

# SPLITSING VAN HIPPUURZURE ZOUTEN DOOR MICROBEN.

DOOR

DR. N. GOSLINGS.

---

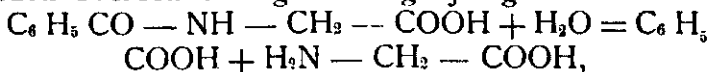
Onder de verbindingen, die dagelijks met de urine het lichaam van de planteneters verlaten, spelen de hippuurzuren zouten, wat de hoeveelheid betreft waarin ze voorkomen, eene zeer voorname rol. Na het ureum zijn de hippuurzuren zouten de belangrijkste stikstofverbindingen der urine en dagelijks worden hiermee groote hoeveelheden geloosd en in den bodem gebracht. Deze groote hoeveelheden van niet assimileerbare verbindingen zouden voor de plant verloren gaan, waren er niet microben, die in staat zijn deze verbindingen af te breken en over te voeren in ammoniak — en nitraatstikstof.

Het is niet te verwonderen, dat de aandacht van menig onderzoeker reeds op deze belangrijke groep van verbindingen gevallen is, en we vinden in de literatuur dan ook gewag gemaakt van enkele onderzoekingen, die op dit gebied verricht zijn. Toch stemmen het aantal onderzoekingen zoomin als de resultaten, (die voor 't grootste gedeelte onvolledig zijn), overeen met de belangrijkheid van deze groep van verbindingen, zoo gewichtig voor den landbouw.

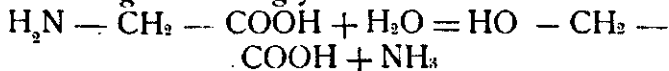
Van Tieghem publiceerde in het jaar 1864 de resultaten van zijn onderzoek over de ontleding van het hippuurzuur in de urine van planteneters, en vond, dat bij deze ontleding bacteriën in het spel zijn en wel de zelfde, die de ontleding van het ureum bewerkstelligen. De bacteriën, die zich als een bezinksel op den bodem van de in gisting verkeerende urine afzetten, entte hij over in een kunst-

matigen voedingsbodem, die uit gistwater bestond met of zonder toevoeging van suiker, waaraan bovendien nog 1,5 % hippuurzure ammoniak toegevoegd was. Eenige dagen daarna vond hij, dat het hippuurzure zout verdwenen was en er benzoëzuur voor was opgetreden. Crisatulli kwam evenals van Tieghem tot het zelfde resultaat, dat er ureumbacteriën bij in het spel zijn, terwijl Sestini vond, dat de bacteriën van de urinezuur-ontleding debet waren aan de decompositie van de hippuurzuurverbindingen. Wanneer we verder nog gewag maken van de dissertatie van Schellmann, dan hebben we daarmee een overzicht gegeven van de voornaamste literatuur, die op dat gebied bestaat. Schellmann isoleerde uit urine, die in ammoniakgisting verkeerde, 28 verschillende bacteriesoorten, die alle in staat zijn hippuurzuur af te breken, en beschrijft daarvan vijf nauwkeurig, zonder echter na te gaan onder welke voorwaarden, en volgens welke vergelijking die omzetting plaats vindt.

Het biologisch proces volgens het welk de omzetting van de hippuurzure zouten plaats vindt, is dus trots de onderzoekingen, die verricht zijn, nog zeer onvolledig bekend, en het scheen mij niet van belang ontbloomt, deze omzetting nader te bestudeeren. Is de splitsing der hippuurzure zouten, die door de verschillende hippuurzuurbacteriën te voorschijn wordt geroepen, enkel eene hydrolytische, waarbij als eindproducten glycol en benzoëzuur optreden overeenkomstig de vergelijking



of wordt het gevormde glycol verder ontleed



en is als zoodanig in de cultuurvloeistof dus niet aan te toonen. Zijn bij deze omzettingen dezelfde microben in het spel als bij die van het ureum en het urinezuur, zooals door de bovenvermelde onderzoekers wordt beweerd, of is het eene op zich zelf staande groep van organismen, die voor hun levensonderhoud alleen zijn aangewezen op de hippuraten.

Om tot de oplossing dezer vragen te geraken, scheen mij de methode van de ophoopingsproeven, zooals die

toegepast wordt door Beyerinck, de meest gewenschte. Men verkrijgt door die z.g. ophoopingmethode een juisten blik in de rol, die de verschillende hippuurzuursplitters in de natuur vervullen en kan door doelmatig gekozen voedingsbodems dié microben op den voorgrond brengen, die de eigenschap van deze ontleding het sterkst vertoonen. Als infectiemateriaal werd in ontleding verkeerende urine van paarden en koeien genomen, omdat dit materiaal de microben bevat, die de spontane omzettingen in de urine te weeg brengen en waaronder door het hippuurzuur gehalte de ontleders van deze verbinding dus te verwachten zijn.

Echter gelukte het mij ook vertegenwoordigers van deze zoo belangrijke groep uit den bodem en uit grachtwater te isoleeren. De ophoopingproeven, die ik met deze stoffen als entmateriaal verrichtte, voerden echter niet altijd tot dezelfde microben als bij paardenmest, maar ik verkreeg af en toe geheel andere soorten. Zoo kreeg ik bij de ontleding van hippuraten in tegenwoordigheid van peptonen uit grachtwater bij 37° enkele malen de *Bacillus pyoceaneus* op den voorgrond, terwijl andere proeven weer voerden tot dezelfde microbensoort als bij mest.

#### ONTLEDING VAN HIPPURATEN IN TEGENWOORDIGHEID VAN EIWITTEN.

Wanneer men vleeschwater, waarin 2 % hippuurzuren natrium of ammonium is opgelost, ent met een enkelen druppel gier, zal binnen 24 uur troebeling en ammoniakontwikkeling (ammoniakontwikkeling is zwak) optreden, en bij microscopische beschouwing zal al naar de temperatuur waarbij men gekweekt heeft, de microbenflora blijken te bestaan uit eene lange staaf of een op een microkok gelijkend kortstaafje. Kiest men voor de ophooping 37°, dan zal de ruwcultuur reeds practisch eene reïncultuur zijn van de lange, slanke, staafvormige bacterie, terwijl bij 20° na een paar overentingen, een kortstaafje nagenoeg in reïncultuur aanwezig is. Bij zwakke verwarming van de ruwcultuur wordt ammoniak ontwikkeld, wat aangetoond werd met een vochtig gemaakt rood lakmoespapiertje, alsmede door den reuk.

De reïnculturen bleken deze eigenschap van ammoniak

vrij te maken eveneens te bezitten, die bij 37° C. geïsoleerd sterker dan de bij 22° geïsoleerde stam. Zoo werd in 10 c. c. eener 2 % natriumhippuraat oplossing in vleeschwater in 2 dagen bij 37° zooveel ammoniak ontwikkeld als overeenkomt met 3,1 c. c.  $\frac{n}{10}$  zuur, terwijl bij 22° in

het zelfde tijdsverloop slechts 0.9 c. c.  $\frac{n}{10}$  zuur werd getitreerd. Dat deze ammoniak werkelijk uit het hippuurzure zout stamt en niet uit de eiwitten van het vleeschwater, kan worden aangetoond door de reïnculturen te enten in vleeschwater, waarin geen hippuraat is opgelost. Hierin vindt wel groei, maar geen ammoniakontwikkeling plaats. Nog in een ander opzicht verschilt het verloop der reactie bij de twee bovengenoemde temperaturen. Terwijl bij 22° als tusschenphase het glyocol zeer duidelijk is aan te toonen en in oude culturen in hoeveelheid toeneemt, is het glyocol in de cultuur van 37° niet aan te toonen. De twee fasen:

Hippuurzuur + water = glyocol + benzoëzuur.

Glyocol + water = ammoniak + glycolzuur

schijnen dus bij 37° even snel te verlopen, waardoor het glyocol ontleed wordt in de mate dat het gevormd wordt en dus niet is aan te toonen. Bij de cultuur van 22° verloopt de eerste phase sneller dan de tweede, waardoor de cultuur relatief rijker wordt aan glyocol. In de cultuur van 37° is dus de hoeveelheid ammoniak een maatstaf voor de hoeveelheid ontleed natrium hippuraat, en in het bovenvermelde geval, waar 10 c. c. cultuurvloeistof 3.1 c. c.  $\frac{n}{10}$  zuur titreerden, is 31.15 % van het hippuraat ontleed.

Als tweede splitsingsproduct van het hippuurzure zout treedt benzoëzuur op, dat zich als benzoaat in oplossing bevindt, aangezien de reactie alcalisch is. De hoeveelheid gevormd benzoëzuur is eveneens uit het ammoniakgehalte af te leiden, en in het bovenvermelde geval waar 10 c. c.

3,1 c. c.  $\frac{n}{10}$  zuur titreeren, bedraagt het gehalte aan benzoëzuur 38 m.gr., wanneer althans de microben die verbinding intact gelaten hebben. Om nu het gehalte aan

benzoaat te bepalen, heb ik geen gebruik kunnen maken van de vluchtigheid van het vrije benzoëzuur met waterdamp, immers het aan de vloeistof toe te voegen mineraalzuur zou aanleiding geven tot ontleding van het hippuurzuur en het ontstaan van benzoëzuur. Ook het opsporen van het benzoëzuur langs micro-chemischen weg stuitte op groote moeilijkheden, aangezien het gelijktijdig aanwezige hippuurzuur belemmerend werkt op het aantoonen van kleine hoeveelheden benzoëzuur. Ik heb daarom gebruik gemaakt van de methode van von Genersich tot het opsporen van benzoëzuur in voedingsmiddelen en de quantitative bepaling er van, eene methode, die door van der Laan en Tydens beschreven werd in het chemisch weekblad (1910, N<sup>o</sup>. 27 p.g. 603). Die methode berust op de oplosbaarheid van benzoëzuur in benzol. In het perforatie toestel van van Ledden Hulsebosch werd eene bekende hoeveelheid cultuurvloeistof, na sterk aangezuurd te zijn met verdund zwavelzuur, gedurende 5 uur geperforeerd met benzol. Aangezien ook eenige andere zuren door benzol geëxtraheerd worden, die bij aanwezigheid de bepaling van benzoëzuur onnauwkeurig zouden doen maken, heb ik mij vooraf overtuigd, dat hippuurzuur niet oplosbaar was in benzol, wat werkelijk het geval bleek te zijn. Ik kan dus van deze methode gebruik maken om benzoëzuur te bepalen in oplossingen, die naast benzoaat hippuraat bevatten.

Ik heb de culturen van 37<sup>o</sup> nu nader onderzocht op hun gehalte aan benzoaat, aangezien de optimumtemperatuur van de hippuurzuursplitsing dichter bij 37<sup>o</sup> dan bij 20<sup>o</sup> scheen te liggen. Hiertoe stond mij ten dienste eene cultuur van 6 dagen oud, die per 100 c.c. cultuurvloeistof 98,6 m.gr. ammoniak bevatte, die dus gevormd zijn door ontleding van 1165.5 m. gr. hippuurzure natrium. Tevens moet door splitsing van die hoeveelheid hippuurzure natrium in de vloeistof ontstaan zijn 707.9 m. gr. benzoëzuur als oplosbaar benzoaat. Ik heb nu volgens de bovenbeschreven methode het gehalte aan benzoaat door aanzuring en extractie met benzol bepaald en gevonden, dat op 100 c.c. slechts aanwezig was 102.4 m.gr. benzoëzuur of 14.5 % van de theoretische hoeveelheid; 85.5 % is dus door de microben tot verdwijnen gebracht.

Van eene tweede cultuur, eveneens bij 37<sup>o</sup>, bedroeg de

hoeveelheid gevormde ammoniak per 100 c.c. cultuurvloeistof 52.7 m.gr., wat overeenkomt met eene ontleding van 622.9 m.gr. natriumhippuraat en eene vorming van 378.4 m.gr. benzoëzuur als benzoaat. Bij analijse konden echter slechts 98.8 m.gr. benzoëzuur gevonden worden of 26,1 % van de theoretische hoeveelheid. In dit geval zijn dus 73.9 % door de microben ontleed.

Aangezien de beide hippuraatontledende microbensoorten dit molecule afbreken tot ammoniak, is het te verwachten, dat ze ook direct het glyocol zullen afbreken tot ammoniak. Inderdaad gebeurt dit ook; vleeschwaterglyocol geënt met reïnculturen van de beide microbensoorten geeft binnen 24 uur eene zeer duidelijke ammoniakontwikkeling. Toch voeren de ophoopingsproeven, die direct met vleeschwaterglyocol worden aangezet met gier als entmatereaal, tot geheel andere microbensoorten dan met hippuraten. Ook de concentraties, waarin beide verbindingen worden ontleed, loopen zeer uiteen. Terwijl hippuurzuren natrium nog in eene oplossing van 12 % wordt ontleed, is de grens van de glyocolontleding bij eene concentratie van 2 % bereikt. In vleeschwater waaraan 2 % glyocol is toegevoegd, vindt nog slechts zeer geringe groei plaats.

Ook het benzoaat blijkt uit mijn proeven eene stof te zijn, die door de microben kan worden opgenomen en wel uit oplossingen, die ten hoogste  $1\frac{1}{2}$  % van deze stof bevatten. De zouten van benzoëzuur schijnen dus lang zoo conserveerend niet te werken als het vrije zuur zelf.

Van andere stikstofverbindingen, die ik ten opzichte van deze microben onderzocht, wordt het ureum slechts in zeer geringe mate ontleed door den bij 22° geïsoleerden stam; de bij 37° geïsoleerde stam maakt uit ureum geen ammoniak vrij. Dit ureumsplitsend vermogen van bacteriën kan zeer mooi worden aangetoond door de methode van Beyerinck met behulp van gistwater-ureum-gelatineplaten. Het gistwater moet daartoe geconcentreerd zijn (te bereiden door extractie van 20 gram gist met 100 c.c. water) en behalve gelatine nog 2 à 3 % ureum bevatten. De ureumsplitsende microben brengen in zeer korten tijd een iriseerend veld, veroorzaakt door een uiterst fijn neerslag van calciumphosphaat en calciumcarbonaat te voorschijn, terwijl de niet ureumsplitsers dit niet doen.

Nitraten werden door geen der beide microbensoorten ontleed in stikstof of gasvormige stikstof-zuurstofverbindingen. Echter zijn beide in staat nitraten tot nitrieten te reduceeren.

Onder anaerobe voorwaarden heb ik in vleeschwater geen ontleding van hippuraat kunnen te voorschijn roepen. Proeven daartoe aangezet, eindigden met eene rotting van de eiwitstoffen.

De isolatie van de beide microbensoorten geschiedde op vleeschwatergelatineplaten, waarop beide als karakteristieke kolonies groeien. De sterkst hippuurzuursplitsende microbe, de bij 37° geïsoleerde, die ik *Bacillus hippuricus* wil noemen, doet in zijn groei het meest aan de kolonies van *B. Zopfii* denken, maar is daarvan te onderscheiden door de grootte zijner kolonies, die alle beduidend kleiner zijn dan die van *B. Zopfii*, en van het vermogen van deze soort om sporen te vormen. Het is eene lange, slanke, staafvormige microbe, 4—5 micron lang, zeer beweeglijk en met eindstandige sporen. De bacterie is zeer gemakkelijk kleurbaar, ook volgens Gram, is fakultatief anaeroob en groeit zoowel bij broed- als bij kamertemperatuur. Ook in den gelatinesteek is de groei zeer karakteristiek met teere, fijne, parallellopende zijtakjes, die onder die oppervlakte het langst zijn en naar onderen toe gaande weg in lengte afnemen. In vleeschwater groeit *Bacillus hippuricus* alleen aan de oppervlakte als een geplooid huidje, dat zich in zijn geheel uit de vloeistof laat nemen.

De stam van 22° is een klein, op een microkok gelijkend kortstaafje, onbeweeglijk, gewoonlijk in ketens van 2—5 aan elkaar liggend. Ze zijn gemakkelijk kleurbaar, ook volgens Gram. Sporenvorming werd niet opgemerkt. De kolonies gelijken in den beginne, wat hun vorm betreft, eenigszins op *B. typhus*, en zijn met het ongewapend oog gezien kleine, teer groeiende, van de gelatine moeielijk te onderscheiden kolonies. Kolonies van drie dagen oud vertoonen eene duidelijke kern met naar den rand toeloopende witte aderen. De kolonie begint dan de gelatine te vervloeien, welke vervloeiing, is ze eenmaal ingetreden, snel verder gaat. Deze vervloeiing verloopt cilindrisch. De bacteriën zijn fakultatief anaeroob. Ik heb

deze soort met geen andere bekende microbensoort kunnen identificeren.

ONTLEDING VAN HIPPUURZURE ZOUTEN BIJ AFWEZIGHEID  
VAN EIWITTEN.

Eene tweede vraag, die verder onderzocht diende te worden, was, of het samengestelde hippuurzuurmolecule aanleiding kon geven tot bacteriegroei, zonder dat eene andere koolstof- of stikstofbron was toegevoegd. Overeenkomstige onderzoekingen door Beyerinck en later door Söhngen verricht over het ureum toonden aan, dat deze stof wel als energiebron voor de bacteriën kan dienst doen, niet echter als koolstofbron, en dat het ureum eerst wordt omgezet in ammoniumcarbonaat in tegenwoordigheid van pepton of bepaalde organische koolstofverbindingen. Iets soortgelijks was hier te verwachten. Gedragen de hippuurzuurverbindingen zich als het ureum en behoeven dus voor hunne ontleding de tegenwoordigheid van pepton of organische koolstofverbindingen, of kan het molecule evenals b.v. asparagine als koolstof- en stikstofbron dienst doen. Om hierop een antwoord te krijgen, werd eene oplossing van de volgende samenstelling: 100 leidingswater, 2 % hippuurzure natrium, 0.05 % dikaliumphosfaat, geënt met gier; de eene proef werd bij 22°, de andere bij 37° geplaatst. - Reeds na 24 uur was een sterke bacteriegroei te constateeren, die bij de cultuur van 22° vergezeld ging van eene prachtige, groene fluorescentie. Na herhaalde overenting werd uit de ophooping van 37° eene lange, slanke bacteriesoort verkregen, terwijl bij 22° een sterk beweeglijk, op diplokokken gelijkend kortstaatje werd geïsoleerd, dat op de gelatine als kleine, ronde, niet vloeïende, groen fluoresceerende kolonies groeit. In rein-cultuur in de natriumhippuraat-kaliumphosfaat vloeistof gebracht is de groei evenals de ammoniakontwikkeling bij 22° aanvankelijk veel sterker dan bij 37°, welk verschil echter na een week verdwenen is; het ammoniakgehalte van de beide culturen is dan ongeveer even groot. De reactie verloopt ook weer in twee phasen, die nagenoeg even snel verlopen. Een paar dagen nadat de cultuur is ingezet, soms reeds na 24 uur (vooral in de cultuur van



22°) is micro-chemisch reeds het glyocol in sporen aan toonen, terwijl ook het ammoniak in sporen aanwezig is, getuige de zeer lichte geelkleuring, die men met Nessler's reagens verkrijgt. Na eenige dagen treedt er een zeer sterk bruin neerslag met Nessler's reagens op, terwijl de micro-chemische reactie in niet sterker mate het glyocol vertoont dan in den beginne. De ammoniak heeft zich dus vermeerderd, terwijl het glyocol ongeveer in dezelfde hoeveelheid, d. i. in sporen, aanwezig is gebleven. Het aantoonen van glyocol langs microchemischen weg geschiedt als glyocolkoper, dat uit de helder blauwe vloeistof als typische, 500—800 micron lange naalden en prisma's aan den rand van den druppel uitkrystalliseert. Men voegt daartoe cuprisulfaat en eene overmaat van ammoniak toe aan een druppel van de glyocol bevattende vloeistof. Men moet er echter bij deze reactie acht op slaan het cuprisulfaat slechts in sporen toe te voegen, daar anders bij het verdampen van den ammoniak het neerslag van koperhydroxyde de weinige naalden van het glyocolkoper bedekt, die daardoor gemakkelijk aan de waarneming zouden ontsnappen.

Aangezien dus het glyocol even snel wordt ontleed als het wordt gevormd, is ook hier de gevormde ammoniak een directe maatstaf voor de hoeveelheid ontleed hippuurzure zout. Zoo vond ik in de cultuur van 22° van 7 dagen oud in 25 c.c. vloeistof 9.9 m.gr. ammoniak, wat overeenkomt met eene ontleding van 117 m.gr. natriumhippuraat, d. i. 93.6 % van het oorspronkelijk aanwezige zout. Bij eene tweede cultuur titreerde ik in 25 c.c. vloeistof 8.9 m.gr. ammoniak, wat overeenkomt met eene ontleding van 84.4 %. In de cultuur van 37° vond ik na 7 dagen ongeveer dezelfde hoeveelheid ammoniak gevormd. De beide onderzochte culturen van 37° bevatten per 25 c.c. resp. 8.9 en 8.5 m.gr. ammoniak, wat correspondeert met eene ontleding van hippuurzure zout van respectievelijk 84.4 en 80.4 %. Op kunstmatige voedingsbodems, zoo op vleeschagar en vleeschgelatine, gaan de reïnculturen snel achteruit in hun vermogen hippuraten te ontleden, zoodat culturen, die eenigen tijd op deze voedingsbodems zijn voortgekweekt, nog slechts geringe hoeveelheden hippuraten kunnen ontleden.

Evenals bij de ontleding van de hippuraten in tegen-

woordigheid van pepton, interesseerde het mij hier het gedrag van de microben na te gaan ten opzichte van benzoaat. Uit de hoeveelheden ammoniak, die gevormd zijn in de culturen van 22° (resp. 9.9 en 8.9 m.gr. per 25 c.c. cultuurvloeistof), zijn af te leiden de hoeveelheden benzoëzuur, die als benzoaat in die culturen moeten zijn gevormd. Ze bedragen voor de zelfde hoeveelheid vloeistof als waarin de ammoniakbepaling plaats vond (in 25 c. c.) 71.1 en 60.1 m.gr. benzoëzuur. Bij de bepaling van de hoeveelheden benzoëzuur, die in de culturen werkelijk voorhanden waren, volgens de methode boven aangegeven, werden in de overeenkomstige culturen in 25 c. c. gevonden 60.1 en 51.8 m.gr. benzoëzuur, wat overeenkomt met 84.5 en 86.2 % van de theoretische hoeveelheid. Door de microben is dus ongeveer 15 % tot verdwijnen gebracht. Het schijnt dus, dat onder deze omstandigheden door de microben veel minder benzoaat tot verdwijnen wordt gebracht, dan bij aanwezigheid van pepton.

Wat de verhouding van deze microben betreft ten opzichte van ureum, daarover kan ik mededeelen, dat ze evenals de nog nader te beschrijven microben van de hippuurzuur-glucose groep slechts zeer zwak ureum ontleden, hoewel alleen de bij kamertemperatuur geïsoleerde soort urease schijnt te bezitten. Nitraten worden niet gereduceerd, zelfs niet tot nitrieten. Onder anaerobe voorwaarden heb ik ook in deze voedingsvloeistof geen ontleding van hippuraten kunnen constataren; de zoodanig geënte culturen bleven steriel.

#### ONTLEDING VAN HIPPURATEN IN TEGENWOORDIGHEID VAN KOOLHYDRATEN.

Wanneer men een voedingsbodem van de volgende samenstelling: 100 leidingswater, 2 % glucose, 0.5 % natriumhippuraat, 0.05 % bikaliumphosphaat infecteert met mest, en onder aerobe voorwaarden plaatst bij 20 en 37°, geraakt men na een paar overentingen tot voor elke temperatuur specifieke reinculturen, die het hippuraat afbreken, echter niet verder dan tot glycol wat de stikstofrest betreft. De microben zijn dus niet in staat ammoniak vrij te maken uit het hippuurzuurmoleculen evenals de boven-

beschreven soorten. Wanneer men echter van beide soorten reïnculturen in den voedingsbodem van bovenvermelde samenstelling aanlegt en na voldoende ontwikkeling, dus na een paar dagen, naar glyocol zoekt, vindt men dit niet of slechts in sporen aanwezig, niettegenstaande benzoëzuur als oplosbaar benzoaat overvloedig voorhanden is, wat dus wijst op eene splitsing van het hippuurzuurmolecule in benzoëzuur in glyocol. Glyocol moet dus blijkens de aanwezigheid van benzoëzuur gevormd zijn, is echter noch als zoodanig (afgezien van sporen, die ik microchemisch nauwelijks kon aantoonen), noch als ammoniak te vinden, zoodat het vermoeden gewettigd is, dat het glyocol in zijn geheel door deze microben wordt geassimileerd. Uit het gehalte aan benzoaat in de cultuur aanwezig, is te berekenen de minimum hoeveelheid natriumhippuraat, die ontleed is; deze bedraagt na ongeveer een week 30 %. Aangezien de mogelijkheid bestaat, dat ook door deze microben een deel van het gevormde benzoaat tot verdwijnen is gebracht, kan niet berekend worden de totale hoeveelheid hippuraat, die ontleed is, daar de eenige factor waaruit zich dat berekenen laat, de ammoniak, ontbreekt.

De isoleering van deze microben geschiedde met glucose als koolstofbron en hippuraat als stikstofbron. Een auxanographische proef wees echter uit, dat in plaats van glucose ook manniet, natriumacetaat en natriumcitraat, niet echter lactose en maltose als koolstofbron te gebruiken zijn. Als stikstofbron kunnen behalve de hippuraten ook nog dienst doen asparagine, chloorammonium, kaliumnitraat en ureum. Uit laatst genoemde stof wordt echter eerst na dagen een spoor ammoniak ontwikkeld. Nitraten worden niet gereduceerd tot stikstof; de bij 37° geïsoleerde stam is echter in staat geringe hoeveelheid nitriet uit nitraat te vormen.

#### DENITRIFICATIE EN DESULFURATIE MET HIPPURAAT ALS KOOLSTOFBRON.

Ontleding van hippuurzuurverbindingen onder anaerobe voorwaarden is alleen mogelijk in tegenwoordigheid van nitraten en sulfaten, zooals de door mij verrichte proeven bewezen hebben. Wanneer men een voedingsbodem van

de volgende samenstelling: natriumhippuraat 1 %,  $\text{KNO}_3$  0.5 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05 % in leidingswater, infecteert met gier en daarmee eene stopflesch geheel vult, zoodat de lucht niet kan toetreden, zal na een of twee dagen de vloeistof in gisting geraken. Vangt men dit gas op en analyseert het, dan blijkt het te bestaan uit een mengsel van stikstof en koolzuur. Is de gisting eenmaal ingetreden, dan verloopt ze zeer snel, d. w. z. ze in staat in zeer korten tijd nitraten volkomen tot verdwijnen te brengen. Eene snel verloopende gisting verkrijgt men, wanneer men aan de ruwcultuur, die uitgegist is en waarmee dus met diphenylamin geen blauwkleuring meer optreedt, opnieuw kaliumnitraat toevoegt. Ik kreeg op die manier eene sterk denitrificeerende cultuur, die in staat was in 24 uur 150 m. gr. kaliumnitraat tot verdwijnen te brengen. Kweekt men bij  $28^\circ$ , eene temperatuur, die voor de ophooping van denitrificeerende microben eene gunstige is gebleken te zijn, dan gelukt het na eenige overentingen eene zeer rijke ophooping te krijgen van de Bacterie Stutzeri. Bij de vele organische koolstofverbindingen, die dienst kunnen doen bij de ophooping en isoleering van denitrificeerende microben, kunnen dus ook de hippuurzuren zouten gevoegd worden.

Tenslotte wil ik nog vermelden, dat ook onder anaerobe voorwaarden in tegenwoordigheid van sulfaten sulfaatreductie optrad met natrium hippuraat als koolstofbron. Beyerinck en van Delden beschreven als organisme, dat de sulfaatreductie bewerkstelligt de *Microspira desulfuricans*, een anaerobe spiril. Als voedingsbodem gebruikte van Delden eene oplossing van de volgende samenstelling.

Leidingswater. . . . .	100.
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ . . . . .	0,05.
Natrimlaktat . . . . .	0,5.
Gips of $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,1.
Ferrosulfaat . . . . .	spoor,

als infectiematereaal grachtmodder.

Ik wijzigde den voedingsbodem nu zoo, dat in plaats van natriumlaktat natriumhippuraat genomen werd. Met grachtslib als infectiematereaal trad na 4 dagen bij  $30^\circ$  zwartkleuring in de gesloten stopflesch op tengevolge van de vorming van zwavelijzer. Een preparaat van het grondbezinksel wees uit, dat de spiril in grooten getal aanwezig was.

## SAMENVATTING.

1e. De hippuurzuren zouten kunnen door microben aeroob en anaeroob worden afgebroken. De bij deze ontleding in het spel zijnde microben komen algemeen verspreid in de natuur voor. Alleen de in de urine van planteneters voorkomende microben werden nader onderzocht.

2e. De hippuraten kunnen als koolstof- en stikstofbron dienst doen bij den groei van de hippuraatontledende microben.

3e. Het hippuurzuurmolecule geeft bij zijne splitsing aanleiding tot het optreden van verschillende producten, die al naar de geaardheid van den voedingsbodem eene gewijzigde samenstelling hebben. Als eindproducten der splitsing treden op benzoaat en ammoniak met glycol als tusschenproduct. Bij tegenwoordigheid van glucose blijft de ontleding staan bij de vorming van benzoaat en glycol.

4e. Door de microben worden verschillende hoeveelheden benzoaat tot verdwijnen gebracht.

5e. Onder de hippuraatsplitsers zijn verschillende soorten, die het vermogen hebben ureum zwak te splitsen.

6e. De hippuurzuren zouten geven aanleiding tot denitrificatie en desulfuratie.

---