

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION GRONINGEN.

Enkele aantekeningen over de hippuurzuur bacteriën,

DOOR

Dr. J. SACK en Dr. Ir. F. C. GERRETSEN.

(Ingezonden 16 Augustus 1930).

De rol die de hippuurzuur ontledende bacteriën in de natuur spelen is een uiterst belangrijke, daar zij de enorme hoeveelheden hippuurzuur, die jaarlijks met de meststoffen in den bodem terecht komen, in eenvoudiger producten omzetten.

De ongeveer 100 miljoen kilogram hippuurzuur, die naar ruwe schatting jaarlijks door onze veestapel worden geproduceerd¹⁾ zijn als zoodanig onopneembaar voor de plant en moeten door de microorganismen geheel worden afgebroken.

Reeds in 1864 werd door VAN TIEGHEM²⁾ aangetoond, dat hippuurzuur door middel van een coccus gesplitst werd in benzoëzuur en glycocoll. RATTONE en VALENTE³⁾ vonden dat *Staphylococcus aureus* deze splitsing kon bewerkstelligen, hetgeen in 1908 door SEO⁴⁾ bevestigd werd. BURRI en medewerkers toonden als eindproduct van de omzetting van hippuurzuren kalk ammoniak aan.

In de dissertatie van SCHELLMANN worden een 28-tal hippuurzuur-omzettende bacteriën beschreven. Opmerkelijk is zijn waarneming, dat bij afwezigheid van zuurstof het hippuurzuur niet wordt omgezet, wat in tegenpraak is met de mededeeling van GOSLINGS⁵⁾, dat hippuurzuren zouten zoowel aerobe als anaerobe ontleed worden. Tevens wijst deze onderzoeker erop, dat de hippuraten gelijktijdig als koolstof en als stikstofbron dienst kunnen doen en voor sommige denitrificeerende bacteriën als C bron kunnen fungeeren.

Door STAPP⁶⁾ zijn een 3-tal hippuurzuuromzettende bacteriën beschreven die tot geheel verschillende groepen behooren en waaruit men den indruk

1) Urine van runderen bevat 0,4—2,7 % met een dagelijksche productie van ± 150 gram.

2) Comptes Rendus. T. 58, blz. 210.

3) Centr. Bl. f. Physiologie. 1888, II, blz. 316.

4) Arch. f. exp. Pathol. Pharm. 58, blz. 440.

5) Meded. v. d. Rijks hogere, land-, tuin- en boschbouwschool, deel V, blz. 52

6) C. f. Bakt. Bd. 51, blz. 1.

210 1047

krijgt, dat het vermogen om hippuurzuur om te zetten een veel voorkomende eigenschap is.

In het volgende zijn enkele waarnemingen betreffende de wijze, waarop sommige hippuurzuurbacteriën het hippuurzuur ontleden opgenomen, waarbij zoowel aan de vorming als aan de ontleding van de beide componenten benzoëzuur en glycocoll aandacht is besteed.

Ophooping.

Voor de isolatie van de betreffende bacteriën werd een cultuurvloeistof, welke bevatte 0.1 % K_2HPO_4 , 0.5 % hippuurzuur geneutraliseerd met NaOH opgelost in leidingwater, geënt met tuingrond.

Zoodra na eenige dagen met Nessler's reagens een sterke ammoniakreactie was waar te nemen, werd in een zelfde vloeistof overgeënt. Na 4 × overenten werd op een voedingsbodem uitgestreken van dezelfde samenstelling als de ophoopingsvloeistof gestold met 2 % agar.

De reïncultures welke na eenige malen overenten waren verkregen, werden op hun vermogen om hippuurzuur te ontleden onderzocht door ze in een 0.5 %-ige hippuraatoplossing te enten en na te gaan of ammoniak gevormd werd.

Beschrijving van een tweetal hippuurzuurbacteriën.

I. *Fluoresceerende hippuurzuurbacterie.*

Vorm. Kleine bewegelijke staafjes, gram negatief, geen sporen, facultatief anaerobe.

Peptonwater. Zoowel aerobe als anaerobe goede groei. Aerobe spoor indol, geen H_2S . Anaerobe wel H_2S -vorming.

Peptonwater nitraat. Geen nitrietvorming.

Giltay-oplossing. Goede groei, geen denitrificatie, noch nitriet of ammoniakvorming.

Koolstofbron. Met glucose, glycerine, benzoëzuur en citroenzuur goede groei met nitraat als N.-bron.

Met hippuurzuur, urinezuur of glycocoll als eenige N-C-bron eveneens goede groei.

Met cellulose, rietsuiker, lactose, manniet *geen* groei.

Met ureum alleen geen groei, wel in tegenwoordigheid van Na citraat, waarbij rijkelijk ammoniak gevormd werd.

Melk wordt lichtbruin en gaat stinken.

Hippuurzuuragar. Ronde aanvankelijk witte kolonies, die een geelgroene fluoresceerende kleurstof afzetten, welke met het bacteriofluoresceïne identiek is, en ten slotte bruinzwart worden, welke kleur ook de agar aanneemt.

Bouillonagar. Onregelmatige witte kolonies.

H₂O gelatine. Zwakke groei, rond de kolonies bruinzwarte verkleuring.

Agarsteek in de diepte matige groei, agar wordt eerst geelgroen, daarna bruinzwart.

Gelatinesteek. Zelfs na drie maanden geen vervloeiing.

Aardappel. Zwakke groei, bruin beslag.

Tyrosinase. Aanwezig.

II. *Sporenvormende hippuurzuurbacterie.*

Vorm. Onbeweeglijke staafjes, grampositief, streng aerobe, gemiddelde lengte 2 μ , breedte 0.5 μ .

Sporen. Ovaal, in het midden van de cellen.

Peptonwater. Goede groei, sporen indol, sterke H₂S-vorming.

Giltay-oplossing. Goede groei, geen denitrificatie, geen nitriet of ammoniakvorming.

Koolstofbron. Glucose, rietsuiker, citroenzuur, benzoëzuur en manniet bij aanwezigheid van een anorganische N-bron goed bruikbaar.

Met cellulose, glycerine, lactose geen groei.

Hippuurzuur en glycocoll kunnen als eenige N-C-bron dienst doen.

Uit hippuurzuur wordt slijm gevormd.

Ureum en urinezuur kunnen niet als N-C-bron dienst doen, wel als C-bron bij aanwezigheid van glucose.

Hippuurzuuragar. Ronde witte sappige kolonies, die ten slotte bruin worden.

Agarsteek weinig groei, behalve bovenop, waar de agar bruin wordt.

Bouillonagar. Onregelmatig gevormde witte kolonies.

Hippuurzuurgelatine. Ronde sappige *niet* vervloeiende, lichtbruine kolonies.

Aardappel. Goede groei, een licht bruinrood beslag vormend.

Tyrosinase. Aanwezig.

De eerste bacterie vertoont veel overeenkomst met de *Bact. fluorescens non liquifaciens*, maakt echter sporen indol en ten slotte een donker bruinzwarte kleurstof op de hippuurzuuragar, wat de *fluorescens* niet deed.

Opmerkelijk is, dat deze hippuurzuurbacterie wel glycerine en geen manniet kan gebruiken als C-bron, terwijl de sporenvormer omgekeerd wel manniet en geen glycerine kan gebruiken.

Wat betreft de groei bij afwezigheid van lucht zij opgemerkt, dat wanneer men een stopflesch geheel vult met een hippuurzuuroplossing, ent met tuingrond en geheel luchtdicht afsluit, daarin na eenige dagen een flinke ammoniakvorming te constateeren valt, welke na zesmaal overenten nog onveranderd is. Bij afstrijking werden bacteriën verkregen, die zoowel aerobe als anaerobe groeien, oblikaat anaeroben waren echter niet aanwezig.

Hiermede is dus wel aangetoond, dat de mededeeling van SCHELLMANN dat bij afsluiting van lucht geen hippuurzuuromzetting plaats heeft, niet juist is. Ook de mededeeling van LÖHNIS ¹⁾, dat anaerobe-omzetting alleen

¹⁾ Vorl. Landw. Bakteriologie, 1913, blz. 151.

mogelijk is bij aanwezigheid van sulfaten en nitraten, blijkt niet juist, daar in onze proeven hippuurzuurontleding tot stand kwam bij afwezigheid van deze verbindingen. Wel is het opmerkelijk, dat de facultatief aerobe hippuurzuuromzetter bij toetreding van lucht beter groeien, toevoeging van glucose had geen invloed, wel werd de anaerobe groei bevorderd bij aanwezigheid van bouillon, gistwater of asparagine in de cultuurvloeistof.

Maximum concentratie hippuurzuur.

In de literatuur vindt men aangegeven dat de hippuurzuurbacteriën in een concentratie van 6 % hippuurzuur niet meer groeien; bij ons onderzoek bleek echter, dat er meerdere bacteriën zijn die ook in een 6 % oplossing nog goed groeien, terwijl in één geval zelfs in een 8 % oplossing nog goede groei mogelijk bleek.

Als remmende factor zou wellicht het uit het hippuurzuur gevormde benzoëzuur kunnen optreden, dat, zooals bekend, vergiftigend op meerdere bacteriën werkt. Dit bleek niet het geval te zijn, daar in de oplossing met 8 % hippuurzuur slechts 0.2 % benzoëzuur gevormd werd. De concentratie van het benzoëzuur, waarbij geen groei meer mogelijk was, bedroeg 3 %.

Wel bleek dat de verdraagzaamheid van verschillende bacteriën tegenover benzoëzuur zeer verschillend is. In een met NaOH geneutraliseerde benzoëzuur-oplossing met 1 % KNO_3 als stikstofbron groeide de boven beschreven fluoresceerende hippuurzuurbacteriën nog goed als de concentratie van het benzoëzuur 1 % bedroeg, terwijl bij $1\frac{1}{2}$ % geen groei meer mogelijk bleek.

De boven beschreven sporenvormer daarentegen groeit nog goed bij $2\frac{1}{2}$ %, terwijl 3 % benzoëzuur niet meer wordt verdragen.

Bij andere soorten lagen de grenzen tusschen 1 en 1.5 %, terwijl één bacterie werd gevonden, waarbij de groei bij 0.2 % wel, bij 0.5 % benzoëzuur niet meer mogelijk was.

Quantitatieve bepaling van enkele ontledingsproducten.

Korten tijd nadat de bacteriën zich in de hippuurzuur-oplossing vermeerderd hebben, kan men daarin zowel benzoëzuur als glycoll aantoonen.¹⁾ In de meeste gevallen zijn deze tusschenproducten reeds binnen een week verdwenen en is dan een belangrijke hoeveelheid ammoniak gevormd.

Daar in de literatuur herhaaldelijk opgaven voorkomen van het optreden van stikstofverliezen bij de ontleding van organische meststoffen, leek het gewenscht na te gaan of bij de ontleding van het hippuurzuur eventueel stikstof verloren ging.

Een oplossing, welke bevatte 0.1 % K_2HPO_4 , 0.5 % hippuurzuur

¹⁾ Benzoezuur en glyceoll werden op de volgende wijze aangetoond: Na de omzetting werd de vloeistof voorzichtig ingedampt, aangezuurd, waarna het benzoezuur zich door benzol laat uittrekken, waarin hippuurzuur en glyceoll niet oplossen. Benzoezuur is gemakkelijk te identificeren door smeltpunt, kristalvorm en typische reacties. Uit het residu werd hippuurzuur verwijderd met aceton, waarin glyceoll niet oplost. Uit het overblijvende werd glyceoll met water onttrokken, ingedampt en tot kristallisatie gebracht.

(0.0391 gr. N) werd in een drietal kolven geënt met 3 verschillende bacteriën. Om ontwijken van ammoniak te voorkomen, werden de wattenproppen met wijnsteenzuur gedrenkt. Nadat het grootste deel van het hippuurzuur omgezet was werd de totaalstikstof bepaald, waarbij werd teruggevonden:

0.0390 0,0393 0,0392 gr. N. (toegevoegd 0.0391 gr.)

zoodat het zeker is, dat bij de hippuurzuurontleding de vorming van vrije stikstof uitgesloten is.

Verder bleek, dat vrijwel alle stikstof ten slotte tot ammoniak wordt overgevoerd. Na twee weken werd teruggevonden:

90.1 %, 89.9 % en 89.8 % van de toegevoegde N.

als ammoniak.

Ten slotte werd nagegaan wat van de beide componenten, benzoëzuur en glycocoll wordt. Het door de cultuur geproduceerde koolzuur werd geadsorbeerd en kwantitatief bepaald; de cultuur bevatte bovendien 1 % KNO_3 en 0.1 % K_2HPO_4 .

TABEL.

		CO_2 geproduceerd.	Berekend.	Onaangetast %.
Benzoëzuur	100 m.gr.	220 m.gr.	252 m.gr.	12.7
„	200 „	447 „	504 „	14.9
Glycocoll	100 „	110 „	117 „	6.0
„	200 „	219 „	234 „	6.4

Gemiddeld blijkt alzoo dat 86 % van het benzoëzuur en 93.8 % van het glycocoll door de bacteriën tot verdwijnen wordt gebracht, ongerekend de door de bacteriënlichamen vastgelegde substantie, hetgeen er wel op wijst, dat het hippuurzuurmolecuul vrijwel totaal wordt afgebroken.

De bacteriologische hippuurzuuromzetting een enzymatisch proces.

Hoewel voor verschillende schimmels is aangetoond, dat zij een enzym bevatten dat meerdere aminozuren kan ontleden, is dit tot nu toe voor de hippuurzuurbacteriën niet het geval. ²⁾

Ten einde hierin meerder inzicht te krijgen werd de sterk werkende reïncultuur van de hierboven beschreven fluoresceerende hippuurzuurbacterie afgecentrifugeerd, het neerslag met water opgeschud ter verwijdering van aanhechtende sporen cultuurvloeistof en opnieuw gecentrifugeerd.

Ter verwijdering van eventueel aanhechtende sporen benzoëzuur werd het bacterienprecipitaat gewassen met benzol, waarna alle reacties op benzoëzuur negatief uitvielen.

Aan 100 c.c. van een 1 %-ige hippuurzuuroplossing werd 3 % toluol toegevoegd en daarna 1 gram van de afgecentrifugeerde bacteriemassa, welke 13 % vaste stof bevatte.

²⁾ Zie OPPENHEIMER, Die Fermente. Bd. I, blz. 355.

Na een week staan bevatte de vloeistof 0.098 gram benzoëzuur, zoodat minstens 15 % van het hippuurzuur ontleed was.

Werd de gereinigde bacteriënmassa met water en zand langdurig fijn-gewreven en door een kaars gefiltreerd, dan *bleek het heldere, steriele filtraat ook in staat het hippuurzuur in de beide componenten te splitsen.*

Ammoniak daarentegen was in de vloeistof zelfs na langen tijd staan niet aan te toonen.

Deze waarnemingen wijzen er op, dat de *bacteriologische ontleding van het hippuurzuur in benzoëzuur en glycocoll een enzymatisch proces is*, terwijl de daarop volgende ammoniakvorming uit de glycocoll aan het leven der bacteriën gebonden zou zijn.
