azijnzuur bij HISS circa twee keer zooveel is als bij de beide andere *dysenterie*-soorten, mag niet als een bewijs voor het apart staan van deze bacterie t.o.v. de anderen beschouwd worden.

Tot mijn spijt kon ik — door mijn vervroegd vertrek naar Amerika — geen tweede proef voor HISS inzetten.

Hoe deze resultaten te interpreteeren zijn, zullen wij in het volgende hoofdstuk behandelen.

LITTERATUUR.

1. Zie de *Codex alimentarius* No. 6, blz. 12 en tabel II; Chem. Weekbl. 9, 687 (1912).

HOOFDSTUK VII.

THEORETISCHE BESCHOUWINGEN.

§ 1. *Het chemisme.*

Tracht men aan de hand der verkregen resultaten een beeld te vormen van het chemisme, dat aan de glucose-ontleding door *dysenterie*-bacteriën ten grondslag ligt, dan dient men allereerst met de volgende drie feiten rekening te houden:

1. er wordt geen melkzuur gevormd,
2. er ontwijken geen gasvormige producten,
3. in hoofdzaak wordt azijnzuur gevormd.

Het eerste feit is gemakkelijk te beredeneeren. HARDEN (1) en GREY (2) nemen voor de vorming van het melkzuur een alleenstaande reactie aan:

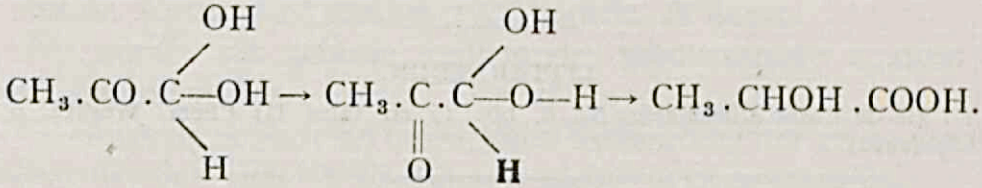
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3 . CHOH . COOH \quad \text{(HARDEN)}$$

en:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_3H_6O_3 \text{ (melkzuur)} + C_3H_6O_3 \text{ (instabiel tusschenproduct) (GREY).}$$

Ook KLUYVER (3), zoowel als DE GRAAFF (4) nemen aan, dat het ontstaan van melkzuur een op zich zelf staande omzetting is.

In aansluiting van GREY laat KLUYVER het melkzuur ontstaan als „Umlagerung" van het methyl glyoxaal (reactie I*a*):



De dikgedrukte H's beteekenen hierbij de door het bacterieprotoplasma geactiveerde waterstof.

Volgens DE GRAAFF moet men in de vorming van het melkzuur zien de stabilisatie van het hypothetische tusschenproduct:

$$C_3H_6O_3 \text{ (hyp. tusschenproduct)} \rightarrow CH_3 . CHOH . COOH.$$

Bij de gisting der *dysenterie*-bacteriën komt dus geen stabilisatie tot melkzuur voor, omdat dit zuur niet onder de dissimalatie-producten wordt gevonden.

De interpretatie van het tweede en derde feit is veel moeilijker.

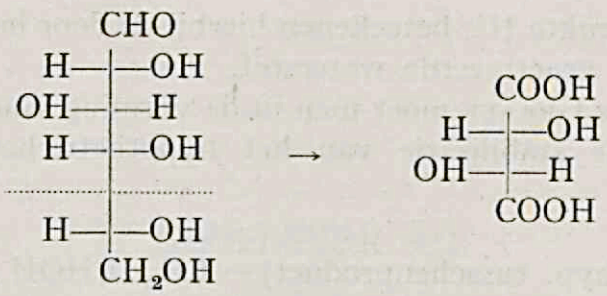
Allereerst dient men te denken aan reacties, waarbij mierenzuur, azijnzuur en barnsteenzuur ontstaan, zonder dat er gasvormige producten gevormd worden. — Hierbij denkt men voornamelijk aan het ontstaan van azijnzuur, dat als hoofdproduct der geheele dissimilatie moet worden beschouwd.

Bij *Bact. coli* kan men aannemen, dat het azijnzuur ontstaat door hydroxydatie van aceetaldehyde, dat zelf weder door decarboxylatie uit het pyrodruivenzuur is gevormd. Doch hierbij ontstaan zoowel CO_2 als H_2. — De decarboxylatie komt dus niet in aanmerking, tenzij men het bestaan van een CO_2-acceptor (b.v. „CO_2-protoplasma") wil accepteeren.

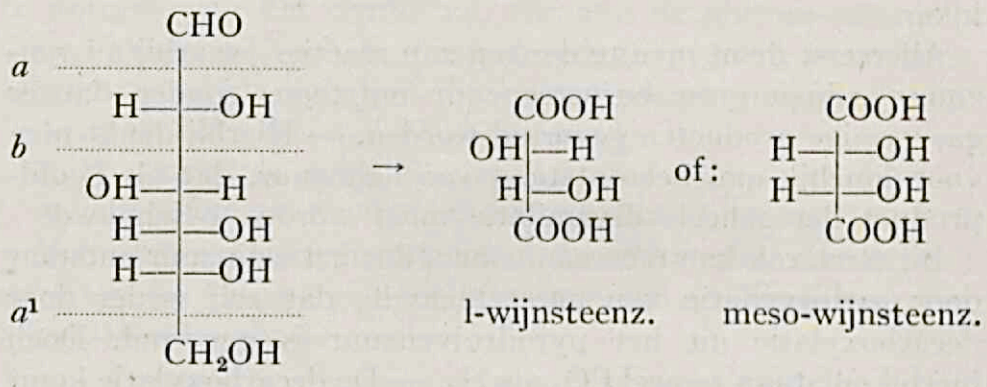
Het feit, dat azijnzuur in zoo'n groote overmaat aanwezig is, doet het vermoeden rijzen, dat er een reactie bestaat, waarbij dit zuur als eenig product ontstaat.

Inderdaad zijn er aanwijzingen voor een dergelijke reactie te vinden. — Immers vindt men onder de oxydatie-producten van glucose o.a. wijnsteenzuur. BÖESEKEN (5) schrijft hiervan:

„Dextro rotary tartarie acid has already been met with long ago among the oxidation products of glucose and keeping in mind the most probable splitting point — given by the dotted line — has been given the annexed configuration. It may be seen, however, that glucose can break up otherwise and so give rise to l-tartaric and meso-tartaric acids."



Voor het ontstaan van l-wijnsteenzuur heeft de splitsing dan plaats volgens de stippellijnen *a* en a^1, en voor het ontstaan van meso-wijnsteenzuur volgens de stippellijn *b*, zooals de volgende voorstelling weergeeft:



Bij het ontstaan van d-wijnsteenzuur vindt de splitsing dus plaats tusschen het 4e en 5e C-atoom (beginnende bij de aldehyde-groep); bij de vorming van meso-wijnsteenzuur splitst het molecule zich op de 2—3-plaats.

Het is dus op grond van deze feiten aannemelijk, dat het glucose-molecule ook tegelijk op de aangeduide plaatsen breken kan, zoodat b.v. drie C_2-groepen ontstaan. — Als vergelijking zouden wij dan kunnen neerschrijven:

$$C_6H_{12}O_6 = 3\ C_2H_4O_2$$

of, waar $C_2H_4O_2$ tevens de empyrische formule voor azijnzuur is:

$$C_6H_{12}O_6 = 3\ CH_3 . COOH.$$

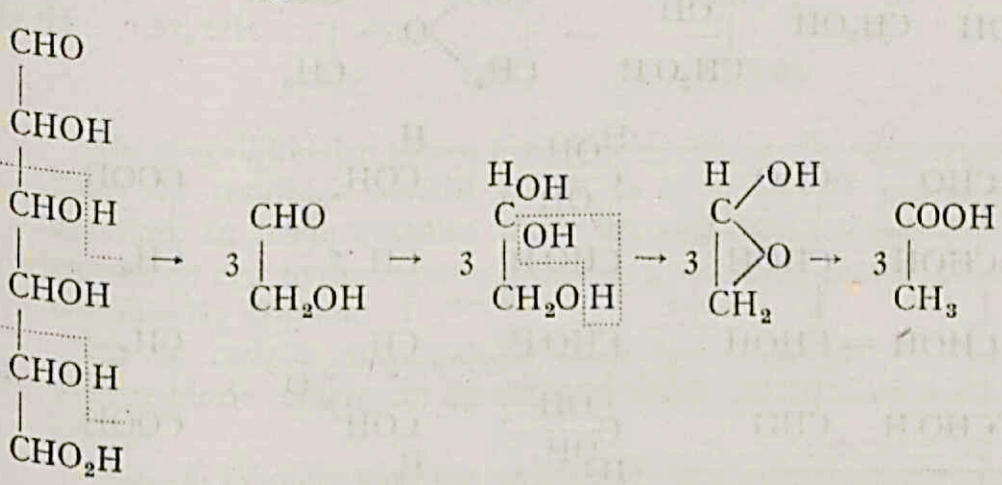
Uit één glucose molecule zouden zoo dan drie moleculen azijnzuur ontstaan.

Ook de hexose-synthese uit formaldehyde (6) steunt deze opvatting.

Immers krijgt men bij deze synthese door vijf achtereenvolgende aldol-condensaties van het formaldehyde het hexose mengsel *formose*, waaruit het α-akrose is geïsoleerd (7) en welk lichaam ook intermediair ontstaat bij de bereiding van glucose door oxydatie van glycerine.

Men kan zich dus voorstellen, dat men hier te maken heeft met het verbreken der aldol-binding op twee plaatsen in het hexose-molecule en een navolgende atoomverschuiving.

De voorstelling wordt dan aldus:

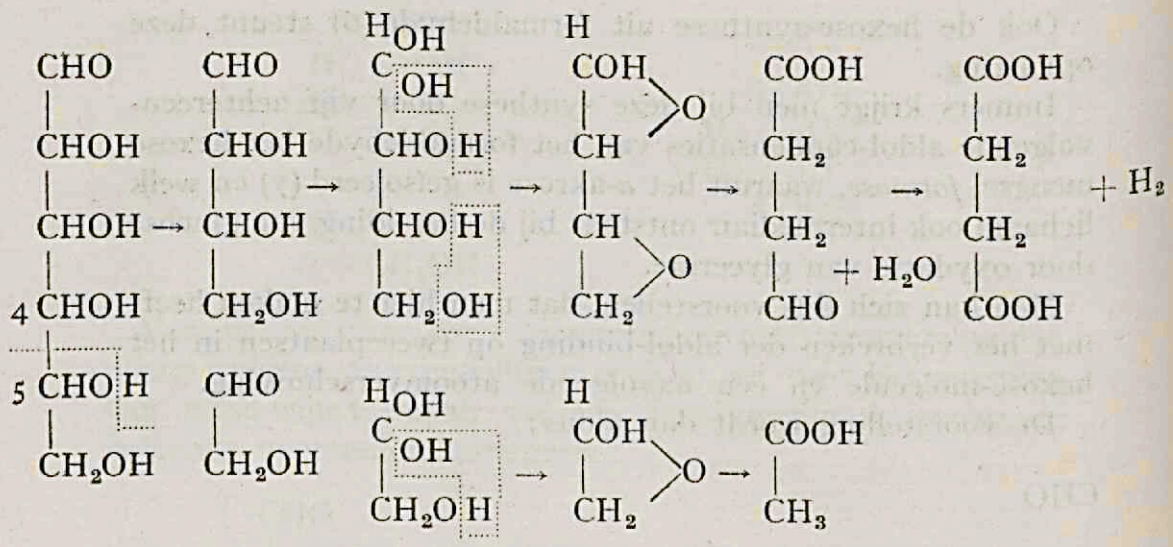


Wij meenen het ontstaan van azijnzuur dus als een voorbeeld van *een splitsing in drieën van het hexose-molecule, in casu glucose*, te mogen aanvaarden.

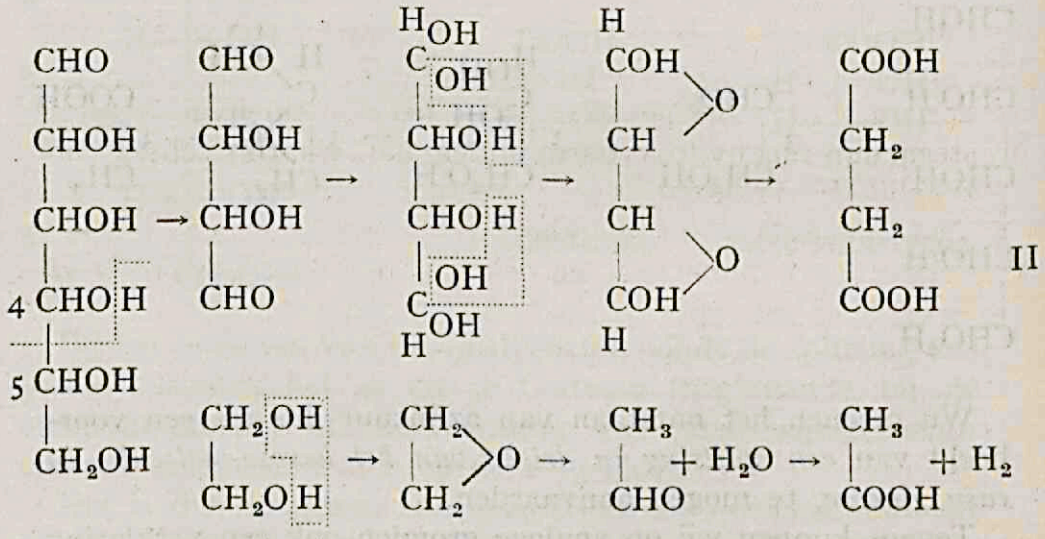
Tevens kunnen wij op analoge gronden ook een verklaring geven voor het ontstaan van barnsteenzuur.

Immers is het niet noodig, dat de splitsingen op de 2—3-plaats en de 4—5-plaats gelijktijdig geschieden. Het glucose-molecule kan ook in één C_2-groep uiteenvallen, juist zooals bij de oxydatieve wijnsteenzuurvorming.

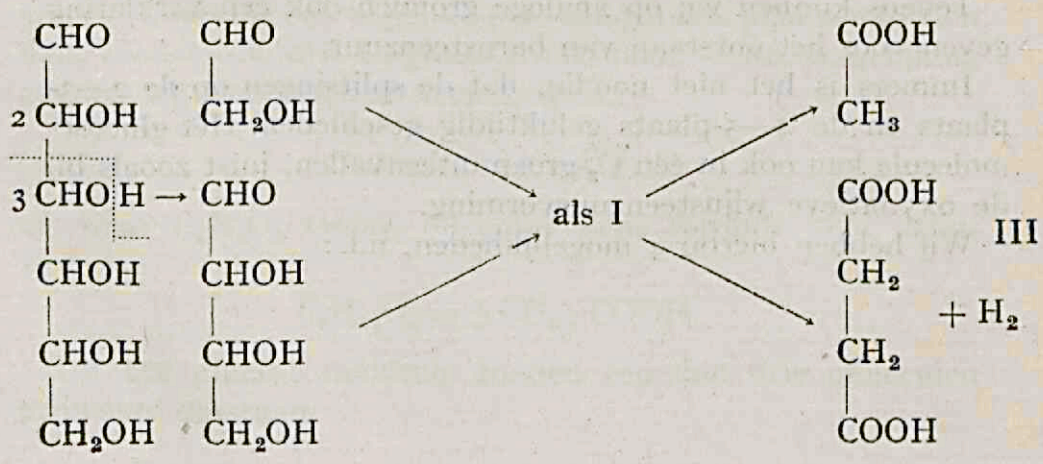
Wij hebben hierbij 4 mogelijkheden, n.l.:



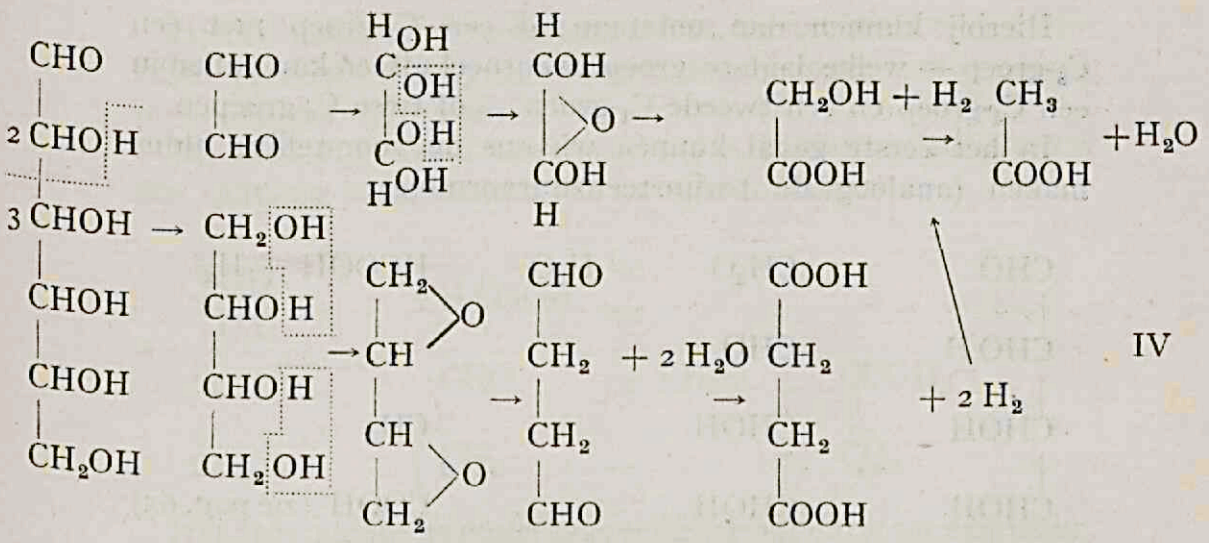
I



II



III



Alle mogelijkheden geven hetzelfde resultaat. De weg, waarlangs dit resultaat bereikt wordt, is bij I en III practisch dezelfde. In beide gevallen moet het monaldehyde van barnsteenzuur een hydroxydatie ondergaan, waarbij echter noodzakelijk H_2 vrijkomt.

Bij de tweede mogelijkheid moet het aceetaldehyde een hydroxydatie ondergaan en ook hier dient H_2 te worden vrijgesteld.

In geval IV ondergaat het dialdehyde van barnsteenzuur een hydroxydatie, waarbij een dubbele hoeveelheid H_2 vrijkomt, waarvan echter direct de helft gebruikt wordt om het oxyazijnzuur te reduceeren. Ook in dit geval kan men aan het ontstaan van eenzelfde hoeveelheid H_2 niet ontkomen.

Trachten wij een empyrische vergelijking op te stellen, dan komen wij tot het volgende resultaat:

$$C_6H_{12}O_6 = \underset{\text{azijnzuur}}{C_2H_4O_2} + \underset{\text{barnsteenzuur}}{C_4H_6O_4} + H_2$$

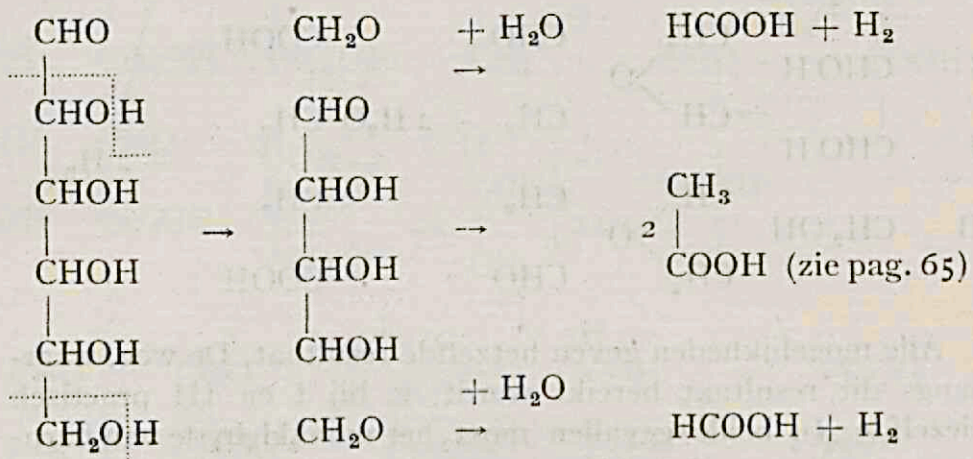
Hoe is nu het ontstaan van het mierenzuur te verklaren?

Dat mierenzuur beschouwd moet worden als het reductieproduct van koolzuur, is onwaarschijnlijk, omdat hier geen CO_2 ontstaat.

Het is beter hier dus aan te nemen een uiteenvallen van het glucose-molecule in groepen, met een oneven aantal C-atomen.

Hierbij kunnen dan ontstaan òf een C_1-groep met een C_5-groep — welke laatste groep eventueel uiteen kan vallen in een C_4-groep en een tweede C_1-groep — òf twee C_3-groepen.

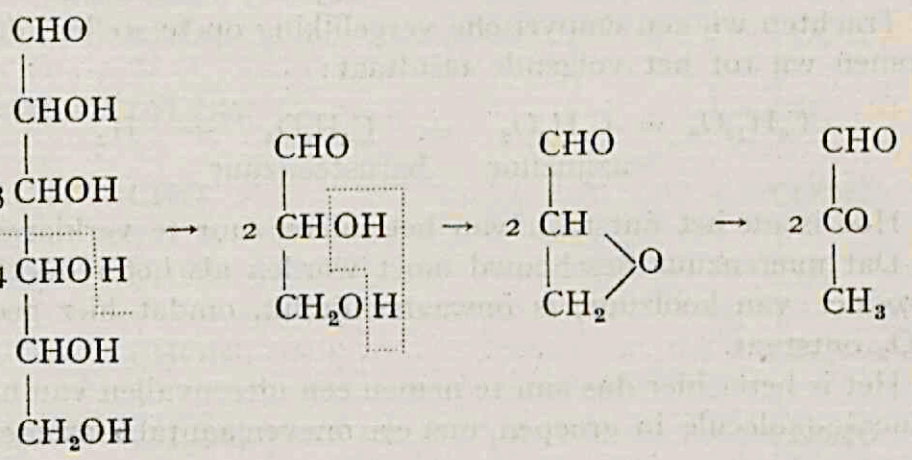
In het eerste geval kunnen wij ons de voorstelling aldus maken (analoog de l-wijnsteenzuurvorming):



Hierbij ontstaan dus intermediair 2 moleculen formaldehyde. Door het feit, dat dit aldehyde niet is aangetoond, verliest deze hypothese aan waarschijnlijkheid.

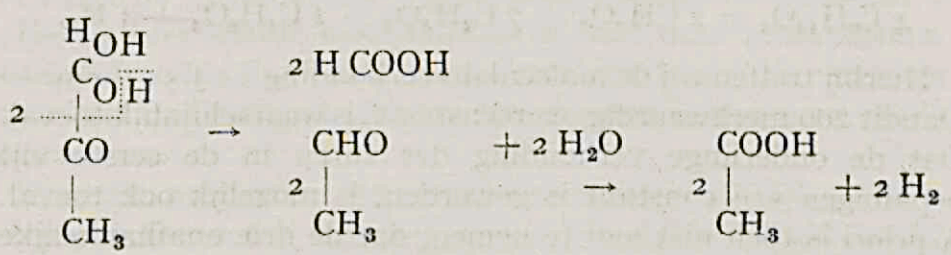
De meest voor de hand liggende verklaring geeft ons hier dus de triose-hypothese, waarbij het hexose-molecule uiteenvalt in twee moleculen $C_3H_6O_3$.

Ook hier is de meest plausibele verklaring, dat de aldolbinding op de 3—4-plaats te loor gaat:



Hierbij ontstaan 2 moleculen triose, bijvoorbeeld twee moleculen glycerine-aldehyde, die gemakkelijk over kunnen gaan in b.v. methylglyoxaal.

Dit methylglyoxaal ondergaat nu in gehydrateerden vorm een splitsing in aceetaldehyde en mierenzuur:



Het aceetaldehyde ondergaat een hydroxydatie tot azijnzuur, m. a. w. ook hier dient H_2 vrij te komen.

De vergelijking voor deze reactie wordt:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O = \underset{\text{mierenzuur}}{2\,CH_2O_2} + \underset{\text{azijnzuur}}{2\,C_2H_4O_2} + 2\,H_2$$

In het kort kan men de dissimilatie van het glucose-molecule dus door drie vergelijkingen weergeven:

I. $C_6H_{12}O_6 = 3\,C_2H_4O_2$.
II. $C_6H_{12}O_6 = C_2H_4O_2 + C_4H_6O_4 + H_2$.
III. $C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O = 2\,C_2H_4O_2 + 2\,CH_2O_2 + 2\,H_2$.

Deze drie reacties loopen *onafhankelijk* van elkaar! Het pyrodruivenzuur is hierbij niet als tusschenproduct noodig, zelfs onwaarschijnlijk, omdat geen CO_2 ontwijkt.

Het aceetaldehyde, dat werd aangetoond, is dan ook niet afkomstig van de carboxylatie, maar ontstaat volgens reactie II en III.

Toch wijst het resultaat van de sulfietgisting van het pyrodruivenzuur in de richting van een decarboxylatie, omdat aceetaldehyde gevonden is. Wij kunnen dan aan de ontleding van pyrodruivenzuur de volgende voorstelling geven, naast de op blz. 42 aangegeven verklaring.

Gaan we tabel 7 (blz. 61) na, en nemen we het gemiddelde

der eerste vijf moleculair-verhoudingen van mierenzuur, azijnzuur en barnsteenzuur, dan krijgen wij:

mierenzuur : azijnzuur : barnsteenzuur = 1 : 3,3 : 1.

Nemen we vergelijking II twee keer en tellen we dan de drie vergelijkingen op, dan ontstaat de summatie-vergelijking:

$$4\ C_6H_{12}O_6 = 2\ CH_2O_2 + 7\ C_2H_4O_2 + 2\ C_4H_6O_4 + 4\ H_2.$$

Hierbij treffen wij de moleculair-verhouding 1 : 3,5 : 1 aan. — Dat dit zoo merkwaardig overeenstemt, is waarschijnlijk toeval. Dat de onderlinge verhouding der zuren in de eerste vijf bepalingen vrij constant is geworden, is mogelijk ook toeval. A priori is toch niet aan te nemen, dat de drie onafhankelijke reacties steeds weer met eenzelfde intensiteit ten opzichte van elkaar verloopen. Dit verklaart het feit, dat SERA (8) steeds azijnzuur en mierenzuur vond in wisselende hoeveelheden. Over het algemeen is de verhouding zeer variabel.

De verhouding, die hier gevonden is, mag dan ook niet zonder meer als constant worden aangenomen. Ook de summatie-vergelijking mag men niet aannemen als een uitbeelding van een constante gang van zaken.

Voorloopig stellen wij ons tevreden met op te merken, dat men hier hoogstwaarschijnlijk te maken heeft met drie naast elkaar loopende reacties, die ieder hun eigen producten leveren.

Eén ding rest ons nog te bespreken, en dat is het ontstaan van waterstof, terwijl dit product niet gasvormig ontwijkt en dus niet onder de dissimilatie-producten is gevonden.

Toch is het niet mogelijk, vergelijkingen op te stellen, zonder een hydroxydatie. Deze noodzakelijkheid van het optreden van hydroxydaties dwingt tot het aanvaarden van het ontstaan van waterstof. Maar dan moet ook een waterstof-acceptor aanwezig zijn, aangezien dit gas niet als zoodanig ontwijkt.

Het voorkomen van aethylalcohol wijst in de richting van het aceetaldehyde.

Doch deze verklaring is onvoldoende, om de totale hoeveelheid volgens de vergelijkingen gevormde waterstof vast te leggen.

Ook de oplosbaarheid van de waterstof in het vloeibare substraat kan ons slechts ten deele helpen.

Het protoplasma-waterstof van KLUYVER is slechts een voorbijgaande verbinding. Immers treedt het protoplasma volgens KLUYVER op als waterstof-*overdrager*, als katalysator, die slechts *tijdelijk* de waterstof uit een substraat-molecule los maakt, er min of meer een verbinding mede aangaat, om even daarna de waterstof ergens anders weder los te laten.

Het is hier echter niet uitgesloten, dat deze protoplasma-waterstof-verbinding van meer stabielen aard is, dat de capaciteit van het protoplasma hier grooter is, dan men zoude verwachten.

Mogelijk ook gaat het protoplasma gemakkelijk in een gehydreerden vorm over, waardoor de groeisnelheid onder anaëroobe omstandigheid belemmerd wordt. Onder *aëroobe* omstandigheden immers vindt de waterstof in den zuurstof der atmospheer een krachtigen acceptor. Misschien, dat hierin een verklaring te vinden is voor het verschil in groeisnelheid in aëroob en in anaëroob milieu (zie § 2). Het is immers niet in te denken, dat het levend protoplasma kan worden gehydreerd, zonder dat dit schadelijk voor het leven van het organisme zoude zijn.

Hoe het zij, een afdoende verklaring voor het niet-ontwijken van waterstof kunnen wij vooralsnog niet geven.

Het is echter een feit, dat de reacties II en III *oxydatief* zijn, dat er dus een oxydeerend agens aanwezig moet mogelijk ook zijn buiten de aanwezige hexose-moleculen en buiten de moleculen der reactieproducten, aangezien tegenover de gevormde zuren geen voldoende hoeveelheid reductieproducten aanwezig is.

§ 2. *Slotbeschouwingen.*

Het is niet de bedoeling, aan het einde een algemeen overzicht te geven van de gedragingen der onderzochte bacteriën.

Er zijn ons echter enkele feiten opgevallen, die een nadere bespreking waard zijn.

In het algemeen hebben wij meenen te constateeren, dat de onderzochte bacteriën beter schijnen te groeien in *aërobe* omgeving.

Het verschil in groeisnelheid bij aërobe en anaërobe om-

standigheden, valt bij *Bact. coli* vrijwel weg. Door alle proeven heen, bleek dit organisme zich het gemakkelijkst aan verschillende uitwendige omstandigheden te kunnen aanpassen.

Het sterkst trad het verschil op bij *Bact. typhi* en *Bact. dysenteriae* SHIGA KRUSE, dan volgde *Bact. paratyphi A*, de anderen naderen min of meer het *coli*-type.

Bact. paratyphi A staat in dit opzicht het dichtst bij *Bact. typhi*, terwijl het B-type meer op *coli* lijkt. *Bact. dys.* HISS en FLEXNER gedragen zich vrijwel gelijk.

In het algemeen blijft het SHIGA KRUSE-type, zoowel als *Bact. typhi* in groei achter bij de andere bacterie-soorten; dit blijkt o.a. voor *Bact. dys.* SHIGA KRUSE uit de quantitatieve bepalingen.

Dit verschijnsel vinden wij terug bij de sulfietgisting (blz. 36), bij de vergisting van pyrodruivenzuur (blz. 40), bij de sulfietgisting van het pyrodruivenzuur (blz. 43) en ook bij de ontleding van het natriumformiaat.

Bact. paratyphi A geeft sterk den indruk meer aan den kant van *Bact. typhi* te staan, terwijl het B-type in zijn eigenschappen meer met *Bact. coli* overeenkomt.

Bij de *dysenterie*-bacteriën is er vrijwel geen verschil tusschen het FLEXNER-type en het HISS-type. Mogelijk wordt pyrodruivenzuur door *Bact. dys.* FLEXNER beter ontleed, dan door het HISS-type, doch of dit een stabiel verschil is, is niet waarschijnlijk.

Uit dit alles krijgt men den indruk, dat *Bact. typhi* en *Bact. dys.* SHIGA KRUSE en ook *Bact. paratyphi A* de meest kieskeurige bacteriën zijn, met het kleinste vermogen, zich aan veranderingen van uitwendige omstandigheden aan te passen.

Tevens zijn deze organismen ook de werkelijk pathogene kiemen, terwijl de anderen veelal met den naam „pseudo" betiteld worden.

Wanneer we nog eens tabel 3 (blz. 28) bekijken, dan blijkt duidelijk, dat men bij *Bact. coli*, *Bact. parat. A en B* en bij *Bact. typhi* te maken heeft met de zuivere gemengd-zure gisting, waarbij als zuren optreden: mierenzuur, azijnzuur, barnsteenzuur en melkzuur.

Bij de *dysenterie*-bacteriën missen wij het melkzuur, terwijl het azijnzuur sterk op den voorgrond treedt (Hoofdstuk VI). Dit wijst op een andere biochemische ontleding van het glucose-molecule. Zijn de eerstgenoemden — en in het bijzonder *Bact. coli* — min of meer te beschouwen als melkzuurvormers, bij de *dysenterie*-bacteriën komt ongetwijfeld de azijnzure-gisting op den voorgrond.

Wel is waar hebben deze laatsten het niet-ontwijken van gasvormige producten met *Bact. typhi* gemeen, doch dit is van ondergeschikt belang, daar voor het ontstaan of wegblijven van CO_2 en H_2 verklaringen mogelijk zijn, die min of meer bezijden de groote lijn der eigenlijke gemengd-zure gisting staan.

Op grond van onze beschouwingen, in § 1 van dit hoofdstuk neergeschreven, meenen wij te mogen aannemen, dat men hier te maken heeft met een fermentatieve dissimilatie, die belangrijk verschilt van die, van het *coli*-type.

Hier komt bij, dat we vanaf *Bact. typhi* overgaan in een gebied van bacteriën, zonder eigenbeweging.

Dit verschil heeft echter slechts betrekkelijke waarde, daar het geen ongewoon verschijnsel is, dat een bacterie zijn eigenbeweging verliezen kan en in deze beweginloosheid zekeren tijd kan volharden.

In dit verband citeeren wij wat HEIM (9) schrijft:

„Die Eigenbewegung kann unter gewissen Ernährungs- und Wärmeverhältnissen Einbusze erleiden. Bei sehr niedrigen Temperaturen erlischt sie durch Kältestarre, bei hohen von 49 bis 55°, manchmal schon darunter, werden die Geiszeln geschädigt, so dasz die Bewegung auch nach der Abkühlung nicht wiederkehrt, obwohl die Bakterien noch leben. Mitunter sind die Wärmegrenzen für die Beweglichkeit noch enger; so berichteten C. GÜNTHER und TH. MIRONESCO von einem *typhusähnlichen* Stäbchen, das nur bei 23° und darunter Bewegung zeigte, bei 38° *aber nicht mehr* und dann *auch keine Geiszeln* mehr hatte (HR. 99. 961)[1]" .... en even verder: „Bei langer Fortzüchtung scheinen mache Arten Einbusze an Eigenbewegung und Geiszelbildung zu erleiden, wenigstens

[1]) HR. = Hygienische Rundschau.

berichten K. B. LEHMANN und R. O. NEUMANN das von *Micr. agilis ruber* und *citreus* (AfH. 34. 119) [2]). Verschiedene Untersucher sahen *Geiszelverlust bei Koli-, Typhus-, Proteusbakterien* und Anaerobiern nach Züchtung in oder auf karbolhaltigen oder nährstoffarmen Nährmitteln (Proteus) oder inaktiviertem Blutserum (B. typhi)."

Hieruit blijkt, dat het inderdaad mogelijk is een organisme van zijn beweging te ontdoen. Deze verandering blijft echter meestal van tijdelijken aard. Of nu een in wezen beweeglijk organisme in staat is *permanent* zonder ciliën en zonder eigenbeweging voor te komen, is een open vraag.

Het blijft nochtans mogelijk, dat de *dysenterie*-bacteriën oorspronkelijk een voorvorm met eigenbeweging hebben bezeten. Het omgekeerde, n.l. dat de *dysenterie*-bacteriën *in wezen* onbeweeglijk zijn, doch tot beweeglijke organismen zijn te maken, is hoogst waarschijnlijk, aangezien men iets dergelijks nog nooit bij bacteriën heeft gezien.

Prof. KLUYVER heeft mij er op attent gemaakt, dat de echte *dysenterie*-bacteriën, n.l. het SHIGA KRUSE-type geen katalase bezit. KNORR (10) en anderen (11) gebruiken dit feit om echte *dysenterie*-bacteriën te onderscheiden van de „pseudo"-*dysenterie*-organismen.

Voegen we dit feit bij de twee bovenbehandelden (afwijkend chemisme en onbeweeglijkheid), dan wordt het waarschijnlijk, dat we de *dysenterie*-bacteriën feitelijk *buiten* de groep der *coli-typhus*-organismen moeten brengen in een aparte, zelfstandige, min of meer verwante groep. De „pseudo"-*dysenterie*-bacteriën (het FLEXNER- en HISS-type b.v.) kunnen dan tot op zekere hoogte als overgangsvormen worden beschouwd.

---

[2]) AfH. = Archiv für Hygiene.

LITTERATUUR.

1. A. HARDEN, Journ. Chem. Soc. *79*, 610 (1901).
   A. HARDEN—D. NORRIS, Proc. Roy. Soc. B. *84*, 492 (1912).
2. E. C. GREY, Proc. Roy. Soc. B. *87*, 461 (1914); idem *91*, 294 (1919).
3. A. J. KLUYVER—H. J. L. DONKER, Versl. Kon. Ac. v. Wetensch. *33*, 415 (1924); Zeitschr. d. Zelle und Gew. XIII, Heft I, 134 (1926).
4. W. C. DE GRAAFF, Tijdschr. v. Hyg., Microb. en Ser. I, 43 (1926).
5. J. BÖESEKEN, The configuration of the Saccharides I, blz. 38 (1923).
6. Zie: JULIUS SCHMIDT, Kurzes Lehrbuch d. Org. Chemie, blz. 290 (1920).
7. Vergel. H. EULER—A. EULER, Ber. *39*, 39 en 45 (1906).
8. Y. SERA, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. *66*, 141 (1910).
9. L. HEIM, Lehrbuch d. Bakteriologie, blz. 210 (1922).
10. M. KNORR, Müncher. Med. Wochenschr. *46*, 1381 en 1382 (1923).
11. Zie: K. B. LEHMANN—R. O. NEUMANN, Bakteriologie, blz. 449 (1927).

SUMMARY.

1. Principally experiments have been done to study the chemism of the dissimilation by means of *dysentery* bacteria, especially *Bact. dysenteriae* SHIGA KRUSE, FLEXNER and HISS.

2. In case of the dissimilation of glucose by means of *dysentery*-bacteria lactic acid was not found among the dissimilation products — quite in contradiction with a possitif result by *Bact. coli*, *Bact. typhi* and *Bact. paratyphi A and B*.

In aërob as well as in anaërob circumstances the dissimilation products were qualitatively the same.

3. In case of decomposition in presence of Na_2SO_3 acetaldehyde was always found.

4. No gaseous products were found by dissimilation of pyruvic acid by means of *dysentery*-bacteria. — In stead of these formic and acetic acid were always found.

5. By the decomposition of pyrivic acid in presence of Na_2SO_3 by means of *dysentery*-bacteria the quantities of acetaldehyde found were very small in comparison with the quantities found by *Bact. coli* and *Bact. paratyphi A and B*.

6. *Bact. coli*, *Bact. parat. A and B* are able to decompose sodium formiate by forming of CO_2 and H_2. — *Dysentery*-bacteria dont form these gases at cost of sodium formiate.

7. By the quantitative analyse of the dissimilation products there was found rather a constant ratio between the quantities of the different acids, namely:

formic acid : acetic acid : succinic acid = 1 : 3,3 : 1.

So acetic acid seems to be the main product.

All quantitative experiments are done in strict anaërob circumstances.

8. To explain this chemism it was proposed that there are three different reactions; these reactions take place independantly the one from the other:

1. $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3\,C_2H_4O_2$
acetic acid.

2. $C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_2H_4O_2 + C_4H_6O_4 + H_2$
acetic acid succinic acid.

3. $C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,C_2H_4O_2 + 2\,CH_2O_2 + 2\,H_2$
acetic acid formic acid.

Pyruvic acid seems not to be an intermediate product.

9. All above mentioned acids are oxidation products. So it is not to be avoided that H_2 is liberated notwithstanding the fact, that this gas does not escape in gaseous state.

Aceetaldehyde is to be considered as a hydrogen acceptor. — Bisides it must be accepted that there exist an oxydative agens which is able to fix the H_2.

10. Lastly it is suggested to collect the *dysentery*-bacteria in one group apart, separated from that of the *coli-typhus*-organisms.

STELLINGEN.

I.

De *dysenterie*-bacteriën behooren tot een aparte groep, buiten die der *coli-typhus*-organismen, te worden vereenigd.

II.

Bij de systematiek der bacteriën dient men — buiten de morphologische en culturieële verschillen — slechts te letten op de *qualitatieve* verschillen in de biochemische eigenschappen.

III.

Wenschelijk is het, dat de individueele variabiliteit in de resistentie van sporen en vegetatieve vormen tegen hooge temperatuur, systematisch worde onderzocht, waarbij men steeds éénzelfde substraat en éénzelfde drogingsmethode als „standaard" moet gebruiken.

Zie o.a.: v. WAHL, Centr. f. Bakt., Abt. II *16*, 489 (1906).
E. VOGEL, Cent. f. Bakt., Abt. II *58*, 66 (1923); idem *59*, 55 (1923); idem *61*, 323 (1924).

IV.

Het feit, dat schimmelhyphen in staat zijn van binnen uit door de lenticellen naar buiten te treden, mag niet als bewijs worden aangevoerd, dat lenticellen als infectiepoorten moeten worden beschouwd.

T. W. NEGER, Ber. Bot. Ges. *40*, 310 (1922).
C. v. DILLEWIJN, Diss. Utrecht 1927, verdediging stelling XV.

V.

E. G. PRINGSHEIM en F. MAINX hebben tot dusver nog geen verband aangetoond tusschen de chemotactische werking en de chemische structuur der gebruikte organische stoffen.

PLANTA 1, 583 (1926).

VI.

J. STOKLASA heeft niet bewezen, dat chilisalpeter van vulkanischen oorsprong is.

Chem. Zeit. *48*, 4 en 949 (1924).

VII.

A. W. PORTER en J. J. HEDGES hebben zich er niet voldoende van overtuigd, dat het „uitzakkings"-evenwicht was bereikt.

Trans. Far. Soc. *18*, 91 (1922).

VIII.

De verklaring, die D. HAEHNEL geeft voor het somtijds voorkomen van loodchloride resp. loodsulphaat onder de corrosie-producten bij chemische corrosie van looden leidingen, is onvoldoende.

Korrosion und Metallschutz *3*, 145 (1927).

IX.

Bij het bestudeeren van de corrosie-problemen, wordt te weinig rekening gehouden met de colloïd-chemische corrosie-theorie van FRIEND.

Korr. u. Metallsch. *3*, 73 (1927); J. Inst. Metals *31*, 177 (1924); idem *33*, 19 (1925).

X.

De verticale kamerovens (systeem DESSAUER) zijn bij het klein en middelmatig gasbedrijf te verkiezen boven de generatorovens met horizontale of met schuine retorten (syst. COZE).

XI.

Het is van persoonlijk en maatschappelijk belang, om bij de factoren, die de keuze van een studierichting aan de universiteiten bepalen, ook het resultaat van een psychologisch onderzoek te voegen.

XII.

Het zoude zeer wenschelijk zijn, indien den candidaten in de Chemie aan de Rijks-Universiteit te Utrecht meer gelegenheid werd gegeven, eenigen tijd in de chemische groot-industrie werkzaam te zijn. Deze werktijd zou dan als een „technisch-chemisch practicum" door de Faculteit moeten worden geaccepteerd.