

DEERDE EKSEMPLAAR MAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHED UIT DE
BIBLIOTHEEK VERWYDER WORD

UOVS-SASOL-BIBLIOTHEEK 0054570



111070718902220000010

- (i) -

ONDERSOEKINGE OOR DIE AFBRAAK VAN AROMATIESE
VERBINDINGS DEUR MIKRO-ORGANISMES.

- (ii) -

ONDERSOEKINGE OOR DIE AFBRAAK VAN AROMATIESE
VERBINDINGS DEUR MIKRO-ORGANISMES.

deur

De B. Scott.

Verhandeling voorgelê ter vervulling van 'n deel
van die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTIAE

in die fakulteit van Natuurwetenskappe aan die
Universiteit van die Oranje Vrystaat.

Bloemfontein
Januarie 1960.

"Ek verklaar dat die verhandeling wat hierby vir die graad van Magister Scientiae aan die Universiteit van die Oranje Vrystaat deur my ingedien word, nie voorheen deur my vir 'n graad aan enige ander universiteit ingedien is nie."

.....*De B. Scott.*.....

De B. Scott.

VOORWOORD.

Hiermee wil ek graag my besondere dank uitspreek teenoor Prof. Dr. W.J. Lütjeharms, Hoof van die Departement Plantkunde en Instituut vir Bodembiolegie U.O.V.S., vir sy waardevolle raad en belangstelling tydens hierdie ondersoek en ook vir sy kritiese leiding by die opstelling van hierdie manuskrip.

My dank gaan ook aan die W.N.N.R. wat 'n beurs tot my beskikking gestel het vir hierdie ondersoek, mnr. Kistner van die Biochemiese Navorsingslaboratorium, Onderstepoort, vir wenke oor die Warburg-tegniek, Departement Chemie vir chemikalieë gebruik in eksperimentele werk en aan die biblioteekpersoneel vir die verkryging van 'n groot aantal interbiblioteek-lenings.

INHOUDSOPGAWE.

HOOFSTUK:

BLADSY.

I	INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING.....	1
	A. Inleiding.....	1
	B. Probleemstelling.....	1
II	LITERATUUROORSIG.....	2
	A. Historiese opmerkinge.....	2
	B. Die isolasie van mikro-organismes wat aromatiese verbindings afbreek.....	2
	C. Die identiteit van mikro-organismes wat aromatiese verbindings afbreek.....	2
	1. BAKTERIEE.....	2
	2. FUNGI.....	3
	3. AKTINOMYCETE.....	3
	D. Metodes wat gebruik is om 'n tussenproduk in die aromatiese afbraak aan te toon.....	3
	1. MANOMETRIESE METODE.....	3
	2. ISOLASIE VAN DIE SPESIFIEKE ENSIEM WAT ELKE STAP KATALISEER IN DIE VOORGESTELDE METABOLIESE AFBRAAK.....	5
	3. CHEMIESE ISOLASIE VAN DIE TUSSENPRODUKTE.....	5
	4. SPEKTROFOTOMETRIESE ANALISE.....	6
	5. CHROMATOGRAFIESE ANALISE.....	6
	6. CHEMIESE KLEURREAKSIES.....	7
	E. Die oksidasie van aromatiese verbindings deur mikro-organismes.....	7
	1. STIKSTOF- EN CHLOORVRYE AROMATIESE VER- BINDINGS.....	7
	(a) Benseenderivate.....	7
	(i) Enkelgesubstitueerde verbindings.....	7
	(ii) Tweewaardige gesubstitueerde ver- bindings.....	8
	(iii) Driewaardige gesubstitueerde ver- bindings.....	9
	(b) Naftaleen en derivate.....	10
	(c) Fenantreen en antraseen.....	10
	2. AROMATIESE STIKSTOFVERBINDINGS.....	10
	(a) Aminosure.....	10
	(i) Fenielalanien en tyrosien.....	10
	(ii) Tryptofaan.....	11
	(iii) p-Aminobensoësuur.....	11
	(b) Nitroverbindings.....	11
	(i) Nitrofenole.....	11
	(ii) p-Nitrobensoësuur.....	12
	(c) Heterosikliese stikstofverbindings.....	12
	(i) Nikotiensuur.....	12

HOOFSTUK:

BLADSY.

(ii) Indol.....	12
(iii) Indolasynsuur.....	12
3. AROMATIESE CHLOORVERBINDINGS.....	13
(a) 2,4-Dichloorfenoksi-asynsuur en 2-metiel- 4-chloorfenoksi-asynsuur.....	13
(b) p-Chloorfenoksi-asynsuur.....	13
(c) Monochloorfenoksibottersuur.....	14
(d) Chloor- en broomnaftaleen.....	14
4. RINGSPLITSING EN VERDERE OKSIDASIE VAN AROMATIESE VERBINDINGS.....	14
(a) Katechol.....	14
(b) 3,4-Dihidroksibensoësuur.....	14
5. DIE MEGANISME VAN RINGSPLITSING.....	15
6. VERDERE OKSIDASIE NA RINGSPLITSING (TERMINALE OKSIDASIE).....	16
F. Die betekenis van die afbraak van aromatiese verbindings deur mikro-organismes.....	16
1. SUIWERING VAN AFVALWATER.....	16
2. INAKTIVERING VAN ANTISEPTIESE STOWWE.....	16
3. DIE AFBRAAK VAN LIGNIEN EN "HUMUS".....	17
(a) Lignien.....	17
(b) "Humus".....	17
4. DETOKSIFISERING VAN ONKRUID- EN INSEKTE- DODENDE MIDDELS.....	18
5. DIE OKSIDASIE VAN STEENKOOL.....	18
III VOORLOPIGE ONDERSOEK MET STREPTOMYCEET-ISOLASIES.....	19
A. Isolاسie van streptomycete.....	19
B. Die oksidasie van aromatiese verbindings deur streptomycete.....	20
IV MIKRO-ORGANISMES WAT AROMATIESE VERBINDINGS AS ENIGSTE KOOLSTOFBRON GEBRUIK.....	21
A. Medium.....	21
B. Isolاسietegniek.....	21
C. Beskrywing van die mikro-organismes wat geïsoleer is uit ophopingskulture.....	22
1. BAKTERIEE.....	22
2. FUNGI.....	23
3. AKTINOMYCEET.....	23
V TURBIDIMETRIESE GROEIBEPALING VAN BAKTERIEE OP VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS.....	24
A. Metode.....	24
B. Resultate.....	24
VI OPMERKINGE OOR DIE WARBURG-TEGNIK.....	30
A. Die suurstofopname.....	30

HOOFSTUK:

BLADSY.

B. Die koolstofdiksiedvrystelling.....	31
C. Die skoonmaak van die manometers en manometerflessies.....	31
D. Die yking van manometers en manometerflessies....	31
E. Die vulling van die manometers met Brodie se oplossing.....	33
F. Die aanwending van vet aan die sluitstukke van die manometers en manometerflessies.....	33
G. Metode gevolg by die neem van lesings.....	35
H. Die termobarometer.....	35
VII WARBURG-EKSPERIMENTE.....	36
A. Metodes.....	36
1. KULTUUROMSTANDIGHED.....	36
2. SENTRIFUGERING VAN DIE SELLE.....	36
3. METODE GEVOLG BY DIE UITVOERING VAN 'N EKSPERIMENT.....	36
B. Resultate.....	37
1. DIE OKSIDASIE VAN ENKEL GESUBSTITUEERDE FENOLE EN AROMATIESE SURE.....	37
(a) Fenol.....	37
(b) Bensoësuur.....	37
(c) Amandelsuur.....	38
(d) Tolueen.....	38
2. DIE OKSIDASIE VAN PARA-, META- EN ORTOGE-SUBSTITUEERDE AROMATIESE VERBINDINGS.....	39
(a) p-Kresol.....	39
(b) m-Kresol.....	40
(c) m-Hidroksibensaldehyd.....	40
(d) o-Hidroksibensoësuur(salisielsuur).....	41
(e) o-Kresol.....	41
(f) Salisielalkohol(saligenien).....	42
3. DIE OKSIDASIE VAN POLIFENOLE.....	42
(a) Syringasuur.....	42
4. DIE OKSIDASIE VAN AROMATIESE METOKSIEL-VERBINDINGS.....	43
(a) Guaiakol.....	43
(b) Anysaldehyd.....	43
(c) Vanillien.....	43
(d) Veratrumaldehyd.....	43
5. KWANTITATIEWE SUURSTOFOPNAME EN KOOLSTOF-DIOKSIEDVRYSTELLING PER EENHEID GEOKSI-DEERDE SUBSTRAAT.....	43
VIII BESPREKING.....	61
OPSOMMING.....	63
SUMMARY	64
BIBLIOGRAFIE.....	65

HOOFSTUK I.

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING.

A. Inleiding.

Dit is reeds lank bekend dat die aerobe oksidases tirosinase, lakkase en peroksidase die oksidasie van fenoliese verbindings teweegbring en dat daarby gekleurde produkte gevorm word.

Beijerinck (1900) het gevind dat 'n bakterie, "Vibrio tyrosinatica", 'n tirosinase besit wat monofenole oksideer. Die werking van tirosinase op monofenole is uitvoerig bestudeer in die klassieke ondersoekinge van Raper en medewerkers (1928).

Evans en Happold (1939) het 'n Vibro-soort geïsoleer wat by goeie aërasie groei op fenol as enigste koolstofbron in 'n minerale voedingsmedium. By nadere ondersoek het geblyk dat die fenol afgebreek word en gebruik word vir selsintese. In die proses is geen kleurstof gevorm nie.

Die biochemie van hierdie mikrobiale stofwisselingsproses was in dié tyd onbekend en dit het 'n nuwe veld geopen in die fisiologie van mikro-organismes. Sedertdien is die afbraak van 'n groot verskeidenheid van aromatiëse verbindings deur mikrobies bestudeer en die biochemie daarvan is opgesom deur Happold (1950), Stanier (1950a, 1952a) en Evans (1957, 1958).

B. Probleemstelling.

Dit is uit die literatuur bekend dat aromatiëse verbindings deur 'n groot aantal streptomycete geoksideer word (vgl. Küster 1953). Die oorspronklike doel van hierdie ondersoek was om vas te stel of aromatiëse verbindings deur die streptomycete afgebreek word tot eenvoudige komponente wat vir selsintese gebruik kan word.

Die streptomycete wat geïsoleer was op 'n nie-verrykte, nie-selektiewe medium was nie in staat om op sekere aromatiëse verbindings as enigste koolstofbron te groei nie. In ophopingskulture op aromatiëse verbindings het geen aktinomycete opgetree nie behalwe 'n Nocardia op toluëen, terwyl op die ander gebruikte aromatiëse verbindings in die meeste gevalle net bakterieë en soms ook fungi gegroei het.

Die Warburg-tegniek is gekies as geskikte metode om die afbraak van aromatiëse verbindings deur die organismes wat daarop geïsoleer is te vergelyk met die reaksies wat reeds vir mikro-organismes beskryf was. Dit is met hierdie metode ook moontlik om nog onbeskrewe reaksies op die spoor te kom.

HOOFSTUK II.

LITERATUUROORSIG.

A. Historiese opmerkinge.

Reeds in 1908 het Störmer die effek van lae konsentrasies tolueen, xileen, fenol en o-, m- en p-kresol op die mikro-organismes in die grond getoets en beweer dat die verbindings as koolstofbron dien en uiteindelik deur die bakterieë afgebreek word. Buddin (1914) het 'n groter bakterieë-populasie in die grond gevind na behandeling met klein hoeveelhede tolueen, benseen, fenol, kresol, bensokinon, hidrokinon en piridien onderskeidelik. Sen Gupta (1921) het die verdwyning van fenole en kresole in die grond kwantitatief bestudeer en bewys dat dit 'n biologiese proses is. Uit ophopingskulture het Tausson bakterieë geïsoleer wat naftaleen (1927, 1928a), fenantreen (1928b) en tolueen (1929) afbreek. Happold (1930) het die bakteriële oksidasie van katechol, guaiakol, orsinol, fenol, p-kresol en tirosien bestudeer.

B. Die isolasie van mikro-organismes wat aromatiese verbindings afbreek.

Die isolasie geskied gewoonlik deur toepassing van die elektiewe kultuurmetode wat ontwikkel is deur Beijerinck (kyk Beijerinck 1921).

Die grond, kompos of afvalmateriaal waaruit die betrokke organismes geïsoleer word, word geperkoleer of behandel met 'n minerale voedingsoplossing en 'n aromatiese verbinding as enigste koolstofbron (vgl. Audus 1949, 1950).

Vervolgens word ophopingskulture van die perkolaat gemaak waarna die gewenste organisme deur uitplating geïsoleer en suiwer gekweek kan word.

C. Die identiteit van mikro-organismes wat aromatiese verbindings afbreek.

Die meeste ondersoekinge oor die afbraak van aromatiese verbindings deur mikro-organismes is tot bakterieë beperk, terwyl fungi en streptomycete minder aandag geniet het. Die rede hiervoor is waarskynlik dat bakterieë die belangrikste oorsaak van die afbraak van aromatiese stowwe in die grond is.

1. Bakterieë.

Gray en Thornton (1928) het 'n uitgebreide studie gemaak van die bakterieë wat aromatiese verbindings afbreek en die verskillende soorte wat geïsoleer is, is ingedeel in die volgende families: Pseudomonadaceae, Spirillaceae, Concaceae, Bacteriaceae, Bacillaceae en Mycobacteriaceae.

Thornton (1923) het tot die gevolgtrekking gekom dat Pseudomonas-soorte en veral Pseudomonas fluorescens (vgl. den Dooren de Jong 1926) die belangrikste organismes is vir die afbraak van aromatiese verbindings.

Vir die studie van die biochemiese aspekte van die afbraak van aromatiese verbindings is soorte geïsoleer van die volgende genera: Pseudomonas (Evans 1947, Stanier 1947 en 1948), Vibrio (Happold en Key 1932), Achromobacter (Czekalowski en Skarzynski 1948, Steenson en Walker 1956), Flavobacterium (Stapp en Spicher 1954) en Mycobacterium (Bernheim 1940).

2. Fungi.

Perrier (1913) het soorte van Penicillium, Mucor en Torula beskryf wat fenol, salisielsuur en bensoësuur afbreek.

Henderson en Farmer (1955) het die afbraak van gemetoksileerde verbindings deur Hormodendrum sp., Penicillium sp., Spicaria sp. en Haplographium sp. bestudeer. Bykomende gegewens oor die afbraak van aromatiese verbindings is aan die liggebring met Penicillium chrysogenum (Isono 1953), Oöspora spp. (Landa en Eliasék 1956), Neurospora crassa (Gross e.a. 1956), Aspergillus niger (Kluyver en van Zijp 1951) en met hout verrottende fungi Fåhræus 1949).

3. Aktinomycete.

Erikson (1941) het soorte van Micromonospora geïsoleer wat tolueen en naftaleen afbreek.

Moore (1949) het gevind dat Nocardia-soorte piridien, anilien, nitrobenseen en fenol as koolstof- en stikstofbronne kan gebruik. Sekere Nocardia-soorte, o.a. Nocardia opaca, veroorsaak β -oksidase van aromatiese vetsure.

D. Metodes wat gebruik is om tussenprodukte in die afbraak van aromatiese verbindings aan te toon.

Weens gebrek aan die nodige kriteria en tegnieke kon vroeëre werkers soos Tausson (1927, 1929) nie daarin slaag om die oksidasieverloop vir die afbraak van aromatiese verbindings deur mikro-organismes vas te stel nie. Sedertdien is effektiewe metodes ontwikkel wat hieronder kortliks bespreek word.

1. Manometriese metode.

Karlstrom (1937, 1938) het onderskeid gemaak tussen adaptiewe ensieme en konstitutiewe ensieme. Die adaptiewe ensieme word alleen gevorm as gevolg van 'n aanpassende vermoë van die organisme teenoor die spesifieke substraat terwyl konstitutiewe ensieme altyd gevorm word ongeag die samestelling van die medium.

Die ensieme wat die aromatiese ring splits, word in die bakterieselle alleen aangetref wanneer die selle op die aromatiese

substraat gegroei het en is dus adaptief van aard.

Stanier (1947) het op die gedagte gekom om die eienskap van adaptiewe ensiemvorming te gebruik om die tussenprodukte in 'n stofwisselingsproses vas te stel en het hierdie tegniek genoem „gelyktydige aanpassing“ („simultaneous adaptation“). Om verskillende redes (vgl. Cohn e.a. 1953) is die benaming egter verander na „opeenvolgende induksie“ („sequential induction“). Hierdie tegniek is die eerste keer in metabolismiese studies onafhanklik van mekaar toegepas deur Stanier (1947), Karlsson en Baker (1948) en Suda, Hayaishy en Oda (1949).

Die beginsel van die tegniek kan as volg gestel word. As die afbraak van A plaasvind via 'n reeks van tussenprodukte B,C,D, E,F waarvan die vorming telkens deur adaptiewe ensieme gekataliseer word, dan sal selle wat op A gegroei het ensieme vorm vir die reaksie $A \rightarrow B$. B gee aanleiding vir die vorming van die ensieme wat die reaksie $B \rightarrow C$ teweegbring en so gaan die proses voort, ook vir die ander tussenprodukte D,E,F. Selle wat op A gegroei het bevat dus al die ensieme wat die reaksie $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow F$ kataliseer. In teenwoordigheid van die tussenprodukte B,C,D,E,F, sal selle wat op A gegroei het, onmiddellik 'n sterk verhoogde reaksie, wat by oksidatiewe prosesse as suurstofopname tot uiting kom, aantoon. As in die teenwoordigheid van 'n voorgestelde tussenproduk X, 'n stadige toename van die suurstofopname plaasvind, dui dit daarop dat adaptiewe ensieme vir X gevorm word. Dit is dus nie waarskynlik dat X 'n afbraakproduk van A is nie. As geen of slegs 'n effens verhoogde suurstofopname in teenwoordigheid van X plaasvind, word X glad nie of baie stadig deur die selle afgebreek en is (behalwe as 'n beperkende faktor optree) nie 'n afbraakproduk van A nie. As groei plaasgevind het op een van die tussenprodukte (sê D), sal ensieme gevorm wees vir die oksidasie van E en F maar nie noodwendig vir die prosesse wat tot die voorafgaande reeks A,B,C gelei het nie.

Die geldigheid van die gevolgtrekkings wat uit die resultate van opeenvolgende induksie gemaak word, hang af van sekere faktore wat die toepasbaarheid van die metode beperk:

(1) As daar nie 'n vaste spesifisiteit van ensiemvorming bestaan nie, kan verkeerde positiewe gevolgtrekkings gemaak word. Selle van Ps. fluorescens wat op fenielasynsuur gegroei het, besit 'n maksimale konsentrasie van ensieme verantwoordelik vir die eerste drie stappe in die afbraak van amandelsuur (Stanier 1950a). Dit is egter bewys dat laasgenoemde nie 'n afbraakproduk van fenielasynsuur is nie (Stanier 194,).

(2) As die selle nie permeabel vir die substraat is nie kan verkeerde negatiewe gevolgtrekkings gemaak word in geval van selle met endogene ensieme. Verskeie ondersoekers het waargeneem dat

β -ketoadipiensuur 'n afbraakproduk van baie aromatiese verbindings is. Selle wat op die betrokke aromatiese verbindings gegroei het, oksideer β -ketoadipiensuur stadig wat te wyte is aan 'n impermeabiliteitseffek (Stanier 1950a).

(3) As autoksidasie van 'n substraat plaasvind, kan ook verkeerde negatiewe gevolgtrekkings gemaak word. Sleeper en Stanier (1950) het gevind dat droëselpreparate van bakterieë wat op fenol en bensoësuur gegroei het, hidroksihidrokinon oksideer maar dat die reaksie nie-ensiematies is.

Die permeabiliteitsprobleem kan oorbrug word deur die gebruik van selvrye ensiemekstrakte waarvoor verskillende bereidingsmetodes bestaan (vgl. Hugo 1954). Die mees algemene bereidingsmetode is die stukkendvryf van selle deur aluminiumoksied volgens McIlwain (1948) en soniese disintegrasie van die selle. Met droëselpreparate (vgl. Sleeper, Tsuchida en Stanier 1950) is dieselfde resultate bereik as met selvrye ensiemekstrakte.

2. Isolasie van die spesifieke ensieme van die voorgestelde metaboliese afbraakskema.

Deur isolasie van elke ensiem in 'n metaboliese reaksieketting kan die oksidasie van die individuele stappe in vitro aangetoon word.

Stanier (1955,1957) het die metodes vir die isolasie van ensieme uit selvrye ekstrakte soos hy en sy medewerkers (1953) dit by die studie van die ensiematiese oksidasie van amandelsuur toegepas het, opgesom.

In selvrye ekstrakte kom die ensieme in 'n oplosbare en 'n korrelrige fraksie voor. Die korrelrige gedeelte bevat die elektronoordraende ensiemsisteem en sekere substraatdehidrogenases, terwyl die oplosbare fraksie al die orige ensieme bevat.

Meer informasie oor die hele oksidasieproses, veral wat betref die reaksiemeganisme en die aard van die betrokke ensieme, soos bv. ko-faktore, kan met geïsoleerde ensiemfraksies verkry word.

Hierdie metode is egter nie altyd uitvoerbaar nie weens die labiliteit van sekere ensiemsisteme of ander inherente biochemiese moeilikhede.

3. Chemiese isolasie van die tussenprodukte.

Deur gebruik te maak van spesifieke ensiemvergifte kan die afbraak van 'n substraat by 'n sekere stap in die reaksieskema stopgesit word. In sommige gevalle van mikrobiale afbraak van aromatiese verbindings vind egter 'n ophoping van tussenprodukte in die kultuur plaas. Die respektiewe eind- en tussenprodukte wat in die kultuur ophoop, kan deur geskikte chemiese metodes geïsoleer en geïdentifiseer word. Verskeie tussenprodukte is deur ekstraksie met eter by 'n bepaalde pH geïsoleer (vgl. Evans 1947, Kilby 1951, Evans en Happold 1939, Strawinsky en Stone 1954 en Murphy en Stone 1955)

Die tussenprodukte kan dan met die gebruiklike chemiese metodes (smeltpuntbepalings, spektrofotometrie, chromatografie, ens.) geïdentifiseer word.

4. Spektrofotometriese analise.

Stanier en medewerkers het van die spektrofotometriese metode gebruik gemaak om hulle resultate van manometriese eksperimente oor tryptofaanoksidase deur bakterieë te kontroleer (vgl. Stanier en Hayaishi 1951, Hayaishi en Stanier 1951 en Tsuchida, Hayaishi en Stanier 1952). Nadat die oksidasie van 'n substraat deur 'n ensiemekstrak in 'n Warburg-apparaat nagegaan is, is die inhoud van die reaksieflessie gebruik om die ekstinksie by verskillende golflengtes te meet. Die reaksievloeistof is eers van proteïene bevry deur behandeling met verdunde swawelsuur en voor die optiese waarnemings geneutraliseer.

Spektrofotometrie is ook op sigself toegepas om 'n ensiemreaksie te ondersoek. Ekstrak en substraat is in ooreenstemmende verdunnings gemeng en daarna is die optiese digtheid van die mengsel gemeet by vasgestelde golflengtes. By absolute waarnemings van die optiese digtheid is 'n kontrolewaarneming van die ekstrak gebruik om korreksie aan te bring vir ligabsorpsie deur die ensiemekstrak.

Henderson (1957) het die tegniek van Kluyver en van Zijp (1951) toegepas deur 'n myceliummat van 'n fungus op 'n geskikte voedingsmedium te laat ontwikkel. Daarna is die voedingsmedium verwyder en die myceliummat gewas. Die mat is daarna verder gekweek op die aromatiese verbinding wat ondersoek is en die afname in absorpsie vir die betrokke stof periodiek nagegaan nadat die absorpsiemaksima van die stof vooraf gemeet is. Op die manier kon die verdwyning van die aromatiese verbinding in kultuur ook kwantitatief ondersoek word.

5. Chromatografiese analise.

By die afbraakstudies van aromatiese verbindings is papierchromatografie aangewend om die reaksieprodukte in 'n kultuurvloeistof te skei en te identifiseer (vgl. Evans, Parr en Evans 1949, Bray, Lake, Thorpe en White 1950 en Fewster en Hall 1951).

Evans e.a. (1949) het fenole en fenoliese sure bepaal deur 'n mengsel van butanol, piridien en versadigde NaCl-oplossing as oplosmiddel te gebruik. Bray e.a. (1950) het 'n butanol-asynsuur-watermengsel as oplosmiddel gebruik. Vir aromatiese sure het Fewster en Hall (1951) egter beter resultate bereik deur met ammoniakale ammoniumkarbonaat gebufferde butanol as oplosmiddel en 'n gebufferde oplossing van broomfenolblou en metielrooi as ont-wikkelaar te gebruik.

6. Chemiese kleurreaksies.

In fenol- en bensoësuurkulture van Vibrio O/1 het Evans (1947) op grond van 'n gevoelige kleurreaksie met natriummolibdaat in suur medium katechol vasgestel. In dieselfde kulture het hy ook 'n intense violet Rothera-reaksie waargeneem en sodoende met hierdie natriumnitroprusside-toets 'n ketosuur aangedui wat later as β -ketoadipiensuur geïdentifiseer is (Kilby 1948).

E. Die oksidasie van aromatiese verbindings deur mikro-organismes.

Die individuele stappe en die ensiemsisteme wat betrokke is by die oksidasie van die aromatiese verbindings en die daarby gepaard gaande ringsplitsing word hieronder bespreek.

1. Stikstof- en chloorvrye aromatiese verbindings.

Die mikrobiale afbraak van hierdie groep van verbindings wat insluit die eenvoudige fenole, aromatiese sure en polisikliese verbindings is baie breedvoerig bestudeer.

(i) Enkelgesubstitueerde verbindings.

Fenol: As eerste oksidasieproduk van 'n fenol-kultuur waarop Vibrio O/1 gegroei het, is katechol geïsoleer (Evans en Happold 1939, Evans 1947). Deur toepassing van die opeenvolgende induksietegniek het Sleeper en Stanier (1950) met Pseudomonas fluorescens bevestig dat fenol tot katechol geoksideer word. Die aromatiese hidroksilasie word deur 'n labiele ensiemsisteem gekataliseer.

Bensoësuur: Die oksidasie van bensoësuur tot katechol is by Ps. fluorescens aangetoon deur Sleeper en Stanier (1950) en by Mycobacterium spp. deur Gale (1952a en b).

Die meganisme van die reaksie bensoësuur katechol is nader opgehelder deur Sleeper (1951) wat bensoësuur in die karboksielgroep en in die C_1 -posisie van die kern met C^{14} gemerk het. Katechol wat ontstaan het uit in die karboksielgroep gemerkte bensoësuur is nie radioaktief nie, terwyl katechol uit bensoësuur met C^{14} in die 1-posisie dieselfde radioaktiwiteit besit het en wel in die 1^e en 2^e C-atome. By volledige oksidasie van bensoësuur is die radioaktiwiteit van die karboksielgroep teruggevind in die asemhalingskoolstofdiksied en dié van koolstofatoom 1 grotendeels in die koolstofdiksied maar gedeeltelik ook in die bakterieselle. Blykbaar vind daar dus 'n oksidatiewe dekarboksilasie plaas en nie 'n peroksidase soos Parr, Evans en Evans (1949) voorgestel het nie.

Amandelsuur: Stanier (1947, 1948) en Sleeper en Stanier (1950) het met die opeenvolgende induksie tegniek bewys dat Ps. fluorescens amandelsuur oksideer tot bensoëfelmieresuur, bensaldehyd, bensoësuur en katechol.

Gunsalus, Gunsalus en Stanier (1953) het die ensieme wat verantwoordelik is vir die oksidasie van dl-amandelsuur geïsoleer uit sonies gedisintegreerde ensiemekstrakte deur sentrifugering en gefraksioneerde ammoniumsulfaatuitsouting. Hulle het 'n korrelrige fraksie geïsoleer wat manometries ondersoek is (Stanier, Gunsalus en Gunsalus 1953) en waarin l-amandelsuurdehidrogenase, barnsteensuur- en appelsuurdehidrogenases sowel as cytochroom b en c aangetref is. Die oplosbare fraksie het bestaan uit amandelsuurrasemase, bensoëlmieresuurkarboksilase met ko-karboksilase, difosfothiamien en twee bensaldehydedehidrogenases nl. dehidrogenase I wat TPN en dehidrogenase II wat DPN bevat het.

Tolueen: Kitagawa (1956) het vasgestel dat tolueen deur Pseudomonas aeruginosa afgebreek word via bensielalkohol, bensaldehyd, bensoësuur en katechol. Vanaf bensielalkohol kom die oksidasieskema ooreen met die omsetting van bensielalkohol soos deur Stanier (1948, 1950) bepaal.

Fenielasynsuur: Kluyver en van Zijp (1951) het 2,5-dihidroksi-fenielasynsuur geïsoleer uit fenielasynsuurkulture waarop Aspergillus niger gegroei het, terwyl Isono (1953, 1954) 2,5-dihidroksifenielasynsuur en o-hidroksifenielasynsuur geïdentifiseer het uit fenielasetaatkulture waarop Penicillium chrysogenum gegroei het.

Die Japanese werker Kumita (1955a en b) het gevind dat fenielasynsuur op twee verskillende maniere deur Ps. fluorescens-variëteite afgebreek word nl. via p-hidroksifenielasynsuur tot 3,4-dihidroksifenielasynsuur en via o-hidroksifenielasynsuur tot 2,5-dihidroksifenielasynsuur.

Fenielpropanoïed-verbindinge: Sekere lede van die fenielpropanoïedreeks, te wete fenielakrielsuur en fenielpropionsuur, word deur Pseudomonas-soorte afgebreek.

Evans en Coulson (1957) het op grond van ionoforese en chromatografiese analise vasgestel dat die afbraak van fenielakrielsuur plaasvind via 2-hidroksifenielpropionsuur tot 2,3-dihidroksifenielpropionsuur.

Webley, Duff en Farmer (1956) het bewys dat Nocardia opaca /3-oksidasie van fenielpropionsuur teweegbring. Fenielakrielsuur en bensoësuur is geïdentifiseer as tussenprodukte.

(ii) Tweewaardige gesubstitueerde verbindinge.

Ortho-gesubstitueerd: Walker en Evans (1952) het vasgestel dat 'n Pseudomonas-soort salisielsuur oksideer tot katechol. Dit is bevestig deur Roof, Lannon en Turner (1953).

Evans (1955) het chromatografies en manometries vasgestel dat ftaalsuur deur 'n Pseudomonas-soort geoksideer word tot 4,5-

dihidroksiftaalsuur. Die verdere verloop van die oksidasie is nie vasgestel nie.

Para-gesubstitueerd: Smith, Jones en Evans(1952) het vasgestel dat 'n Pseudomonas-soort p-kresol oksideer tot p-hidroksibensaldehyd en p-hidroksibensoësuur. Die bevindings is in ooreenstemming met die skema voorgestel deur Evans e.a. (1951).

Dagley en Patel (1955, 1957) het met selvrye ekstrakte gewerk en gevind dat die omsetting van p-kresol plaasvind via p-hidroksibensaldehyd, p-hidroksibensoësuur en 3,4-dihidroksibensoësuur. Die ensiemekstrak het 'n ligroos onoplosbare fraksie bevat waarin 'n cytochroomsisteem geïdentifiseer is. Die ensiem wat verantwoordelik was vir die omsetting van p-hidroksibensaldehyd tot p-hidroksibensoësuur het DPN as ko-faktor nodig gehad. Hierdie waarneming stem ooreen met die bevindings van Gunsalus e.a.(1953). 'n Labiele ensiemsisteem was verantwoordelik vir die hidrosilering van p-hidroksibensoësuur tot 3,4-dihidroksibensoësuur.

Gunter (1953) het gevind dat gewaste selle van 'n Ps.fluorescens-stam p-hidroksiamandelsuur oksideer via p-hidroksibensoësuur tot 3,4-dihidroksibensoësuur. Die hidrosilasie word gekataliseer deur 'n labiele ensiemsisteem. Met 'n gedialiseerde ensiempreparaat is gevind dat p-hidroksibensoësuur 'n tussenproduk is van die oksidasie van p-hidroksiamandelsuur tot p-hidroksibensoësuur.

Henderson (1957) het met verskillende metodes vasgestel dat 'n Penicillium-soort en 'n Hormodendrum-soort p-metoksibensoësuur afbreek via p-hidroksibensoësuur tot 3,4-dihidroksibensoësuur. Die Penicillium-soort vorm ook p-metoksifenol uit p-metoksibensoësuur.

Meta-gesubstitueerd: Evans (1947) het 3,4-dihidroksibensoësuur geïsoleer in kulture van Vibrio O/1 wat op m-hidroksibensoësuur gegroei het. Walker en Evans (1952) het egter bewys dat 'n Pseudomonas-soort m-hidroksibensoësuur omsit tot 2,5-dihidroksibensoësuur. Verdere oksidasieprodukte van 2,5-dihidroksibensoësuur kon nie geïdentifiseer word nie maar vermoedelik het dit ringsplitsing ondergaan en 'n β -diketo-dikarboksielsuur gevorm (Roof, Lannon en Turner 1953)

(iii) Driewaardige gesubstitueerde verbindings.

Deur chemiese isolasie uit die kulture het Henderson en Farmer (1955) vasgestel dat verskeie grondfungi, o.a. 'n Hormodendrum-soort en 'n Penicillium-soort, vanilliën en feruliensuur omsit in vanilliënsuur terwyl syringa-aldehyd omgesit word tot syringasuur. Deur die tegniek van opeenvolgende induksie toe te pas, het Henderson (1956) die bevindings gestaaf. Sy het verder

vasgestel (1957) dat veratrumsuur deur bogenoemde fungi tot vanilliensuur omgesit word.

(b) Naftaleen en derivate.

In kulture van Ps.aeruginosa wat naftaleen afbreek, vind ophoping plaas van salisielsuur (Strawinski en Stone 1943, 1954 en Treccani 1953). Vir hierdie ophoping is Ca- en ferro-ione noodsaaklik.

Werkers in Rothamsted het op grond van chemiese isolasies en manometriese studies tot die gevolgtrekking gekom dat naftaleen geoksideer word tot d-trans-1:2-dihidro-1-2-dihidroksinaftaleen, salisielsuur en katechol (Walker en Wiltshire 1953, 1955 en Treccani, Walker en Wiltshire 1954).

Murphy en Stone (1955) het na toepassing van verskillende ondersoekmetodes die volgende verbindings as moontlike bykomstige tussenprodukte by die naftaleenafbraak aangedui: 1,4-naftokinon, α - en β -naftol, 1,3-dihidroksinaftaleen, 2,3-dihidroksinaftaleen, 1,5-dihidroksinaftaleen, fenol, trans-o-hidroksifenielakrielsuur en ftaalsuur. Hulle is van mening dat daar ook 'n alternatiewe oksidasie van naftaleen tot 1,2-naftokinon bestaan. In kulture van 'n Pseudomonas-soort wat naftaleen afbreek, het ophoping plaasgevind van 1,2-naftokinon wat 'n bruin tot rooi-oranje kleur veroorsaak het in die medium. Daar was geen aanduiding vir die teenwoordigheid van 'n diol in hierdie kulture nie.

(c) Fenantreen en antraseen.

Die oksidatiewe afbraak van polisikliese verbindings wat deur soorte van Pseudomonas veroorsaak word, is ondersoek deur Rogoff en Wender(1951) en Rogoff en Irving (1957).

Van fenantreen is 1-hidroksi-2-naftofiensuur as tussenproduk geïsoleer. Manometries is aangetoon dat fenantreen sowel as antraseen via salisielsuur en katechol gemetaboliseer word. Net soos by die afbraak van naftaleen is gevind dat daar vir fenantreen 'n moontlike alternatiewe afbraak via 1,2-naftokinon bestaan.

2. Aromatiese stikstofverbindinge.

Aromatiese stikstofverbindinge kan deur sommige mikro-organismes as enigste stikstof- en/of koolstofbron gebruik word.

(a) Aminosure.

(i) Fenielalanien en tirosien.

Die mees bekende oksidasie van tirosien word teweeggebring deur die ensiem tirosinase wat 'n kleurreaksie tot gevolg het (melanienvorming). Ander oksidasiereaksies van tirosien waarby geen kleurvorming optree het eers die laaste jare aandag gekry.

Suda en Takeda (1950) het met die tegniek van opeen-volgende induksie gevind dat Pseudomonas-soorte wat op tirosien gegroei het 2,5-dihidroksifenielasynsuur vorm. Dagley, Fewster en Happold (1953) het gevind dat daar twee maniere bestaan waarop fenielalanien deur *Vibrio* O/1 afgebreek kan word, te wete via tirosien, p-hidroksifenielpirodruiwesuur en 2,5-dihidroksifenielasynsuur enersyds, en via fenielpirodruiwesuur, fenielasynsuur en 2,5-dihidroksifenielasynsuur andersyds.

(ii) Tryptofaan.

Tryptofaan word op verskeie maniere deur mikro-organismes geoksideer maar hierdie bespreking word beperk tot dié afbraak van tryptofaan wat gepaard gaan met ringsplitsing (aromatiese afbraak). Hierdie tipe afbraak van tryptofaan word hoofsaaklik teweeggebring deur Pseudomonas spp. wat tryptofaan as enigste koolstof- en stikstofbron kan gebruik.

Suda, Hayaishi en Oda (1950) het gevind dat gewaste selle van 'n Pseudomonas-soort wat op tryptofaan gegroei het 'n onmiddellike suurstofopname toon met kynurenien, antranielsuur en katechol. Selvrye ekstrakte van 'n Pseudomonas-soort wat l-tryptofaan oksideer tot 3-ketoadiapiensuur is berei deur Hayaishi en Stanier (1951). Die eerste stap in die oksidasie van tryptofaan is die vorming van formielkynurenien deur 'n tryptofaanperoksidase. Die omsetting van formielkynurenien na kynurenien word teweeggebring deur 'n hidrolitiese ensiem formulase met die vorming van mieresuur. Onder die invloed van kynureninase ondergaan kynurenien 'n nie-oksidatiewe splitsing tot antranielsuur en alanien. Antranielsuur word deur 'n baie onstabiele ensiem omgesit tot katechol (vgl. Stanier en medewerkers 1951).

(iii) p-Aminobensoësuur.

Sloane e.a. (1951) het gevind dat p-aminobensoësuur deur Mycobacterium smegmatis via anilien tot p-aminofenol geoksideer word.

Die oksidasie van p-aminobensoësuur deur Ps. fluorescens is deur Durham (1956a en b, 1957, 1958) ondersoek. Hy het vasgestel dat p-aminobensoësuur gedeamineer word tot p-hidroksibensoësuur wat verder geoksideer word tot 3,4-dihidroksibensoësuur.

(b) Nitroverbindings.

(i) Nitrofenole.

Simpson en Evans (1953) het aangetoon dat die nitrogroepe van o- en p-nitrofenol by die oksidasie van hierdie verbindings deur Pseudomonas-soorte gesubstitueer word deur hidroksigroepe. o-Nitrofenol word geoksideer tot katechol en p-nitrofenol tot hidrokinon. Die verdere oksidasie van hidrokinon is nie vasgestel nie. Die nitrogroepe wat in die oksidasieproses vrygestel

word, is in die medium as nitriet-ione aangetref. Die ensiem wat verantwoordelik is vir die substitusie van die nitrogroep, 'n nitro-arielhidrolase, is labiel en kon nie geïsoleer word nie.

Simpson (1954) het 'n Pseudomonas-soort geïsoleer wat m-nitrofenol opbreek en 'n onbekende donkerrooi pigment vorm. Resorsinol is nie 'n afbraakproduk van m-nitrofenol nie.

Jensen en Gundersen (1954) het grondbakterieë geïsoleer wat 2,4-dinitro-o-kresol afbreek en nitriet-ione vrystel in die medium.

(ii) p-Nitrobensoësuur.

Durham (1958) het met die manometriese metode vasgestel dat 'n Ps. fluorescens-stam p-nitrobenseen afbreek tot p-amino-bensoësuur, p-hidroksibensoësuur en 3,4-dihidroksibensoësuur. Hier word die nitrogroep dus gereduseer tot 'n aminogroep wat dan vrykom as ammoniak.

(c) Heterosikliese stikstofverbindings.

(i) Nikotiensuur.

Hughes (1955) het vasgestel dat selvrye ekstrakte van 'n Ps. fluorescens-stam nikotiensuur hidroksileer in die sesde c-posisie van die aromatiese ring. Hunt, Hughes en Lowenstein (1957, 1958) het die meganisme van die hidroksilasie bestudeer met swaar isotope en vasgestel dat die suurstof wat nodig is vir die proses afkomstig is van H_2O . Die hidroksilasie van nikotiensuur in hierdie geval verskil dus van die hidroksilasie van ander aromatiese verbindings waar die suurstof afkomstig is van molekulêre suurstof (vgl. Evans 1958).

Behrmann en Stanier (1957) het vasgestel dat selvrye ekstrakte van 'n Ps. fluorescens-stam nikotiensuur heeltemal afbreek. Nikotiensuur word gehidroksileer tot 6-hidroksinikotien-suur gevolg deur 'n oksidatiewe dekarboksilasie tot 2,5-dihidroksipiridien wat ringsplitsing ondergaan om maleïensuuramied en mieresuur te vorm. Maleïensuuramied ondergaan 'n hidrolitiese deaminering tot maleïensuur.

(ii) Indol.

Die Japanese werkers Uchida en Ichihara (1953) kon op grond van resultate verkry met manometriese proewe vasstel dat indol deur 'n gram-negatiewe bakterie geoksideer word via isatien, formielantranielsuur, salisielsuur en katechol.

(iii) Indolasynsuur.

Proctor (1957) het die oksidasie van indolasynsuur deur 'n Pseudomonas-soort chromatografies en manometries geanaliseer en vasgestel dat indolasynsuur geoksideer word via skatol (3-metielindol), indoksiel (3-hidroksi-indol), salisielsuur en katechol.

3. Aromatiese chloorverbindinge.

Werkers in Rothamsted het baie bygedra tot die kennis van die afbraak van aromatiese chloorverbindinge deur mikro-organismes (vgl. Reports of the Rothamsted Experimental Station 1951 - 1957).

In die landboubedryf was dit reeds lank bekend dat insek- en onkruidodende stowwe hulle doeltreffendheid in die grond verloor omdat dit deur mikro-organismes ontgif word. Die identifikasie en isolasie van die afbraakprodukte van aromatiese chloorverbindinge word in laboratoriumeksperimente in baie gevalle bemoeilik omdat hulle by betreklike lae konsentrasies reeds 'n groeiremmende werking toon en deurdat hulle deur die betrokke bakterieë stadig afgebreek word.

(a) 2,4-Dichloorfenoksi-asynsuur(2,4-D.) en 2-metiel-4-chloorfenoksi-asynsuur(MCPAA.)

Audus (1949) en Newman e.a. (1952) het waargeneem dat 2,4-D vinnig verdwyn in gronde wat reeds voorheen met 2,4-D behandel was. Dit berus op 'n ophoping van bakterieë wat 2,4-D en verwante verbindinge afbreek in die grond. Na aanleiding hiervan is 'n verskeidenheid van dergelyke bakterieë geïsoleer (vgl. Audus 1950 en 1951, Rogoff en Reid 1954 en 1956, Jensen en Peterson 1952a en b, Stapp en Spicher 1954, Walker en Newman 1956, Bell 1957, Steenson en Walker 1956, Walker 1954 en Johnson e.a. 1956).

Audus (1952) het deur gebruik te maak van 'n grond-perkolasietegniek, aanduidings gekry dat die asynsuurgroepe van 2,4-D en MCPAA deur hidrolise afgebreek word en dat daarby die coreenkomstige fenole gevorm word. Evans en Smith (1954) het 'n hidroksi-aromatiese suur uit 2,4-D-kulture geïsoleer en was van mening dat dit moontlik 6-hidroksi-2,4-dichloorfenoksi-asynsuur is. Steenson en Walker (1957) kon dit egter met Achromobacter spp. nie bevestig nie. Hulle het daarenteen manometries aangetoon dat 2,4-D geoksideer word tot 2,4-dichloorfenol en moontlik verder tot 4-chloorkatechol en katechol. Dit is bewys dat MCPAA omgesit word tot 5-chloor-orto-kresol (Evans en Smith 1954, Steenson en Walker 1957).

(b) p-Chloorfenoksi-asynsuur(CPAA).

Evans en Smith (1954) het deur chemiese isolasies en manometriese aanpassingseksperimente bewys dat CPAA afgebreek word via 4-chloor-2-hidroksi-fenielasynsuur tot 4-chloorkatechol wat ringsplitsing ondergaan. Die resultate is bevestig deur Evans en Moss (1957).

Steenson en Walker (1957) het egter gevind dat Achromobacter spp. p-CPAA afbreek via p-chloorfenol en p-chloorkatechol.

(c) Monochloorfenoksibottersuur.

Met chromatografiese en nifrarooi-spektrofotonietriese analise het Webley, Duff en Farmer (1957) by Nocardia opaca vasgestel dat 3- en 4-chloorfenoksibottersuur β -oksidasie ondergaan via β -hidroksi - γ - (3- of 4-chloorfenoksi-)bottersuur tot die ooreenkomstige gesulstitueerde asynsure.

(d) Chloor- en broomnaftaleen.

Walker en Wiltshire (1955) het die afbraak van 1-chloor- en 1-broomnaftaleen deur bakterieë bestudeer. Die afbraakprodukte wat geïsoleer is, 8-chloor-1,2-dihidroksinaftaleen en 3-chloor-salisieelsuur dui daarop dat die oksidasie van 1-chloornaftaleen parallel verloop met die oksidasie van naftaleen deur bakterieë.

4. Ringsplitsing en verdere oksidasie van aromatiese verbindings.

Tot dusver is die afbraak van 'n verskeidenheid van aromatiese verbindings tot by die vorming van katechol of 3,4-dihidroksibensoësuur bespreek. By verdere oksidasie van hierdie verbindings ondergaan die benseenkerne ringsplitsing waardeur reguit koolstofkettings gevorm word.

(a) Katechol.

Evans (1947) het op grond van positiewe chemiese toetse (Rothera-reaksie) vermoed dat katechol ringsplitsing ondergaan om 'n β -ketosuur te vorm. Kilby (1948) het die β -ketosuur geïsoleer en geïdentifiseer as β -ketoadiapiensuur. Hayaishi en Hashimoto (1950a en b) het uit met aseton geëkstrakeerde droëselpreparate van Pseudomonas spp. die ensiem pirokatechase geïsoleer wat verantwoordelik is vir die omsetting van katechol tot 'n dikarboksieelsuur. Laasgenoemde is as cis-cis-mukonsuur geïdentifiseer. Sel-vrye ekstrakte van Pseudomonas spp. wat op katechol gegroei het, was egter nie in staat om die geïsoleerde cis-cis-mukonsuur te oksideer nie (Stanier en Hayaishi 1951). Later is aangetoon dat die cis-cis-mukonsuur deur die isolasieproses omgesit word in die cis-trans-isomeer wat dus nie 'n tussenproduk is nie. Evans en Smith (1951) het bevestig dat die omsetting van katechol plaasvind via cis-cis-mukonsuur tot β -ketoadiapiensuur.

Evans e.a. (1951) het vermoed dat cis-cis mukonsuur omgesit word tot γ -karboksietiel Δ^2 -butenolied wat dan herrangskikking ondergaan tot die β - γ -onversadigde lakton en met addisie van water die enolvorm van β -ketoadiapiensuur vorm. Siström en Stanier (1954) het hierdie vermoede bevestig deur die laktoniserende en laktonsplitsende ensieme wat by die omsetting van cis-cis-mukonsuur tot β -ketoadiapiensuur betrokke is, te isoleer.

(b) 3,4-Dihidroksibensoësuur.

Parr, Evans en Evans (1949) het waargeneem dat Ps. fluorescens ringsplitsing van 3,4-dihidroksibensoësuur veroorsaak en

β -ketoadiapiensuur vorm. Stanier (1950) het 'n trikarboksielsuur geïsoleer as tussenproduk van hierdie omsetting. Die trikarboksielsuur is geïdentifiseer as 'n β -karboksimumkonsuur = moontlik die cis-cis-isomeer (McDonald, Stanier en Ingraham 1954).

Gross, Gafford en Tatum (1956) het van Neurospora crassa twee ensieme geïsoleer wat 3,4-dihidroksibensoësuur omsit tot β -ketoadiapiensuur. Die eerste is verantwoordelik vir die omsetting van die mukonsuur tot β -karboksimumkon-o-lakton ((-) - β -karboksi- δ -karboksimetiel - Δ^x -butenolied). Die tweede is 'n delaktoniserende ensiem wat die omsetting van die lakton tot β -ketoadiapiensuur kataliseer.

Studies met isotope het aan die liggebring dat die omsetting van β -karboksimumkonsuur tot β -ketoadiapiensuur deur bakterieë verskillend is van dié deur N. crassa. Dagley en Patel (1957) het 'n tussenproduk van die omsetting van cis-cis-karboksimumkonsuur tot β -ketoadiapiensuur geïsoleer en daar is aanduidings dat dit moontlik δ -karboksi - δ -karboksimetiel - Δ^x -butenolied is.

5. Die meganisme van ringsplitsing.

Die ringsplitsing van katechol en 3,4-dihidroksibensoësuur met as gevolg die vorming van β -ketoadiapiensuur gaan gepaard met die opname van twee atome suurstof (Stanier e.a. 1950). Stanier en Ingraham (1954) kon die opname van twee atome suurstof in hierdie reaksie nie verklaar deur peroksiedvorming nie omdat die totale suurstofopname onveranderd gebly het in teenwoordigheid van 'n groot hoeveelheid katalase. Hulle het ook nie daarin geslaag om, met anilien as reagens, kinonvorming aan te toon nie. Die afwesigheid van gekleurde produkte dui ook nie op kinonvorming nie.

Katagari en Rothberg (1955) het die probleem ietwat opgehelder deur met isotope te werk. As die reaksie uitgevoer word in teenwoordigheid van O_2 en H_2O^{18} bevat die produk, cis-cis-mukonsuur, geen swaar isotoop nie terwyl in teenwoordigheid van H_2O en O_2^{18} die O^{18} in die cis-cis-mukonsuur teruggevind word. Die ensieme verantwoordelik vir die oksidasie is suurstoftransferases.

Die manier waarvolgens die molekule suurstof geaktiveer word, is onbekend. Pirokatechase en 3,4-dihidroksibensoësuuroksidase is metalloproteïene omdat ferro-yster as ko-faktor vir die ensieme dien (Suda e.a. 1951, Dagley en Patel 1955). In die geval van pyrokatechase het Mason (1957) voorgestel dat die ferro-ioon 'n kompleks aangaan met suurstof. Die eerste stap in die reaksie sal dan wees die vorming van oksiferropyrokatechase wat verantwoordelik sal wees vir die oordrag van molekule suurstof

aan katechol met eventuele ringsplitsing en vorming van cis-cis-mukonsuur.

6. Verdere oksidasie na ringsplitsing (terminale oksidasie).

Die aromatiese verbindings wat hierbo bespreek is, word deur obligate aerobe organismes afgebreek. Waterstof word by die aromatiese hidroksilasies, ringsplitsing en terminale oksidasie-kringloop afgestaan. Waterstofoordraende ensiemsisteme (dehidrogenases) is verantwoordelik vir die oordraging van die waterstof aan die waterstofakseptore tot by die uiteindelijke geaktiveerde suurstof.

Die aerobe organismes het die vermoë om ensieme te vorm wat die aromatiese verbindings op so 'n manier oksideer dat produkte gevorm word wat in die hoof-aseemhalingskringloop ingeskakel kan word. Kilby (1951) het bewyse gelewer dat β -ketoadiapiensuur gesplits word in barnsteensuur en 'n C_2 -verbinding, moontlik asetaat. Dagley, Fewster en Happold (1952) en Dagley en Rodgers (1953) het vasgestel dat by die afbraak van aromatiese verbindings deur Ps. fluorescens en Vibrio O/1, β -ketoadiapiensuur via α -ketoglutaarsuur in die Krebs-kringloop opgeneem word. By hierdie oksidasie-kringloop word energierike fosfaatbindings gevorm terwyl ook selmateriaal gesintetiseer kan word.

F. Die betekenis van die afbraak van aromatiese verbindings deur mikro-organismes.

Die afbraak van aromatiese verbindings deur mikro-organismes soos in laboratorium eksperimente vasgestel, het direk of indirek 'n betekenis by die afbraak van baie produkte van aromatiese karakter onder natuurlike omstandighede. Grond is die natuurlike milieu waaruit die organismes geïsoleer is en daarom kan verwag word dat die afbraakprosesse van aromatiese verbindings ook in die grond voorkom. Oor die werklike verloop van hierdie prosesse in die grond is egter baie min bekend.

Die moontlike betekenis van die mikrobiële oksidasie van aromatiese verbindings in verskillende natuurlike prosesse word hieronder bespreek.

1. Suiwering van afvalwater.

Fenoliese verbindings in afvalwater van verskillende oorsprong word deur bakterieë verwyder. Happold en Key (1932) het Vibrio O/1 (sien oksidasie van fenol bls. 7) geïsoleer uit afvalwater van 'n fabriek. By die verrotting en afbraak van proteïene het die vrygestelde aromatiese aminosure waarskynlik 'n groot invloed op die bakterie-flora van afvalwater.

2. Inaktivering van antiseptiese stowwe.

Baie van die aromatiese verbindings word gebruik as

bakteriostatiese of bakteriosidiese en fungistatiese of fungisidiese stowwe. Verbindings soos bensoësuur en salisielsuur word gebruik as preserveermiddels vir verskillende voedselsoorte. Karbolsuur en derivate word as desinfeksiemiddels gebruik. Indien hierdie verbindings in lae konsentrasies aangewend word, kan dit onwerkzaam gemaak word deur sekere mikro-organismes.

Sekere antibiotika vanaromatiese karakter word onwerkzaam gemaak omdat dit opgesplits word deur mikro-organismes. Katz en Pienta (1957) het gevind dat 'n Achromobacter sp. verantwoordelik is vir die afbraak van aktinomisien. Ander antibiotika wat afgebreek word deur bakterieë is penisillien (Abraham 1951) en chloramfenikol (Waksman en Woodruff 1942). Die verskynsel dat sommige bakteriesoorte die eienskap het om antibiotika onwerkzaam te maak, het waarskynlik 'n betekenis in die grond waar gevind is dat antibiotieswerkse same mikro-organismes nie so effektief is nie teen plantpatogene in die grond as in rein kultuur.

3. Die afbraak van lignien en „humus.“

Daar is nog baie onsekerheid omtrent die presiese samestelling van lignien en „humus“ maar die aromatiese karakter daarvan staan wel vas. (vgl. Brauns (1952).

Lignien en humiensuur is baie resistent teen mikrobiale afbraak (Lynch en Lynch 1958). Dit is egter bekend dat mikro-organismes 'n rol speel by die afbraak van lignien en humus onder natuurlike omstandighede.

(a) Lignien.

Gottlieb en Pelczar (1951) het 'n oorsig gegee van die mikrobiale afbraak van lignien. By die aantasting van sekere houtsoorte deur die wit-rot-fungi Trametes pini en Polystictus versicolor is vanillien, vanilliensuur, syringa-aldehyd en syringasuur geïdentifiseer as afbraakprodukte van lignien (Henderson 1955a). Feniellakrielsuur is geïdentifiseer by die houtverrotting van biervate deur 'n ander wit-rot te wete Stereum subpileatum (Birkinshaw, Chaplen en Findlay 1957).

Die chemiese oksidasie van lignien het produkte opgelewer soos vanillien, syringa-aldehyd, p-hidroksibensaldehyd, anyssuur, veratrumsuur, gallussuur en feniellpropiel-derivate (vgl. Morrison 1958, Farmer en Morrison 1955, Hibbert 1942 en Freudenberg e.a. 1940.)

(b) „Humus“

Lewende plante sintetiseer 'n groot verskeidenheid aromatiese verbindings (vgl. Schwarze 1958) waarvan sommige vasgestel is in afgestorwe plantreste (Börner 1956) wat deel uitmaak van die organiese materiaal in die grond.

Die humienfraksie van die organiese materiaal in die grond is ekstrakeerbaar met alkali en verbindings soos salisiel-aldehyd, vanillien, bensoësuur (Shorey 1914) en p-hidroksiben-soësuur (Walters 1917) is geïsoleer uit die in suur oplosbaar fraksie van alkali-ekstrakte van grond.

Robbins (1916) het reeds vermoed daar in die grond geen ophoping van hierdie vir plante giftige verbindings plaasvind nie omdat hulle deur mikro-organismes afgebreek word.

4. Detoksifisering van onkruid- en insektedodende stowwe.

Baie van die sintetiese planthormone en groeifaktore, veral substitusieprodukte van chloorfenoksi-asynsuur, vind hulle toepassing in die landboubedryf as onkruiddodende middels (Nutman e.a. 1945). Dit het egter bekend geword dat hierdie middels gou hulle effektiwiteit in die grond verloor omdat dit afgebreek word deur bakterieë (Audus 1949 en 1951, Jensen en Peterson 1952a en b, Newman e.a. 1952 en Rogoff en Reid 1952.)

Reeds in 1928 het Tattersfield gevind dat die insekt-dodende stof naftaleen in die grond deur bakterieë ontbind word.

5. Die oksidasie van steenkool.

Steenkool is baie resistent teen mikrobiale oksidasie. Lieske en Hofmann (1928) het egter aanduidings gekry dat hoog gekoksideerde steenkool as koolstofbron vir bakterieë kan dien.

Die mikrobiale afbraak van steenkool is bestudeer deur Rogoff en Wender (1957). Steenkool bestaan waarskynlik uit gekondenseerde ringe van aromatiese en hidro-aromatiese karakter. Verbindings soos fenantreen en antraseen is gebruik as model-stowwe vir die studie van die afbraakpad by mikrobiale oksidasie van hoog gekondenseerde ringsisteme.

HOOFSTUK III.

VOORLOPIGE ONDERSOEK MET STREPTOMYCETE-ISOLATE.

Dit is bekend dat sommige saprofitiese aktinomysete komplekse organiese verbindings as koolstof- sowel as stikstof-bron kan gebruik. Daar is vasgestel dat sekere Nocardia-soorte aromatiese vetsure en aromatiese stikstofverbindings afbreek (vgl. Webley, Duff en Farmer 1956, 1957 en Moore 1949). Oor die afbraak van aromatiese verbindings deur streptomycete is daar minder gegewens uit die literatuur verkrygbaar. Erikson (1941) het soorte van Micromonospora geïsoleer wat tolueen en naftaleen afbreek.

'n Onderzoek om vas te stel of eenvoudige aromatiese verbindings as koolstofbron kan dien vir streptomycete is dus as wenslik beskou.

A. Isolاسie van streptomycete.

Omdat daar slegs 'n klein aantal streptomycete-isolate in die plaaslike kolleksie beskikbaar was, is 'n bykomende vyftig stamme self geïsoleer.

Die isolasies is gemaak uit kompos en tuingrond deur toepassing van die verdunningsplaatmetode (vgl. Potgieter 1954).

'n Selektiewe medium was nodig vir die isolasies omdat die stadig groeiende streptomycete op 'n gewone medium maklik deur die vinnig groeiende bakterieë en fungi oorgroei word. Crook e.a. (1950) het die gebruik van natriumpropionaat-glukose-asparagien-agar vir die isolasie van streptomycete uit die grond aanbeveel. Potgieter(1954) en ander studente in die Instituut Bodembio-logie, U.O.V.S., het egter nie baie sukses met die metode van Crook e.a. behaal nie. Benedict e.a. (1955) het Von Plotho-agar gebruik as 'n selektiewe medium vir streptomycete. Hierdie medium is inderdaad meer doeltreffend gevind en 'n groot aantal isolasies kon gemaak word. Die samestelling van die medium wat gebruik is was as volg:

Gliserol	=	20.0 gm.
L(+)Arginien-hidrochloried	=	2.5 gm.
KH_2HPO_4	=	1.0 gm.
NaCl	=	1.0 gm.
$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	=	0.1 gm.
Fe_2SO_4	=	0.1 gm.
Gedistilleerde water	=	1000.0 ml.

B. Oksidasie van aromatiese verbindings deur streptomycete.

Om vas te stel of die isolate aromatiese verbindings as enigste koolstofbron kan gebruik, is verskillende stamme geënt in proefbuis op 'n minerale agar-medium wat die spesifieke aromatiese verbinding in verskillende konsentrasies as enigste koolstofbron behalwe die agar bevat het. Die aromatiese verbindings wat gebruik is fenol, bensoësuur, salisiëlsuur, floroglusinol, tolueen, m-kresol en anilien, is in konsentrasies van 0.05 en 0.01% by die minerale voedingsmedium gevoeg.

Van die sestig verskillende isolasies wat gebruik is in die ondersoek het alleen Streptomyces coelicolor (stam A 437 in die kolleksie v.d. Inst. vir Bodembioëlogie, U.O.V.S.) 'n vertraagde groei getoon op al die aromatiese verbindings behalwe op 0.05% fenol en m-kresol wat toksies was. Dit het ook tot 'n mate die blou pigment ontwikkel wat onder normale kultuuroomstandighede gevorm word.

Hierdie voorlopige ondersoek het tot die gevolgtrekking gelei dat die ondersogte nie-selektief geïsoleerde streptomycete-stamme nie instaat was om aromatiese verbindings as enigste koolstofbron te gebruik nie.

Baie streptomycete besit 'n polifenoloksidasesisteen wat verantwoordelik is vir die oksidasie van aromatiese verbindings (Küster 1953, 1955 en 1956). Hierdie oksidasie lei egter tot melanienvorming of humusvorming (Küster 1953) en die koolstof van die aromatiese substraat word blykbaar nie vir selsintese beskikbaar gestel nie.

Uit ophopingskulture van aromatiese verbindings wat later gemaak is, (sien hoofstuk IV) is ook geen streptomycete wat aromatiese verbindings afbreek geïsoleer nie. Die enigste aktinomyceet wat geïsoleer kon word uit die ophopingskulture van aromatiese verbindings was 'n Nocardia-soort wat tolueen afbreek het.

Uit die beskikbare gegewens uit die literatuur en uit hierdie voorlopige ondersoek wil dit voorkom asof Nocardia-soorte eerder aromatiese verbindings as koolstofbron kan gebruik as streptomycete.

HOOFSTUK IV.

MIKRO-ORGANISMES WAT AROMATIESE VERBINDINGS AS ENIGSTE KOOLSTOFBRON GEBRUIK.

Omdat nie-selektief geïsoleerde streptomyceet-stamme aromatische verbindings nie afbreek nie (vgl. hoofstuk III), is daar van 'n ophopingskultuurmetode gebruik gemaak om streptomycete en ander mikro-organismes te isoleer wat moontlik aromatische verbindings afbreek.

Uit die ophopingskulture is reinkulture van bakterieë, fungi en 'n aktinomyceet wat aromatische verbindings as enigste koolstof- en energiebron kan gebruik, geïsoleer.

A. Medium.

Die medium wat deurgaans gebruik is in die proewe het die volgende basiese samestelling gehad:

NH_4NO_3	= 1.0 gm.
K_2HPO_4	= 1.0 gm.
$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	= 0.05 gm.
Gedistilleerde water	= 1000.0 ml.

Die spesifieke aromatische verbinding wat as koolstof-bron gedien het, is in 'n konsentrasie van 0.1% by die minerale medium gevoeg. Om te voldoen aan komplekse voedingsvereistes is 0.05% gisekstrak by die medium gevoeg. Volgens Stanier en Tsuchida (1949) het die byvoeging van 'n klein konsentrasie gisekstrak geen effek op die adaptiewe oksidasiepatroon van die aromatische verbindings nie. Die pH van die media is op 7.0 gestel met H_3PO_4 en die media is gesteriliseer deur autoklavering by 1 atmosfeer oordruk by 120°C vir 15 minute.

B. Isolasietegniek.

'n Ophopingskultuur is uitgevoer in 'n Buchner-tregter met 'n deursnee van 12 cm. 100 gm. Fynverdeelde kompos is op 'n filtreerpapier in die Buchner-tregter geplaas. 'n 1-Liter rondeboomfles is gevul met die basale medium plus die aromatische verbinding wat as koolstofbron gedien het. Die fles is afgesluit met 'n rubberprop wat voorsien was van twee gate met 'n glasbuis deur elk. Die een glasbuis het tot aan die bodem van die fles gereik terwyl die ander glasbuis kort was en verbind was met 'n rubberbuis. Die rondeboomfles is in 'n omgekeerde posisie bokant die Buchner-tregter vasgeklem en deur middel van 'n klem aan die rubberbuis is die uitvloei so gereël dat dit drupsgewys deur die kompos gepercoleer het. Die lang glasbuis wat tot die bodem van die fles gereik het, het lug voorsien in die fles sodat die vloeistof konstant

uitgeloop het. Die perkolaat is opgevang in 'n 1-liter Erlenmeyerfles. Nadat die medium ongeveer 'n week lank deur die kompos geperkoleer het, is 1 ml. perkolaat geënt in 50 ml vars medium in 'n 100 ml Erlenmeyerfles. Na inkubasie vir ongeveer vier dae is mikro-organismes rein geïsoleer deur uitplating op minerale agar-medium met die ooreenkomstige aromatiese verbinding as enigste verdere organiese verbinding.

Aangesien in geen enkele geval vervloeiing van agar plaasgevind het nie, is aangeneem dat die toegevoegde aromatiese verbinding die enigste koolstofbron vir die betrokke bakterieë was.

C. Beskrywing van die mikro-organismes wat geïsoleer is uit ophopingskulture.

Die volgende aromatiese verbindings is as koolstofbron in die ophopingskulture gebruik:

Fenol	Syringasuur
Bensoësuur	Hidrokinon
Amandelsuur	Pirogallol
Tolueen	Floroglusinol
p-Kresol	Guaiakol
m-Kresol	Anysaldehyd
o-Kresol	Vanillien
Salisielsuur	Veratrumaldehyd

Hiervan het veral bensoësuur en in 'n mindere mate salisielsuur die meeste ontwikkeling van bakterieë en fungi gegee. Hidrokinon en pirogallol het glad geen ontwikkeling van mikro-organismes gegee nie.

1. Bakterieë.

Reinkulture van bakterieë is geïsoleer op die volgende aromatiese verbindings.

Fenol	Stam no. 1.	o-Kresol	Stam no. 8.
Bensoësuur	Stam no. 2.	Syringsuur	Stam no. 9.
Amandelsuur	Stam no. 3.	Guaiakol	Stam no. 10.
Tolueen	Stam no. 4.	Anysaldehyd	Stam no. 11.
p-Kresol	Stam no. 5.	Vanillien	Stam no. 12.
m-Kresol	Stam no. 6.	Veratrumaldehyd	Stam no. 13.
Salisielsuur	Stam no. 7.		

Weens gebrek aan tyd kon nie al die toetse vir die identifikasie van die bakterie-isolate volgens Bergey (1957) uitgevoer word nie. Die bakterieë is egter almal aerobe, beweeglike gram-negatiewe staafies wat bouillongelation vervloei.

Pigmentvorming: Isolate nos. 5, 6, 8, 9, 11, 12 en 13 vorm 'n groen in wateroplosbare pigment op 'n minerale medium met die ooreenkomstige aromatiese verbindings asook op gewone voedingsmedia soos Krainsky- en Czapek-agar. Isolate nos. 2 en 7

vorm 'n in water oplosbare geel pigment op die basale medium met ooreenkomstige aromatiese verbindings. Isolate nos. 1, 3 en 10 gee 'n groenrooi fluoresensie op verskeie media.

2. Fungi.

Fungi is geïsoleer op bensoësuur, salisielsuur, floroglusinol, katechol en amandelsuur. Die mees algemene soorte wat op hierdie verbindings ontwikkel het behoort tot die genera Aspergillus, Penicillium en Hormodendrum. Hulle is nie verder ondersoek nie.

3. Aktinomycete.

Aktinomycete is die groep van mikro-organismes wat die minste ontwikkeling gegee het in die ophopingskulture op aromatiese verbindings.

Alleen op toluen as koolstofbron het isolaat no. 4 'n belowende groei getoon. Op grond van die voorkoms in kulture en mikroskopiese kenmerke is hierdie isolaat geïdentifiseer as 'n Nocardia sp. Die voorkoms van die kolonies stem ooreen met bakterie-kolonies, dit vorm geen lugmycelium nie maar slegs substraatmycelium wat opbreek in "arthrospore."

HOOFSTUK V.

TURBIDIMETRIESE GROEIBEPALING VAN BAKTERIEË OP VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS.

Hierdie ondersoek is uitgevoer om die optimum kultuur-omstandighede in die voorgenome Warburg-eksperimente te kan toepas. Die doel was hoofsaaklik om na te gaan watter konsentrasie van 'n aromatiese verbinding in 'n kultuur die beste groei gee en na watter inkubasietyd daardie kultuur die sterkste groei vertoon. Die troëbeling wat die geïsoleerde bakterieë in 'n minerale vloeistof-medium met die ooreenkomstige aromatiese verbinding in verskillende konsentrasies veroorsaak, is turbidimetries nagegaan.

A. Metode.

Dieselfde minerale vloeistofmedium wat vir die perkolasietegniek gebruik is, is opgemaak en verdeel in 45 ml porsies in 100 ml Erlenmeyerflesse. Die spesifieke aromatiese verbinding wat as koolstofbron by die ophoping gedien het, is in verskillende konsentrasies in 'n volume van 5 ml by die 45 ml porsies gevoeg.

Na enting met die bakterieë wat op die ooreenkomstige aromatiese verbindings geïsoleer is, is die kulture geïnkubeer by 30°C. Monsters van ± 10 ml is elke tweede dag asepties uit die kulture geneem en gebruik om die turbiditeit te bepaal.

Die turbidimetriese bepaling is uitgevoer met 'n Klett Summerson foto-elektriese kolorimeter deur 'n blou filter te gebruik. Om vergelykbare resultate te verseker, is die voorsorgmaatreëls soos voorgeskryf deur Van Kerken (1958) toegepas by die metings.

B. Resultate.

Uit die waarnemings opgesom in tabel 1 kan die volgende resultate afgelei word.

voeg in tabel 1.

1. Fenol.

Die 0.05%-medium het deurgaans die beste troëbeling gegee. Op die 0.1%-medium was die groei aan die begin vertraag maar het mettertyd toegeneem na gelang die toksiese effek verdwyn het. Die 0.15%-medium was heeltemal toksies en geen groei het plaasgevind nie.

2. Bensoësuur.

Na twee dae inkubasie het die 0.1%-medium die sterkste troëbeling gewys. Tot op die tweede dag het 'n groeivertraging van die bakterieë in die 1%-medium plaasgevind. Dit is waar-

TABEL 1.

TURBIDIMETRIESE GROETBEPALINGS VAN BAKTERIE-STAMME IN 'N
MINERALE VOEDINGSMEDIUM MET DIE OOREENKOMSTIGE AROMATIESE
VERBINDING AS ENIGSTE KOOLSTOFBRON.

Stam no.	Aantal dae geïkubeer	Troebeling			
		2	4	6	8
	<u>Fenol</u>				
1	% fenol 0.15	0	20	0	10
	0.10	35	194	84	162
	0.05	153	260	202	244
	0.03	109	128	120	125
	<u>Bensoësuur.</u>				
2	% bensoësuur 1.50	20	43	66	100
	1.00	120	375	-	-
	0.50	82	172	250	345
	0.10	262	300	270	250
	<u>Amandelsuur.</u>				
3	% amandelsuur 0.50	120	260	380	500
	0.10	150	300	450	460
	0.05	100	116	114	110
	0.03	70	68	64	62
	<u>Tolueen.</u>				
4	% tolueen 1.00	45	115	120	125
	0.50	40	70	70	72
	0.10	55	48	40	40
	0.05	20	20	18	10
	<u>p-Kresol.</u>				
5	% p-kresol 0.10	0	0	0	0
	0.05	28	48	50	56
	0.03	89	70	60	58
	0.01	40	35	32	30
	<u>m-Kresol.</u>				
6	% m-kresol 0.15	0	22	50	60
	0.10	33	95	180	275
	0.05	93	112	140	160
	0.03	120	130	135	140
	<u>m-OH-Bensaldehyd.</u>				
6	% m-OH-Bensaldehyd 0.15	130	142	160	160
	0.10	150	156	158	160
	0.05	105	100	100	100
	0.03	60	62	63	64

TABEL 1 (VERVOLG)

Stam no.	Aantal dae geïnkubeer	Troebeling.			
		2	4	6	8
	<u>Salisielsuur.</u>				
7	% salisielsuur				
	1.50	0	5	20	40
	1.00	162	250	343	-
	0.50	165	268	345	375
	0.10	224	210	190	180
	<u>o-Kresol.</u>				
8	% o-kresol				
	0.10	0	0	0	0
	0.05	20	50	100	160
	0.03	120	130	135	140
	0.01	43	48	48	50
	<u>Saligenien.</u>				
8	% saligenien				
	0.15	140	220	238	260
	0.10	158	202	230	250
	0.05	160	175	155	150
	0.03	97	112	104	100
	<u>Syringasuur.</u>				
9	% syringasuur				
	0.15	90	182	285	325
	0.10	125	255	285	300
	0.05	112	118	126	138
	0.03	97	102	109	115
	<u>Guaiakol.</u>				
10	% guaiakol				
	0.10	0	0	0	0
	0.05	130	115	110	100
	0.03	88	75	77	70
	0.01	40	30	20	20
	<u>Anysaldehyd.</u>				
11	% anysaldehyd				
	0.15	0	0	10	28
	0.10	10	27	50	60
	0.05	72	120	125	115
	0.03	50	58	60	65
	<u>Vanillien.</u>				
12	% vanillien				
	0.50	0	10	20	60
	0.15	35	86	183	270
	0.10	90	222	250	240
	0.05	100	108	110	105
	<u>Veratrumaldehyd.</u>				
13	% veratrumaldehyd				
	0.15	27	60	64	68
	0.10	30	70	90	110
	0.05	30	114	116	116
	0.03	70	58	55	54

skynlik te wyte aan 'n aanvanklike toksiese invloed van bensoësuur. Daarna het die turbiditeit in die 1%-medium vinnig toegeneem. Op die vierde dag was 'n duidelike oplosbare geel pigment sigbaar en het verdere turbiditeitsmetings geen sin gehad nie. Of die hoë turbiditeit op die vierde dag aan sterk groei of aan beginnende pigmentvorming toegeskryf moet word, kan nie met sekerheid gesê word nie. In die 0.5%-medium het die groei na 'n effense remming aan die begin reëlmatig toegeneem sodat die kulture later meer troebel was as op die 0.1%-medium. Die 1.5%-medium het 'n sterk geremde groei getoon wat toegeskryf is aan die toksiese invloed van so'n hoë konsentrasie bensoësuur.

3. Amandelsuur.

Tot op die sesde dag na enting het die 0.1%-medium die sterkste troebeling gegee. Die troebeling in die 0.5%-medium het min verskil van dié in die 0.1%-medium. Na die tweede dag was daar geen merkbare toename van troebeling in die 0.05%- en 0.03%-medium nie.

4. Tolueen.

Isolaat no.4 is onbeweeglik en vorm 'n vlies op 'n medium. Die turbiditeit is bepaal nadat die media opgeskud is tot 'n homogene suspensie.

Die hoogste troebeling is eers na vier dae vasgestel in die 1.0%-medium. Die troebeling het dus stadiger plaasgevind as by bakterieë. Kleiner konsentrasies tolueen het relatief 'n baie swakker ontwikkeling van selle gegee.

5. p-Kresol.

Die 0.05%-medium was effens toksies en die sterkste troebeling van bakterieë is na twee dae inkubasie op die 0.03%-medium verkry. Die 0.1%-medium was heeltemaal toksies.

6. m-Kresol.

Na twee dae inkubasie was die sterkste troebeling in die 0.03%-medium. Die troebeling in die 0.03%-medium. Die troebeling in die 0.05%-medium het min verskil van dié in die 0.03%-medium. In die 0.10%- en 0.15%-medium het die groei na 'n aanvanklike remming vinnig toegeneem.

7. m-Hidroksibensaldehid.

Die sterkste troebeling in al die media het in die eerste twee dae na enting plaasgevind. Daarna het die troebeling in die 0.15%-medium nog effens toegeneem terwyl dit in die ander media prakties gladnie meer toegeneem het nie.

8. Salisielsuur.

Na twee dae inkubasie het die 0.1%-medium die sterkste

troebeling gewys. Die groei in die 0.50%- en 1.00%-medium was prakties dieselfde en die troebeling het feitlik reëlmatig toegeneem tot op die 6e dag na enting. Daarna het die 1.00%-medium ook 'n geel pigment ontwikkel.

9. o-Kresol.

Na twee dae inkubasie was die meeste troebeling in die 0.03%-medium. Geen merkbare toename in troebeling het na hierdie tyd in die 0.03%- en 0.01%-medium plaasgevind nie terwyl die troebeling in die 0.05%-medium feitlik reëlmatig toegeneem het. Die 0.10%-medium was toksies en geen ontwikkeling van bakterieë het plaasgevind nie.

10. Salisielalkohol(saligenien).

Die sterkste troebeling het deurgaans voorgekom in die 0.15%- en 0.10%-medium en was prakties dieselfde. Na die tweede dag kon geen merkbare toename in troebeling in die 0.05%- en 0.03%-medium opgemerk word nie.

11. Syringasuur.

Na die tweede dag was daar min toename in die troebeling van die 0.03%- en 0.05%-medium waarvan die troebeling ook min verskil het. By die hoër konsentrasies was daar tot die agtste dag 'n toename in die troebeling.

12. Guaiakol.

Twee dae na enting was die 0.05%-medium die troebelste maar daarna het die troebeling net soos by die 0.03%- en 0.01%-medium nie meer toegeneem nie. In die 0.10%-medium het geen ontwikkeling van selle plaasgevind nie.

13. Anysaldehyd.

Na twee dae het die 0.05%-medium die sterkste troebeling gewys. Die ander media het baie min troebel geword.

14. Vanillien.

Na vier dae het die 0.1%-medium die sterkste troebeling gewys. Die 0.15%-medium was aanvanklik toksies maar mettertyd het die troebeling vinnig toegeneem. 'n Stadige troebeling het in die 0.5%-medium plaasgevind.

15. Veratrumaldehyd.

Na vier dae het die 0.05%-medium die sterkste troebeling gewys. Gedurende die agt dae inkubasie-tydperk was daar 'n vertraagde groei van bakterieë in die 0.1%- en 0.15%-medium en het 'n stadige troebeling plaasgevind.

C. Bespreking.

Volgens die troebelingswaardes is die optimum groei in die

meeste gevalle reeds na twee dae in die media met lae konsentrasies aromatiese verbindings vasgestel. In media waarin groei plaasgevind het by hoër konsentrasies is die optimum troebelingswaardes eers na 4-6 dae vasgestel.

Die swak groei wat opgetree het in die media met lae konsentrasies aromatiese verbindings is waarskynlik te wyte aan die lae koolstofgehalte wat beskikbaar was.

Die aromatiese sure bensoësuur, salisielsuur en amandelsuur het in selfs so'n hoë konsentrasie as 1.0% 'n sterk ontwikkeling van bakterieë veroorsaak. Die fenoliese verbindings en veral die kresole was daarenteen baie toksies en in baie gevalle het slegs verbindings van 0.05% en minder nie 'n groeiremmende werking uitgeoefen nie.

HOOFSTUK VI.

OPMERKINGE OOR DIE WARBURG-TEGNIK.

Die mikrobiële oksidasie van aromatiese verbindings is manometries bestudeer deur die suurstofopname en koolstofdioksied-vrystelling te bepaal volgens die direkte metode van Warburg (vgl. Umbreit e.a. 1947). 'n Warburg-apparaat model VL vervaardig deur die Firma B.Braun, Melsungen, is vir die doel gebruik.

A. Die suurstofopname.

Die suurstofopname is bereken volgens die formule:

$$XO_2 = hKO_2$$

Waarby XO_2 = die aantal μ l. suurstof wat opgeneem word.

h = die verandering van die manometerlesing in mm.

KO_2 = die fleskonstante vir suurstofopname.

Die fleskonstante is bereken volgens die formule:

$$K = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf\alpha}{Po}$$

waarby Vg = die volume gasfase in die manometerfles plus die volume van die kapillêre van die manometer uitgedruk in ml.

Vf = die volume vloeistof in die manometerfles uitgedruk in ml.

Po = 760×13.60 digtheid van die manometervloeistof.

T = die temperatuur van die waterbad tot 0.01°C noukeurig, uitgedruk in grade absoluut ($273 + t^\circ\text{C}$).

α = die oplosbaarheid van die gas in die vloeistof (uitgedruk as ml. gas/ml. vloeistof as die gas by 'n druk van 1 atm. is, by temperatuur T). Die waardes vir die oplosbaarheid van die gas word aangegee in tabelle (vgl. Umbreit 1947).

In plaas van die fleskonstante van elke manometerflessie telkens uit te werk volgens die formule, is die fleskonstante afgelees op 'n standaard grafiek opgestel deur N. Dahl en F. Samson, Dept. Fisiologie, Universiteit Kansas.

Die absorbering van CO_2 deur KOH: Die vrygestelde CO_2 moet geabsorbeer word aangesien dit anders die lesing vir suurstofopname beïnvloed. Die absorbering van CO_2 deur KOH hang af van die oppervlakte van KOH wat blootgestel is. Om die oppervlakte van die KOH-oplossing te vergroot is filtreerpapier in vierkante van ± 2 cm. gesny, drie tot vier keer gevou en met 'n pinset in die KOH-oplossing geplaas. Die KOH versprei dan oor die hele oppervlak van die filtreerpapier. Net voldoende KOH-oplossing van omtrent 2 normaal is in die binneste klein buisie geplaas om die oppervlakte

goed te bedek. Om te verhoed dat die alkali nie opkruip teen die buisiewande en in die buitenste ruimte van die flessie beland nie, is vaseline op die rand van die binneste buisie gesmeer.

B. Die koolstofdiksiedvrystelling.

Benewens die flessie met KOH wat gebruik is om die suurstofopname te bepaal, is nog 'n flessie gebruik met presies dieselfde inhoud as eersgenoemde maar wat nie KOH bevat het nie.

Die koolstofdiksiedvrystelling is bereken volgens die formule:

$$XCO_2 = h - \frac{XO_2}{KO_2} KCO_2$$

waarby XCO_2 = die aantal $\mu l. CO_2$ wat vrygestel is.

h = die verandering van die manometerlesing in mm.

XO_2 = die aantal $\mu l O_2$ wat opgeneem is.

KO_2 = die fleskonstante vir suurstofopname.

KCO_2 = die fleskonstante vir koolstofdiksiedvrystelling.

C. Die skoonmaak van die manometers en manometerflessies.

Die sluitstukke van die manometers en manometerflessies is bevry van vet deur dit met watte en aseton skoon te maak. Die manometers is van hulle staanders verwyder en na verwydering van die rubberbuisie is die manometers in dichromaatswawelsuur geplaas en oornag daarin gelaat. Omdat chroom-ione 'n giftige werking op ensiemwerking kan hê, is dichromaatswawelsuur nie vir die manometerflessies gebruik nie. Die manometerflessies is in gekonsentreerde swawelsuur en nitraat geplaas en op 'n sandbad verhit. Die manometers en flessies is hierna goed gewas, eers met kraanwater en daarna met gedistilleerde water en gedroog. Slegs in geval van die manometerflessies is die skoonmaak daarvan elke keer na gebruik herhaal.

D. Die yking van manometers en manometerflessies.

Die bepaling van die volumetriese inhoud van die manometers en manometerflessies is gedoen met kwik volgens 'n gewysigde metode van Zwart (1952).

voeg in tabel 2.

1. Die yking van die manometerflessies.

Die manometerflessies is noukeurig geweeg en onder vakuum met kwik gevul (vgl. fig. 1) om te verhoed dat daar enige lugblasies insluip.

voeg in fig. 1

die hoeveelheid kwik in 'n flessie is so gereël dat wanneer die

DIE YKING VAN MANOMETERS EN MANOMETERFLESSIES.

No. van Manome- ter.	No. van flessie	Flessie + kwik Gewig in Gram.	Flessie alleen Gewig in Gram.	Kwik al- leen Gewig in Gram.	Volume van fles- sie in ml.	Glas- beker + kwik Gewig in Gram.	Glasbe- ker al- leen Gewig in Gram.	Kwik al- leen Gewig in Gram.	Tempera- tuur van kwik in °C	Volume van Ma- nometer in ml.	Totale volume in ml.	KCO ₂ Vf= 3ml. T=303°	KO ₂ Vf= 3ml. T= 303°
9136	8307	215.9989	22.0183	198.6786	14.6930	22.8980	17.2173	5.6807	24.00	0.4195	15.1125	1.285	1.100
9114	304	220.6969	19.9594	196.0395	14.4912	22.9294	17.2173	5.7121	21.00	0.4195	14.9107	1.268	1.082
9144	6141	233.9287	21.4175	212.5112	15.7160	22.8047	17.2173	5.5874	21.00	0.4126	16.1286	1.377	1.190
9159	8313	222.0123	20.1677	201.8446	14.9271	22.2330	17.2173	5.0157	21.00	0.3703	15.2974	1.291	1.115
9134	5261	243.7761	20.7556	223.0205	16.4930	22.0056	17.2173	4.7883	21.00	0.3535	16.8465	1.442	1.253
9168	8312	213.6532	21.1372	192.5160	14.2372	23.0684	17.2173	5.8511	22.00	0.4321	14.6693	1.242	1.059
9164	5081	216.4139	22.0053	194.4086	14.3773	23.2785	17.2173	6.0612	21.00	0.4474	14.8247	1.259	1.077
8814	1404	235.2713	21.4559	213.8154	15.8124	24.2332	17.2173	7.0159	20.00	0.5179	16.3303	1.396	1.210
9192	3348	214.5825	20.2451	194.3374	14.3720	22.2499	17.2173	5.0326	23.00	0.3718	14.7436	1.252	1.065
9124	3041	218.1055	20.8121	197.2934	14.5940	23.5335	17.2173	6.3162	20.00	0.4599	15.0539	1.280	1.095
9189	5324	222.1973	22.6149	199.5824	14.7592	22.3233	17.2173	5.1070	23.00	0.3773	15.1365	1.288	1.110
9140	3657	205.6423	21.3242	184.3181	13.6300	22.7396	17.2173	5.5223	21.00	0.4082	14.0382	1.190	1.002
9145	5202	224.8446	22.4523	202.3923	14.9680	22.7456	17.2173	5.5283	20.00	0.4081	15.3761	1.309	1.120

TABEL 2.

flessie verbind is aan 'n manometer en in die waterbad van die Warburg-apparaat geplaas is, die kwik by 'n gekose temperatuur, 30°C , tot 'n gerieflike hoogte X styg.

2. Die yking van die manometers.

Die een ent van 'n kort, skoon stukkie rubberbuis is met 'n kort glasstafie gesluit. Die rubberbuis is gevul met kwik en verbind aan 'n kraanopening (vgl. figuur 2) van 'n manometer wat in posisie 1 vasgeklem is.

voeg in fig. 2.

Die buis is oor die punt van die manometer gedruk sodat die kwik eers net gestyg het tot posisie Y. Die manometer is dan versigtig omgedraai en in posisie 2 (figuur 2) vasgeklem. Deur middel van 'n klemskroef aan die rubberbuis en deur die manometer in 'n vertikale posisie op en af te beweeg is die kwik in die manometer presies op punte X en Z gestel. X - Z was dan 'n horisontale lyn gewees. Punt Z het die uitgangspunt op die regterbeen van die manometer voorgestel vir die neem van lesings op die linkerbeen. In dié geval is dit geneem as 150 mm. Die kraan K is net genoeg gedraai om die verbinding tussen kwik in die rubberbuis en dié in die manometer af te sny.

Nadat 'n rukkie gewag is om temperatuurewewig in te stel is daar weer op gelet dat die kwik presies op punte X en Z staan. Die kraan is hierna oopgedraai sodat die kwik uitgevloei het in 'n noukeurig afgeweepte glasbeker. Die temperatuur van die kwik in die stoorbottel is gemeet tot die naaste 0.1°C en dit is aangeneem dat die temperatuur van die kwik in die manometer dieselfde was.

E. Die vulling van die manometers met Brodie se oplossing.

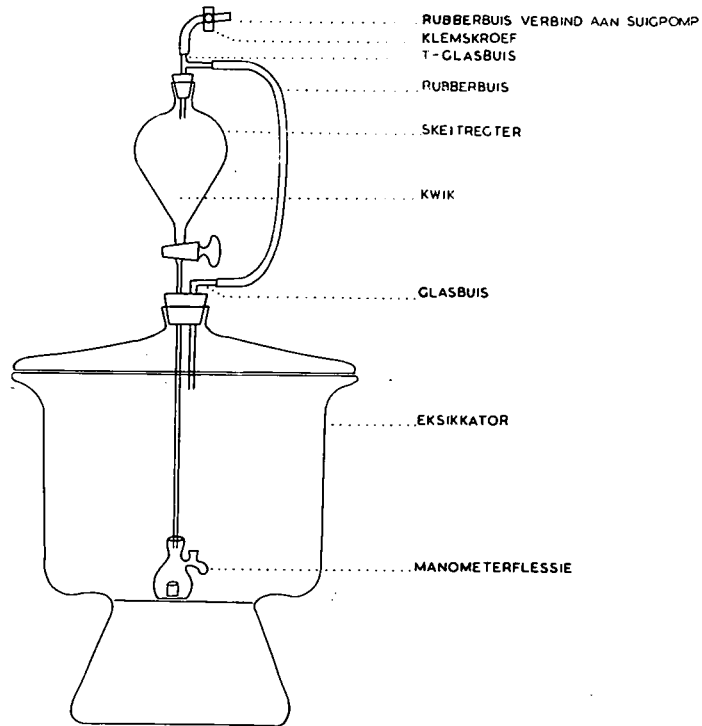
Die rubberbuisse van die manometers isskoongemaak en weer aan die manometers verbind. Die manometers is in 'n omgekeerde posisie vasgeklem. Die rubberbuisse is toegeklem by die verbinding aan die manometers terwyl die rubberbuisse gevul is met Brodie se oplossing (Braun se reagens). Die rubberbuisse is gesluit met die kort glasstafies en nadat die manometers regop gestel is, is die klemme verwyder. Die manometervloeistof kon dan op die regte hoogte gestel word deur die skroef van 'n manometer versigtig te draai.

F. Die aanwending van vet aan die sluitstukke van die manometers en manometerflessies.

Vir die manometerkraantjies is 'n silikoon smeer gebruik terwyl vir die res van die sluitstukke vaseline gebruik is. Slegs drie strepe vet is oor die oppervlak gesmeer en die sluitstukke is

FIGUUR 1

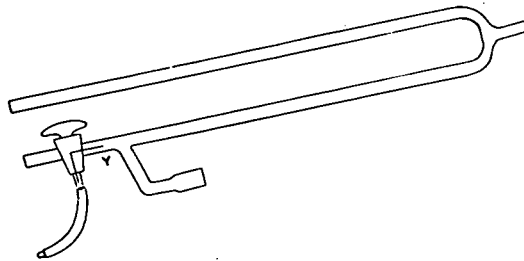
VULLING VAN 'N MANOMETERFLESSIE MET KWIK ONDER VAKUUM



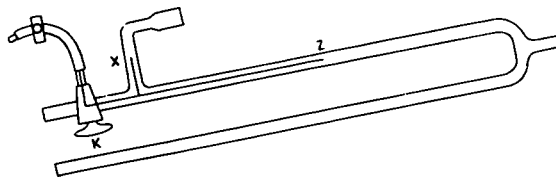
FIGUUR 2

VULLING VAN 'N MANOMETER MET KWIK

MANOMETER IN POSISIE 1



MANOMETER IN POSISIE 2



styf ingepas en slegs effens heen en weer gedraai totdat die vet oor die hele oppervlak versprei het sodat daar geen lugblasies voorgekom het nie.

G. Metode gevolg by die neem van lesings.

Die manometerflessies aan die manometers is in die konstante temperatuurbad van die Warburg-apparaat geplaas. Nadat temperatuurewewig tussen die vloeistof in die flessies en die water in die bad bereik is, is die vloeistof in die geslote manometerbuis op 150 mm gestel terwyl die kraan oop was. Nadat die Kraan gesluit is, is die lesing geneem van die stand van vloeistof in die oop manometerbuis met die vloeistof in die geslote manometerbuis op 150 mm. As suurstofopname plaasgevind het, het die manometervloeistof in die toe buis gestyg. Telkens na 'n periode van 10 minute is die vloeistof in die geslote buis op 150 mm gestel en die lesing van die stand van vloeistof in die oop buis geneem. Die verskil tussen die beginlesing en die volgende lesings van die stand van die vloeistof in die oop manometerbuis het die drukafname aangegee wat as gevolg van suurstofopname opgetree het.

H. Die termobarometer.

Vir korrekte manometerlesings van suurstof opname en koolstofdiksiedvrystelling behoort die atmosferiese druk konstant te wees. Geringe temperatuurveranderings veroorsaak egter veranderinge in atmosferiese druk. Om korreksie by die verandering van die kamertemperatuur aan te bring, is gebruik gemaak van 'n termobarometer.

Die termobarometer bestaan uit 'n manometer met manometerflessie wat slegs gedistilleerde water bevat. As die vloeistof in die oopmanometerbuis van die termobarometer gestyg het, is die verskil bygetel by die manometerlesings, terwyl as die vloeistof gedaal het die verskil afgetrek is van die manometerlesings.

HOOFSTUK VII.

WARBURG-EKSPERIMENTE.

In 'n voorlopige manometriese ondersoek is gevind dat die geïsoleerde bakterieë 'n baie duideliker en vinniger reaksie vir die vasstelling van die oksidasieverloop van aromatiese verbindings met behulp van opeenvolgende induksietegniek vertoon as die beskikbare fungi en streptomycete. Behalwe vir tolueen waarop 'n Nocardia-soort geïsoleer is, is alleen die bakteriële oksidasie van die aromatiese verbindings bestudeer met die Warburg-metode.

Die oksidasieverloop na ringsplitsing kon nie bestudeer word nie omdat verbindings soos β -ketoadipiensuur nie verkrygbaar was nie en omdat moeilik bekombare verbindings nodig was vir die bereiding daarvan.

A. Metodes.

1. Kultuuumstandighede.

Om goeie aerasie te verseker is die kulture opgemaak in 1-liter Fernbachflesse sodat 'n groter vloeistofoppervlak aan die lug blootgestel was. Die Fernbachflesse het elk 500 ml. vloeistof-medium van dieselfde samestelling soos gebruik vir die ophopingskulture bevat. Die aromatiese verbindings is bygevoeg in konsentrasies wat na 'n kort inkubasietydperk optimale selontwikkeling gegee het soos beskryf in hoofstuk IV (sien tabel 3).

voeg in tabel 3.

2. Sentrifugering van die selle.

Die bakterie-selle is na 'n bepaalde inkubasietydperk (sien tabel 3) versamel deur sentrifugering van die vloeistofkultuur in 50 ml. buise met 'n „Clay-Adams Angle centrifuge" by spoed no.4. Die selle is twee maal met gedistilleerde water gewas en daarna hersuspendeer in neutrale 0.1 M fosfaatbuffer (vgl. Piek 1952). Een ml. van die suspensie het $\pm$ 0.1 ml. kompakte nat selle bevat.

3. Die metode gevolg by die uitvoering van 'n eksperiment.

In elke manometerflessie is 1 ml. van die selsuspensie gebruik + 1.3 ml. van die 0.1 M fosfaat buffer (pH7.0); 0.5 ml. van 0.01 M (5 μ l.) substraat is na die 1^e lesing (10 min. na die begin van 'n eksperiment) uit die syarm bygevoeg; 0.2 ml. van 'n 2N KOH-oplossing is gebruik in die middelste buisie. Die totale volume vloeistof in die flessie was deurgaans 3 ml.

Die eksperimente is uitgevoer in 'n atmosfeer van lug by 'n temperatuur van 30°C. Die flessies is geskud in 'n tempo van 150 o.p.m.

Die suurstofopname is bepaal soos uiteengesit op bls 30 Die koolstofdiksiedvrystelling is bereken uit die drukveranderings in twee ooreenstemmende manometerflessies met en sonder KOH (sien bls.31).

4. Kwantitatiewe suurstofopname en koolstofdiksiedvrystelling per eenheid geoksideerde substraat.

Die aantal molekule suurstof wat gebruik is in die oksidasie van een molekule aromatiese verbinding en die aantal molekule koolstofdiksied vrygestel per molekule aromatiese verbinding, kan uit die resultate van die manometriese eksperimente bereken word en is weergegee in tabelle 17 en 18. Hierdie tabelle word op bls.44 nader bespreek.

Wanneer 'n oksideerbare substraat by die selle gevoeg word, vind 'n verhoogde suurstofopname plaas en toon die kromme vir die suurstofopname 'n steiler helling. Sodra die beskikbare substraat opgebruik is, sal die suurstofopname terugkeer tot dié van die endogene asemhaling en begin die kromme weer parallel loop met dié van die endogene asemhaling. Die verskil in suurstofopname van die manometerflessie met substraat en dié sonder substraat kan toegeskryf word aan die oksidasie van die substraat (sien Umbreit, Burris en Stauffer 1947). Op dieselfde manier is die koolstofdiksiedvrystelling van die substraat bereken.

B. Resultate.

1. Die oksidasie van enkel gesubstitueerde fenole en aromatiese sure.

a. Fenol.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.1 wat op 'n fenol-medium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee in teenwoordigheid van katechol (Sien tabel 4 en figuur 3). Op grond van die opeenvolgende induksietegniek kan aangeneem word dat fenol

voeg in tabel 4 en figuur 3

deur bakterie-isolaat no.1 direk tot katechol geoksideer word.

b. Bensoësuur.

Volgens die gegewens in tabel 4 en figuur 4 word bensoësuur deur bakterie-isolaat no.2 geoksideer tot katechol.

voeg in tabel 4 en figuur 4.

Bhat e.a. (1959) en Tchan (1946) het op grond van hulle studies met Pseudomonas spp. en Azotobacter spp. salisielsuur as 'n tussenproduk in die oksidasie van bensoësuur tot katechol bestempel. Vir bakterie-isolaat no.2 is geen aanduidings gevind dat salisielsuur 'n tussenproduk in die oksidasie van bensoësuur tot katechol

is nie. In teenwoordigheid van salisielsuur is slegs 'n klein suurstoftoenname waargeneem met die Warburg-tegniek. Met FeCl_3 kon salisielsuur nie in die kultuurvloeistof van 'n bensoësuurmedium waarop bakterie-isolaat no.2 gegroei het, aangetoon word nie. Bakterie-isolaat no.2 groei ook gladnie op 'n salisielsuurmedium nie.

c. Amandelsuur.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.3 wat op 'n amandelsuurmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee in teenwoordigheid van amandelsuur, bensaldehyd, bensoësuur en katechol (sien tabel 5 en figuur 5).

voeg in tabel 5 en figuur 5

Die hoeveelheid suurstof opgeneem toon dat amandelsuur geoksideer word tot bensaldehyd via 'n tussenproduk. Bensaldehyd word dan verder via bensoësuur tot katechol geoksideer. Stanier (1948) het vasgestel dat die tussenproduk in die oksidasie van amandelsuur tot bensaldehyd deur Ps. fluorescens bensoëlmieresuur was. Aangesien bensoëlmieresuur nie beskikbaar was nie kon nie vasgestel word of dit ook 'n tussenproduk in die oksidasie van amandelsuur deur bakterie-isolaat no.3 is nie.

Die bakteriële-oksidasie van fenol, bensoësuur en amandelsuur soos manometries vasgestel bevestig die werk wat deur Sleeper en Stanier (1950) met Ps.fluorescens gedoen is.

d. Tolueen.

Aktinomyceet-isolaat no.4 wat geïdentifiseer is as Nocardia sp., oksideer tolueen volgens dieselfde patroon wat Kitagawa (1956) vasgestel het vir Pseudomonas aeruginosa (sien bls. 8). Stanier het reeds (1947) vasgestel dat Ps.fluorescens bensielalkohol via bensaldehyd tot bensoësuur oksideer.

Gewaste selle wat op 'n tolueenmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname getoon in teenwoordigheid van bensielalkohol, bensaldehyd, bensoësuur en katechol (sien tabel 6 en figuur 6) omdat bensielalkohol net soos bensaldehyd baie vlugtig

voeg in tabel 6 en figuur 6

is, distilleer dit oor vanaf die syarm van die manometerflessie en veroorsaak nog voor die proef aan die gang gesit is 'n verhoogde suurstofopname.

Ten opsigte van tolueen het die organisme 'n afwykende gedrag getoon. Gedurende die eerste 10 minute na toevoeging van tolueen het die suurstofopname toegeneem, daarna het dit parallel verloop met die endogene asemhaling. Die Nocardia-selle het dus geen verdere verhoogde suurstofopname by teenwoordigheid van tolueen

getoon nie. Hierdie resultaat is by herhaling van die eksperiment bevestig. In die algemeen sou 'n dergelyke resultaat aan die impermeabiliteit van die selle vir die betrokke stof toegeskryf kan word. Met die oog op die sterk lipofiele geaardheid van tolueen, lyk 'n dergelyke verklaring in hierdie geval egter baie onwaarskynlik veral ook omdat die organisme goed groei op tolueen as enigste koolstofbron. 'n Ander verklaring kan op hierdie stadium nie gegee word nie en die probleem is nie verder vervolg nie.

2. Die oksidasie van para-, meta en orto-gesubstitueerde aromatiesse verbindings.

a. p-Kresol.

Smith, Jones en Evans (1950) en Dagley en Patel (1955, 1957) het vasgestel dat p-kresol deur Ps.fluorescens geoksideer word tot p-hidroksibensaldehyd, p-hidroksibensoësuur en 3,4-dihidroksibensoësuur. p-Kresol word waarskynlik op dieselfde manier geoksideer deur bakterie-isolaat no.5. Gewaste selle wat op p-kresolmedium gegroei het, het onmiddellik 'n verhoogde suurstofopname getoon in teenwoordigheid van p-kresol, p-hidroksibensaldehyd en p-hidroksibensoësuur(sien tabel 7 en figuur 7). Ook in teenwoordigheid

voeg in tabel 7 en figuur 7

van 3,4-dihidroksibensoësuur is onmiddellik 'n verhoogde suurstofopname waargeneem hoewel in 'n baie minder sterk mate. Omdat daar gedurende die hele periode van oksidasie geen vertragingfase voorgekom het nie, kan die oorsaak van die stadige oksidasie van 3,4-dihidroksibensoësuur eerder aan 'n impermeabiliteitseffek as aan die feit dat 3,4-dihidroksibensoësuur nie 'n tussenproduk in die oksidasie van p-kresol is nie, toegeskryf word.

Om seker te maak dat die afwykende suurstofopname nie aan 'n permeasie-effek toe te skryf is nie sou die oksidasie uitgevoer kan word met selvrye ensiemekstrakte of met behulp van met aseton ge-ekstraheerde droë selle. Gedurende die eksperimentele werk was die geriewe hiervoor ontoereikend.

'n Poging om selvrye ensiemekstrakte te berei met aluminiumoksied volgens die metode van McIlwain (1948) was nie suksesvol nie.

Wat betref die oksidasie van 3,4-dihidroksibensoësuur deur selvrye ensiemekstrakte van bakterieë wat op 'n p-kresolmedium gegroei het, moet rekening gehou word met die feit dat die ensiem wat verantwoordelik is vir die hidroksilering van p-hidroksibensoësuur baie labiel is (sien Dagley en Patel 1957). Gunter (1953) het reeds gevind dat selvrye ensiemekstrakte van Pseudomonas-soorte p-hidroksi-amandelsuur alleen oksideer tot by p-hidroksibensoësuur.

By hierdie ondersoek kan dus aangeneem word dat gedurende die bereiding van die selvrye ensiemekstrakte die hidroksileringsensiem onaktief geword het.

b. m-Kresol.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.6 wat op m-kresol-medium gegroei het, het slegs 'n onmiddellike verhoogde suurstofopname getoon met m-kresol (sien tabel 8 en figuur 8).

voeg in tabel 8 en figuur 8

Met m-hidroksibensaldehyd het 'n stadige verhoging van die suurstofopname plaasgevind, maar die kromme verloop amper parallel met dié vir die endogene asemhaling. Die m-hidroksibensaldehydoksidase met dieselfde isolaat wat op m-kresol gegroei het, word hieronder bespreek.

Eers ongeveer 60 minute nadat m-hidroksibensoësuur en 2,5-dihidroksibensoësuur by die selle gevoeg is, het 'n vinnige verhoging van die suurstofopname begin. Na 'n aanpassingstyd is daar dus adaptiewe ensieme vir die afbraak van m-hidroksibensoësuur en 2,5-dihidroksibensoësuur gevorm. Die optrede van 'n vertragingsperiode dui daarop dat m-hidroksibensoësuur en 2,5-dihidroksibensoësuur nie tussenprodukte van die afbraak van m-kresol deur bakterie-isolaat no.6 is nie.

In die oksidasie van m-kresol deur bakterie-isolaat no.6 kon dus geen tussenproduk deur die manometriese metode met heel selle vasgestel word nie.

Czekalowski en Skarzynski (1948) het melding gemaak van die oksidasie van m-kresol deur Achromobacter sp. In die literatuur kon egter geen besonderhede omtrent die oksidasie-verloop van m-kresol gevind word nie.

c. m-Hidroksibensaldehyd.

Omdat m-hidroksibensaldehyd manometries stadig geoksideer word deur gewaste selle wat geadapteer is aan m-kresol, is bakterie-isolaat no.6 geënt in 'n m-hidroksibensaldehydmedium. 'n Vinnige vermeerdering van selle het op hierdie medium plaasgevind en gewaste selle het 'n onmiddellike suurstofopname getoon met m-hidroksibensaldehyd, m-hidroksibensoësuur en 2,5-dihidroksibensoësuur in die Warburg-apparaat. (sien tabel 9 en figuur 9). Dit kan dus aangeneem

voeg in tabel 9 en figuur 9

word dat m-hidroksibensaldehyd deur bakterie-isolaat no.6 geoksideer word tot m-hidroksibensoësuur wat dan verder geoksideer word tot 2,5-dihidroksibensoësuur.

Die sterk suurstofopname met m-hidroksibensaldehyd deur dieselfde bakterie-stam wat gebruik is vir die oksidasie van m-kresol, wys daarop dat die swak suurstofopname met m-hidroksibensaldehyd in die vorige manometriese eksperimente nie aan 'n permeasie-effek te wyte was nie.

Die omsetting van m-hidroksibensoësuur tot 2,5-dihidroksebensoësuur is reeds vasgestel deur Walker en Evans (1952) wat gewerk het met Pseudomonas spp.

In kulture van Vibrio 0/1 het Evans (1947) 3,4-dihidroksebensoësuur geïsoleer as oksidasie-produk van m-hidroksibensoësuur. Selle van bakterie-isolaat no.6 wat geadaptee is aan m-hidroksibensaldehyd het 'n vertragsperiode getoon met 3,4-dihidroksibensoësuur. Laasgenoemde kan dus nie as tussenproduk in die oksidasie van m-hidroksibensaldehyd deur bakterie-isolaat no.6 beskou word nie.

d. o-Hidroksibensoësuur (salisielsuur.)

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.7 wat op 'n salisielsuurmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee met salisielsuur en 2,5-dihidroksibensoësuur (sien tabel 10 en figuur 10). Die suurstofopname met katechol was feitlik die-

voeg in tabel 10 en figuur 10

selfde as die endogene asemhaling. Salisielsuur word dus geoksideer tot 2,5-dihidroksibensoësuur deur bakterie-isolaat no.7 terwyl katechol nie as 'n tussenproduk in die omsetting van salisielsuur beskou kan word nie.

Walker en Evans (1952) het gevind dat salisielsuur deur 'n Ps. fluorescens stam omgesit word tot katechol en nie tot enige van die di-hidroksibensoësure nie. Die oksidasie van salisielsuur tot katechol is bevestig deur Roof, Lannon en Turner (1953) wat gewerk het met gram-negatiewe bakterieë.

Die alternatiewe oksidasie van aromatiese verbindings deur mikro-organismes is nie onbekend nie. Henderson (1957) het bv. vasgestel dat p-metoksifenol sowel as 3,4-dihidroksibensoësuur gevorm word uit p-metoksibensoësuur.

Uit bogenoemde gegewens kan die gevolgtrekking gemaak word dat daar moontlik twee meganismes bestaan vir die oksidasie van salisielsuur nl. 'n oksidatiewe dekarboksilasie analoog aan die oksidasie van bensoësuur en tweedens 'n hidroksilering in die vyfde posisie van die aromatiese kern soos by die mikrobiale oksidasie van m-hidroksibensoësuur vasgestel is.

e. o-Kresol.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.8 wat op 'n o-kresolmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee

met o-kresol, salisielalkohol en katechol (sien tabel 11 en figuur 11)

voeg in tabel 11 en figuur 11

Met salisielaldehyd, salisielsuur en 2,5-dihidroksibensoësuur is 'n vertraagde suurstofopname waargeneem. Salisielalkohol en katechol kan dus beskou word as tussenprodukte in die afbraak van o-kresol terwyl salisielaldehyd, salisielsuur en 2,5-dihidroksibensoësuur op grond van hierdie waarnemings nie as sodanig opgevat kan word nie. Die moontlike verdere afbraak van salisielalkohol deur hierdie organisme word in die volgende paragraaf beskryf.

f. Salisielalkohol(saligenien).

Ten einde die moontlike verdere afbraak van salisielalkohol nader te bestudeer is bakterie-isolasie no.8 geënt in 'n salisielalkoholmedium en na twee dae inkubasie is die selle afgesentrifugeer. Die gewaste selle het nie net 'n onmiddellike suurstofopname getoon met salisielalkohol en katechol nie, maar ook met salisielaldehyd en salisielsuur (sien tabel 12 en figuur 12).

voeg in tabel 12 en figuur 12

Die hoeveelheid suurstof opgeneem dui daarop dat in hierdie geval, salisielalkohol via salisielaldehyd geoksideer word tot salisielsuur wat dan verder, waarskynlik deur verskillende ensieme, afgebreek kan word of tot katechol of tot 2,5-dihidroksibensoësuur.

Waar dieselfde bakterie-isolaat o-kresol oksideer tot salisielalkohol (kyk onder e), is dit waarskynlik dat die verdere omsetting van laasgenoemde plaasvind via salisielaldehyd en salisuur soos hierbo beskryf.

3. Die oksidasie van polifenole.

Die enigste polifenol wat ondersoek is, is syringasuur.

a. Syringasuur.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.9 wat op 'n syringasuurmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname getoon met syringasuur en gallussuur (sien tabel 13 en figuur 13). Volgens

voeg in tabel 13 en figuur 13.

hierdie resultate is gallussuur dus 'n afbraakproduk van syringasuur. Daar was geen geleentheid om die afbraak van gallussuur verder te vervolg nie.

Henderson en Farmer (1955) kon geen verdere oksidasieproduk in die oksidasie van syringa-aldehyd tot syringasuur deur fungi identifiseer nie.

4. Die oksidasie van aromatiese metoksielverbindings.

Aromatiese metoksielverbindings is van belang as moontlike lignienboustene.

(a) Guaiakol (o-metoksifenol).

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.10 wat op 'n guaiakolmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname getoon met guaiakol en katechol(sien tabel 13 en figuur 14). Guaiakol

voeg in tabel 13 en figuur 14

word dus gedemetileer tot katechol. Behalwe dat Happold (1930) melding gemaak het van die bakteriële afbraak van guaiakol kon geen besonderhede oor die oksidasie van guaiakol in die literatuur gevind word nie.

(b) Anysaldehyd (p-metoksibensaldehyd).

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.11 wat op anysaldehydmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname getoon met anysaldehyd, anyssuur, p-hidroksibensoësuur en 3,4-dihidroksibensoësuur (sien tabel 14 en figuur 15.) Volgens die hoeveelheid

voeg in tabel 14 en figuur 15

suurstof opgeneem, word anysaldehyd geoksideer tot anyssuur. Anyssuur word dan verder via p-hidroksibensoësuur tot 3,4-dihidroksibensoësuur geoksideer.

Die omsetting van anyssuur deur bakterie-isolaat no.11 stem ooreen met dié wat Henderson (1957) vasgestel het vir fungi.

(c) Vanillien.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.12 wat op 'n vanillienmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee met vanillien, vanilliensuur en 3,4-dihidroksibensoësuur (sien tabel 15 en figuur 16.) Volgens die hoeveelheid suurstof opgeneem word

voeg in tabel 15 en figuur 16

vanillien via vanilliensuur geoksideer tot 3,4-dihidroksibensoësuur.

Henderson en Farmer (1955) het vasgestel dat fungi vanillien oksideer tot vanilliensuur.

(d) Veratrumaldehyd.

Gewaste selle van bakterie-isolaat no.13 wat op 'n veratrumaldehydmedium gegroei het, het 'n onmiddellike suurstofopname gegee met veratrumaldehyd, veratrumsuur, vanilliensuur en 3,4-dihidroksibensoësuur (sien tabel 16 en figuur 17). Volgens die

voeg in tabel 16 en figuur 17

hoeveelheid suurstof opgeneem word die aldehyd geoksideer tot die suur wat dan via vanilliensuur volledig gedemetileer word tot 3,4-dihidroksibensoësuur.

Henderson (1957) het vasgestel dat fungi veratrum-suur demetileer tot vanilliensuur.

5. Kwantitatiewe suurstofopname en koolstofdiksiedvrystelling per eenheid geoksideerde substraat.

Die aantal molekule suurstof opgeneem en koolstofdiksied vrygestel by die oksidasie van die aromatiese verbindings deur die geïsoleerde bakterieë en aktinomyceet is bereken (metode op bls.) en weergegee in tabelle 17 en 18.

voeg in tabelle 17 en 18

Uit die berekenings kon die volgende afleidings gemaak word:

By die afbraak van 'n aromatiese verbindings het die aantal molekule suurstof wat gebruik is, met die opeenvolging van tussenprodukte afgeneem. Die rangskikking van tussenprodukte in die afbraakpad van 'n aromatiese verbinding is dus volgens die aantal molekule suurstof opgeneem, bepaal.

Uit die berekenings vir koolstofdiksiedvrystelling kon die dekarboksilasie-reaksies vasgestel word. Die dekarboksilasie-produk het 1 molekule CO_2 minder vrygestel as die voorafgaande produk, vgl. die reaksies bensoësuur $\rightarrow$ katechol, salisielsuur $\rightarrow$ katechol en guaiakol $\rightarrow$ katechol.

Die suurstofopname en koolstofdiksiedvrystelling vir 'n bepaalde substraat het verskil by die oksidasie deur verskillende organismes. Die rede mag wees dat die terminale oksidasie verskillend is by die verskillende organismes. In al die gevalle is die substraat nie volledig geoksideer nie en is dus òf in die medium agterblywend as gistingprodukt òf as bouwsteen gebruik.

TABEL 3.

KULTUUMOMSTANDIGHEDEN VIR WARBURG-EKSPERIMENTE.

Medium	Konsentrasie aromatiese verb. uitgedruk in persent.	Aantal dae in- kubasie voor War- burg-eksperiment.
Fenol	0.05	2
Bensoësuur	0.10	2
Amandelsuur	0.10	5
Tolueen	1.00	3
p-Kresol	0.03	2
m-Kresol	0.03	2
m-Hidroksibensaldehyd	0.05	2
Salisielsuur	0.10	2
o-Kresol	0.03	2
Salisielalkohol	0.05	2
Syringasuur	0.10	3
Guaiakol	0.05	2
Anysaldehyd	0.05	3
Vanillien	0.10	3
Veratrumaldehyd	0.05	3

TABEL 4.

DIE OKSIDASIE VAN FENOL EN BENSOËSUUR ONDERSKEIDELIK DEUR
BAKTERIE-ISOLATE NOS. 1 & 2.

No.1 : 2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% fenolmedium.
No.2 : 2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.1% bensoësuurmedium.

Tyd in mi- nute	Suurstofopname in pliters.						
	Stam no.1.			Stam no.2.			
	Endogene asemhaling	5 µ Mole Fenol	5 µ Mole Katechol	Endo- gene asem- haling	5 µ Mole bensoë- suur	5 µ Mole Kate- chol	5 µ Mole Salisiel- suur
10	1.2	2.2.	2.2	3.3	3.0	3.5	3.2
20	2.5	72.1	61.9	6.4	32.9	60.2	6.5
30	3.6	146.5	116.0	7.5	61.5	115.4	8.1
40	4.1	208.6	167.2	8.6	90.7	164.3	9.3
50	4.8	281.9	217.4	9.7	122.1	170.2	10.4
60	6.0	348.5	260.8	11.8	150.1	178.5	12.7
70	7.2	406.2	301.0	12.8	176.2	185.6	13.8
80	8.4	420.7	326.7	13.9	209.4	191.5	14.2
90	10.7	435.1	342.2	14.9	239.6	196.3	15.4
100	11.9	446.2	354.5	17.0	274.5	202.2	16.7
110	13.0	456.1	365.7	17.1	307.0	208.2	18.1
120	14.2	474.0	386.8	18.2	342.1	210.6	19.5
130	15.5	490.6	391.3	20.3	375.9	215.4	20.9
140	19.0	506.2	396.2	21.4	406.5	219.0	22.8
150	20.2	514.0	401.8	21.5	412.1	222.5	24.4
160	21.4	536.0	407.0	22.0	416.6	226.1	26.0

TABEL 5.

DIE OKSIDASIE VAN AMANDELSUUR DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 3.

5 dae geïnkubeer by 30°C in 0.1% amandelsuurmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.				
	Endogene Respirasie	5 μ Mole amandel-suur	5 μ Mole bensalde-hied	5 μ Mole bensoësuur	5 μ Mole katechol
10	5.6	5.5	34.6	21.5	12.5
20	11.1	70.9	103.9	65.7	77.7
30	16.7	147.2	159.1	114.2	144.1
40	22.3	223.5	217.5	165.9	172.9
50	27.8	307.1	282.3	223.0	186.6
60	33.4	385.5	354.9	289.8	203.0
70	39.0	457.5	414.4	346.9	215.5
80	44.6	538.0	485.7	416.9	229.3
90	50.2	607.8	538.8	471.9	243.1
100	56.8	685.2	587.5	531.0	256.8
110	61.3	755.1	609.0	569.9	269.4
120	66.9	826.0	625.5	590.3	283.1
130	72.4	882.8	639.5	602.2	294.4
140	76.9	911.6	651.3	614.6	309.4
150	82.5	935.0	658.9	619.4	321.8
160	86.9	964.0	666.5	627.1	334.5

TABEL 6.

DIE OKSIDASIE VAN TOLUEEN DEUR AKTINOMYCEET-ISOLAAT NO. 4.

3 Dae geïnkubeer by 30°C in 1.0% tolueenmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.					
	Endogene Asemha-ling	5 μ Mole tolueen	5 μ Mole bensiel-alkohol	5 μ Mole bensalde-hied	5 μ Mole bensoë-suur	5 μ Mole katechol
15	8.9	8.7	31.7	29.6	9.6	7.3
30	16.4	31.3	71.7	81.5	28.4	29.3
45	22.3	38.8	110.5	122.8	63.5	58.7
60	26.8	44.5	147.8	155.3	103.6	83.6
75	29.7	48.8	185.2	188.0	140.3	117.3
90	32.5	53.2	216.5	213.2	180.4	151.1
105	35.6	56.0	244.9	238.3	320.9	187.7
120	38.7	60.3	268.8	260.5	260.5	219.1
135	40.1	63.2	294.3	287.2	309.0	221.5
150	43.3	66.1	318.3	312.3	319.0	228.8
165	46.1	68.9	323.4	336.0	324.0	231.7
180	49.1	73.3	366.0	362.5	329.0	239.1
195	50.5	76.1	386.7	366.3	334.0	243.5
100	53.4	79.1	404.8	402.5	339.1	246.4
115	56.1	81.9	416.7	410.0	341.5	250.4
130	58.1	84.8	421.1	414.5	345.7	252.3

TABEL 7.

DIE OKSIDASIE VAN P-KRESOL DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 5.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.03% p-kresolmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.				
	Endogene asemhaling	5 μ Mole p-kresol	5 μ Mole p-OHbensal-dehied.	5 μ Mole p-OHbensoë-suur	5 μ Mole 3,4-diOH-bensoësuur
10	7.8	7.4	5.4	8.6	7.3
20	16.8	128.1	120.5	118.5	35.1
30	23.4	239.3	219.7	211.2	58.9
40	30.2	336.7	294.3	285.4	79.0
50	37.9	431.0	361.3	352.2	101.5
60	44.6	528.4	425.2	403.9	124.0
70	50.2	565.4	463.0	444.9	141.6
80	56.9	603.7	511.8	496.6	164.2
90	64.7	631.1	552.9	537.5	198.0
100	69.1	648.2	572.4	560.2	215.7
110	75.8	670.4	581.1	575.1	238.1
120	79.1	681.0	604.7	580.0	250.5
130	83.6	693.6	614.5	592.6	268.1
140	88.1	708.4	621.2	598.9	275.6
150	93.7	712.7	628.7	607.5	291.9
160	100.3	722.3	636.2	614.1	312.0

TABEL 8.

DIE OKSIDASIE VAN m-KRESOL DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 6.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% m-kresolmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.				
	Endogene asemhaling	5 μ Mole m-kresol	5 μ Mole m-OHbensal-dehied	5 μ Mole m-OHbensoë-suur	5 μ Mole 2,5-diOHbensoësuur
10	10.0	9.5	8.7	8.9	10.0
20	24.5	67.8	36.8	22.2	22.6
30	34.6	137.7	56.3	32.2	33.8
40	43.5	210.8	73.7	43.3	46.3
50	52.4	292.2	87.6	52.2	60.1
60	61.3	382.3	101.7	65.5	77.7
70	70.2	472.3	115.8	82.1	99.0
80	78.0	549.6	127.6	103.2	121.5
90	89.2	639.6	143.9	143.2	162.9
100	100.3	671.4	158.0	189.8	206.7
110	109.2	684.2	169.8	245.3	252.3
120	117.0	695.8	180.7	297.5	304.5
130	124.8	706.3	190.4	360.8	357.1
140	130.4	714.8	198.0	405.2	400.9
150	137.1	723.1	206.6	450.6	449.8
160	143.8	731.8	217.5	496.2	494.9

TABEL 9.

DIE OKSIDASIE VAN M-HIDROKSIBENSALDEHIED DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 6.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% m-hidroksibensaldehydmedium

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters				
	Endogene asemhaling	5 μ Mole m-hidroksibensaldehyd	5 μ Mole m-hidroksibensoësuur	5 μ Mole 2,5-dihi-droksi-bensoësuur	5 μ Mole 3,4-dihi-droksiben-soësuur
10	7.8	8.6	6.6	7.7	7.5
20	16.7	66.1	47.7	49.6	20.6
30	26.7	124.6	91.0	95.9	35.7
40	35.7	186.2	137.7	144.3	55.2
50	42.4	247.8	185.3	186.3	75.7
60	50.2	306.3	244.6	230.5	100.7
70	58.0	367.5	315.6	270.4	129.8
80	65.8	427.0	381.3	310.2	163.4
90	73.6	488.9	438.4	326.3	200.2
100	81.3	547.7	496.7	339.3	244.5
110	89.2	607.2	554.9	351.2	296.5
120	97.0	625.0	581.5	361.9	333.0
130	119.2	636.0	590.8	372.8	350.1
140	111.5	642.7	599.2	384.8	362.5
150	104.2	652.9	606.7	395.1	375.9

TABEL 10.

DIE OKSIDASIE VAN SALISIËLSUUR DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 7.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.1% salisiëlsuurmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters			
	Endogene asemhaling	5 μ Mole salisiëlsuur	5 μ Mole katechol	5 μ Mole 2,5-diOHben-soësuur
10	12.2	9.5	10.7	10.8
20	24.5	115.4	23.7	111.4
30	37.9	221.3	38.8	215.3
40	50.2	313.4	48.5	299.7
50	60.2	410.9	61.4	338.6
60	72.4	505.2	75.4	355.9
70	83.6	549.6	84.0	368.7
80	93.7	567.6	94.8	378.7
90	103.7	579.3	103.4	389.5
100	113.7	594.1	117.4	402.4

TABEL 11.

DIE OKSIDASIE VAN o-KRESOL DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 7.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.03% o-cresolmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters						
	Endogene asemhaling	5 μ Mole o-Kresol	5 μ Mole salisiel-alkohol	5 μ Mole salisiel-aldehyd	5 μ Mole salisiel-suur	5 μ Mole Katechol	5 μ Mole 2,5-di-Hoben-soësuur
10	14.3	13.0	13.0	20.0	15.0	12.1	13.7
20	30.1	70.9	57.3	45.1	30.2	81.4	31.3
30	42.3	138.8	110.4	65.5	50.6	157.3	45.1
40	55.7	207.6	159.1	83.2	74.3	223.3	62.7
50	68.0	278.6	204.5	101.1	100.2	279.4	78.9
60	79.2	351.6	252.2	117.8	129.3	326.8	95.2
70	89.2	428.9	303.0	138.0	161.5	346.5	112.7
80	99.2	505.2	352.7	160.6	197.2	370.7	129.0
90	109.2	554.4	413.3	191.5	235.9	389.4	149.1
100	118.1	574.5	461.8	222.5	280.1	405.9	166.6
110	126.0	591.4	484.8	253.4	312.4	419.1	185.5
120	134.9	608.3	500.9	286.7	358.7	433.4	205.4
130	143.8	621.2	515.0	323.7	407.1	445.5	224.3
140	151.6	635.9	529.0	359.3	459.9	456.5	241.8
150	158.3	647.6	539.9	385.5	502.0	465.3	260.6
160	165.0	659.2	550.7	398.6	555.8	475.2	280.6
170	172.8	571.9	561.5	410.5	592.6	486.2	300.7

TABEL 12.

DIE OKSIDASIE VAN SALISIELALKOHOL DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO.8.

2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% salisielalkoholmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters					
	Endogene asemhaling	5 μ Mole salisiel-alkohol	5 μ Mole salisiel-aldehyd	5 μ Mole salisiel-suur	5 μ Mole katechol	5 μ Mole 2,5-di-OH-bensoësuur
10	8.9	8.5	7.6	11.6	9.6	8.3
20	19.9	96.9	68.7	91.0	83.7	50.0
30	29.9	197.1	132.0	174.3	149.3	95.0
40	37.9	291.8	200.2	250.8	217.1	139.2
50	47.9	378.1	270.6	313.0	277.4	185.7
60	55.8	452.7	337.6	361.8	301.8	226.1
70	63.5	530.4	406.8	385.1	314.6	265.4
80	71.3	592.3	477.5	395.1	325.1	303.4
90	79.1	631.7	519.2	406.2	335.7	337.9
100	85.8	650.7	530.4	416.2	345.2	349.7

TABEL 13.

DIE OKSIDASIE VAN SYRINGASUUR EN GUAIAKOL ONDERSKEIDELIK
DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NOS. 9 EN 10.

Stam no. 9 : 3 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.1% syringasuurmedium.
Stam no. 10 : 2 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% guaiakolmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters					
	Stam no. 9			Stam no. 10		
	Endogene asemhaling	5 μ Mole syringasuur	5 μ Mole gallus-suur	Endogene asemhaling	5 μ Mole guaiakol	5 μ Mole Katechol
10	7.7	7.4	7.6	10.0	18.6	11.0
20	13.3	54.0	30.3	22.8	69.0	87.4
30	19.0	105.9	55.2	33.8	129.2	167.2
40	23.4	159.9	77.9	42.6	169.7	233.2
50	27.8	213.9	100.7	48.9	212.4	269.5
60	31.2	277.4	122.3	57.6	256.3	299.2
70	35.7	332.5	143.9	65.2	299.0	322.3
80	39.0	390.7	165.5	72.7	342.8	342.1
90	42.4	439.4	185.0	81.5	387.7	365.1
100	46.8	487.2	207.7	87.7	430.4	383.9
110	50.2	528.4	230.4	91.4	472.1	400.4
120	53.5	558.1	248.8	97.7	513.7	418.0
130	58.0	575.0	266.2	101.5	549.8	433.0
140	61.3	581.5	281.3	105.2	584.8	447.7
150	64.7	586.6	296.5	110.3	606.7	462.0
160	69.6	593.7	311.0	115.3	623.2	476.3

TABEL 14.

DIE OKSIDASIE VAN ANYSALDEHIED DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO.11.

3 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% anysaldehydmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters				
	Endogene asemhaling	5 μ Mole anysaldehyd	5 μ Mole anyssuur	5 μ Mole p-OHbensoësuur	5 μ Mole 3,4-di-OH-bensoësuur
10	14.8	16.9	16.4	13.5	14.0
20	27.8	112.3	106.0	105.5	137.8
30	39.0	207.8	200.2	202.1	265.6
40	49.0	290.5	283.4	296.2	375.8
50	58.0	374.2	366.8	384.6	453.5
60	69.0	458.0	452.3	471.9	484.7
70	79.1	533.2	532.3	554.7	506.2
80	88.1	616.9	620.0	591.4	521.2
90	94.8	691.0	662.5	603.3	531.3
100	103.7	759.0	697.4	614.1	540.0
110	109.2	813.0	718.0	621.6	551.3
120	116.0	832.2	733.6	630.2	562.4
130	121.5	843.7	741.2	635.6	566.2
140	126.2	859.1	750.8	643.2	578.9
150	132.0	865.8	759.1	652.1	587.2
160	137.2	872.2	768.3	660.8	597.4

TABEL 15.

DIE OKSIDASIE VAN VANILLIEN DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO. 12.

3 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.1% vanillienmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.			
	Endogene asemhaling	5 μ Mole vanillien	5 μ Mole vanilliensuur	5 μ Mole 3,4-diOH-bensoësuur
10	12.2	11.7	11.9	11.8
20	23.4	75.2	60.6	100.2
30	29.0	150.4	118.0	201.4
40	35.7	216.1	175.7	285.4
50	43.5	279.6	230.4	345.7
60	49.1	342.1	280.1	391.0
70	55.8	405.6	340.8	437.3
80	61.3	460.7	396.1	476.1
90	66.9	517.8	452.3	505.3
100	71.4	565.4	505.3	518.1
110	76.9	623.7	558.2	528.9
120	82.5	677.8	609.1	540.8
130	88.1	730.7	665.5	548.3
140	93.7	774.1	709.8	555.8
150	98.0	812.3	741.1	562.3
160	101.4	822.8	749.8	567.6

TABEL 16.

DIE OKSIDASIE VAN VERATRUMALDEHIED DEUR BAKTERIE-ISOLAAT NO.13.

3 Dae geïnkubeer by 30°C in 0.05% veratrumaldehydmedium.

Tyd in minute	Suurstofopname in μ liters.				
	Endogene asemhaling	5 μ Mole veratrumaldehyd	5 μ Mole veratrum-suur	5 μ Mole vanillien-suur	5 μ Mole 3,4-diOH-bensoësuur
10	11.1	10.6	6.5	6.5	7.0
20	20.1	69.9	66.0	66.8	80.2
30	26.8	140.9	134.2	133.6	156.7
40	34.5	208.6	202.3	199.3	232.4
50	40.1	273.2	272.7	263.9	308.2
60	45.7	334.7	338.6	328.6	377.1
70	50.2	401.4	405.7	392.1	430.8
80	54.6	467.8	465.2	449.1	467.3
90	59.1	536.9	518.2	504.1	486.9
100	63.5	600.5	568.0	552.6	506.8
110	68.0	656.3	616.7	595.7	520.5
120	72.5	703.3	665.5	636.6	530.4
130	76.9	757.7	713.1	662.5	540.2
140	81.4	813.0	762.8	684.1	551.0
150	84.7	854.8	789.1	702.8	560.0
160	88.9	878.4	813.2	718.7	569.5

TABEL 17.

AANTAL MOLEKULE SUURSTOF OPGENEEM PER MOLEKUUL GEOKSIDEERDE
AROMATIESE VERBINDING.

Bak- terie iso- lasie no.	Geadapt- teer aan	Oksideer 5 mikromole van	pl.O ₂ - opname met sub- straat	pl.O ₂ - opname sonder sub- straat	pl.O ₂ - opname vir sub- straat alleen	μ Mole O ₂ -op- name vir sub- straat alleen	Molekule O ₂ -opna- me per moleku- le sub- straat
1	Fenol	Fenol Katechol	406 350	8 10	398 340	17.77 15.18	3.55 3.04
2	Bensoë- suur	Bensoësuur Katechol	405 170	18 5	387 165	17.27 7.37	3.45 1.47
3	Amandel- suur	Amandelsuur Bensaldehyd Bensoësuur Katechol	850 620 585 160	70 60 65 20	780 560 510 140	35.02 25.00 22.76 5.12	7.00 5.00 4.55 1.02
4	Tolueen	Bensielalkohol Bensaldehyd Bensoësuur Katechol	418 404 318 218	54 54 40 38	364 350 278 180	16.25 15.62 12.41 8.07	3.25 3.12 2.49 1.51
5	p-Kresol	p-Kresol p-Hidroksibensalde- hied p-Hidroksibensoësuur 3,4-DiOH-bensoësuur	613 572 565 -	50 64 65 -	563 508 500 -	25.13 22.59 22.32 -	5.03 4.52 4.47 -
6	m-Kresol	m-Kresol	658	98	560	25.00	5.00
6	m-OH- bensalde- hied	m-Hidroksibensalde- hied m-Hidroksibensoësuur 2,5-DiOH-bensoësuur	612 560 305	100 90 70	512 470 235	22.85 20.98 10.49	4.57 4.19 2.09
7	Salisiel- suur	Salisielsuur 2,5-DiOH-bensoësuur	530 335	75 55	455 280	20.31 12.50	4.06 2.50
8	Saligenien	Saligenien Salisielaldehyd Salisielsuur Katechol 2,5-DiO -bensoësuur	625 515 375 290 330	70 75 44 45 85	550 440 331 235 245	24.82 19.64 15.00 10.48 10.93	4.98 3.93 3.00 2.09 2.18
9	Syringa- suur	Syringasuur Gallussuur	570	50	520	23.21	4.64
10	Guaiakol	Guaiakol Katechol	610 400	105 56	505 344	22.50 15.35	4.50 3.07

TABEL 17 (VERVOLG)

Bak- terie iso- lasie no.	Geadapteer aan	Oksideer 5 mikro- mole van	$\mu\text{l.O}_2$ - opname met sub- straat	$\mu\text{l.O}_2$ - opname sonder sub- straat	$\mu\text{l.O}_2$ - opname vir sub- straat alleen	μ Mole O_2 -op- name vir sub- straat alleen	Molekule O_2 -opna- me per moleku- le sub- straat
11	Anysalde- hied	Anysaldehyd	825	105	720	32.14	6.42
		Anyssuur	710	100	610	27.19	5.44
		p-Hidroksibensoësuur	595	80	515	22.10	4.42
		3,4-DiOH-bensoësuur	490	56	434	19.38	3.88
12	Vanillien	Vanillien	812	94	718	23.05	6.41
		Vanilliensuur	710	90	620	27.63	5.52
		3,4-DiOH-bensoësuur	508	60	448	20.00	4.00
13	Veratrum- aldehyd	Veratrumaldehyd	865	90	775	34.60	6.92
		Veratrumsuur	800	80	720	32.14	6.43
		Vanilliensuur	700	80	620	27.63	5.52
		3,4-DiOH-bensoësuur	490	42	448	20.00	4.00

TABEL 18.

AANTAL MOLEKULE KOOLSTOFDIOKSIED VRYGESTEL PER MOLEKUUL GEOKSI-
DEERDE AROMATIESE VERBINDING.

Bak- terie iso- lasie no.	Geada- pter aan	Oksideer 5 mikromole van	μl.CO ₂ vry- stel- ling met sub- straat	μl.CO ₂ vry- stel- ling sonder sub- straat	μl.CO ₂ vry- stel- ling vir sub- straat alleen	μ Mole CO ₂ - vrystel- ling vir sub- straat alleen	Mole- kule CO ₂ - vrystel- ling per mole- kule sub- straat
1	Fenol	Fenol Katechol	128.5 119.2	4.9 3.6	123.6 115.6	5.52 5.11	1.10 1.02
2	Bensoësuur	Bensoësuur Katechol	255.8 94.8	29.8 19.0	226.8 113.8	10.00 5.08	2.00 1.01
3	Amandelsuur	Amandelsuur Bensaldehyd Bensoësuur Katechol	515.5 380.4 386.6 242.0	62.4 43.1 44.8 15.1	543.1 337.3 341.8 226.9	20.15 15.06 15.27 10.13	4.03 3.01 3.05 2.02
5	p-Kresol	p-Kresol p-Hidroksibensaldehyd p-Hidroksibensoësuur 3,4-DiOH-bensoësuur	262.8 312.4 357.0	33.1 33.1 30.0	229.7 279.3 327.0	10.22 12.47 14.70	2.04 2.49 2.94
6	m-Kresol	m-Kresol	281.3	55.2	226.1	10.09	2.02
6	m-OHbensal- dehyd	m-Hidroksibensaldehyd m-Hidroksibensoësuur 2,5-DiOH-bensoësuur	345.8 365.4 378.6	53.6 48.2 40.0	292.2 317.2 338.6	13.05 14.16 15.11	2.61 2.83 3.02
7	Salisiel- suur	Salisielsuur 2,5-DiOH-bensoësuur	278.1 264.5	45.3 28.9	232.8 235.6	10.03 10.52	2.00 2.10
8	Saligenien	Saligenien Salisielaldehyd Salisielsuur Katechol 2,5-DiOH-bensoësuur	268.5 277.9 269.9 158.2 271.1	41.2 43.6 32.3 33.5 39.1	227.3 234.3 237.6 124.7 232.0	10.15 10.46 10.61 5.57 10.36	2.03 2.09 2.18 1.11 2.07
9	Syringasuur	Syringasuur Gallussuur	367.2	29.8	337.4	15.07	3.01
10	Guaiakol	Guaiakol Katechol	285.0 142.5	61.0 30.5	224.0 112.0	10.00 5.00	2.00 1.00
11	Anysalde- hied	Anysaldehyd Anyssuur p-Hidroksibensoësuur 3,4-DiOH-bensoësuur	395.2 400.4 268.0 255.5	58.6 56.7 49.3 30.5	336.6 343.7 228.7 225.0	15.03 15.35 10.21 10.05	3.00 3.07 2.04 2.01

TABEL 18 (VERVOLG)

Bak- terie iso- lasie no.	Geadap- teer aan	Oksideer 5 mikromole van	ul.CO ₂ - vry- stel- ling met sub- straat	ul.CO ₂ - vry- stel- ling sonder sub- straat	ul.CO ₂ - vry- stel- ling vir sub- straat alleen	μ Mole CO ₂ - vrystel- ling vir sub- straat alleen	Mole- kule CO ₂ - vrystel- ling per mole- kule sub- straat
12	Vanillien	Vanillien	390.5	51.4	338.7	15.12	3.02
		Vanilliensuur	385.4	49.2	336.2	15.01	3.00
		3,4-DiOH-bensoësuur	263.3	35.6	227.7	10.17	2.03
13	Veratrum- aldehyd	Veratrumaldehyd	508.1	53.2	454.9	20.31	4.06
		Veratrumsuur	503.6	46.3	457.3	20.42	4.08
		Vanilliensuur	386.1	45.7	340.4	15.20	3.04
		3,4-DiOH-bensoësuur	250.6	25.6	225.0	10.05	2.01

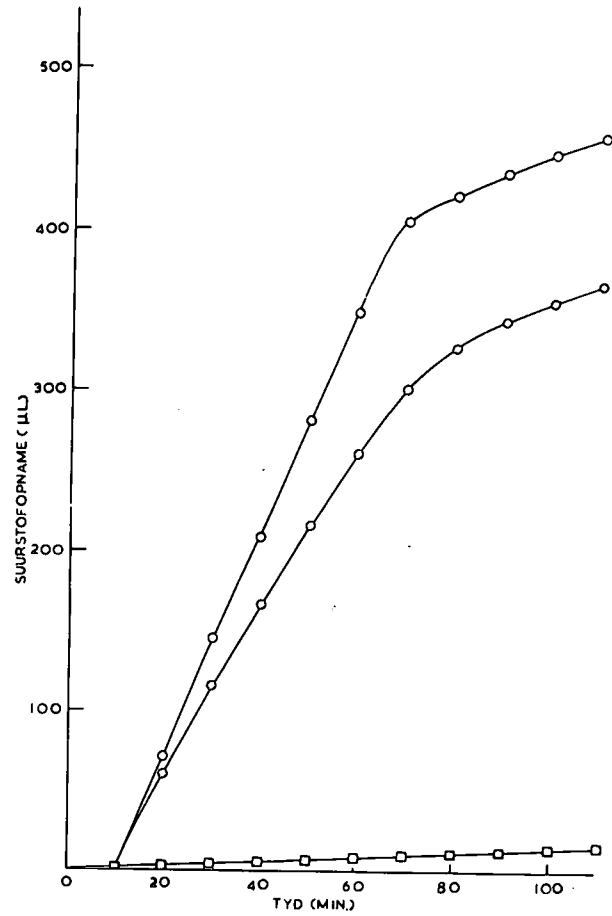


FIG. 3. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 1 WAT OP 'N FENOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = FENOL; ○ = KATECHOL.

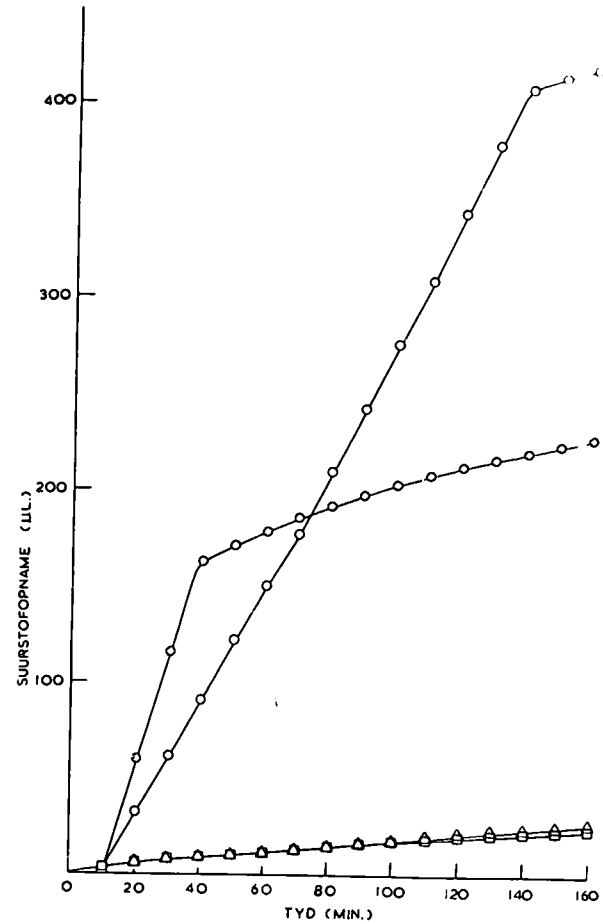


FIG. 4. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 2 WAT OP 'N BENSOËSUUR-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = BENSOËSUUR; ○ = KATECHOL;
△ = SALISIËLSUUR.

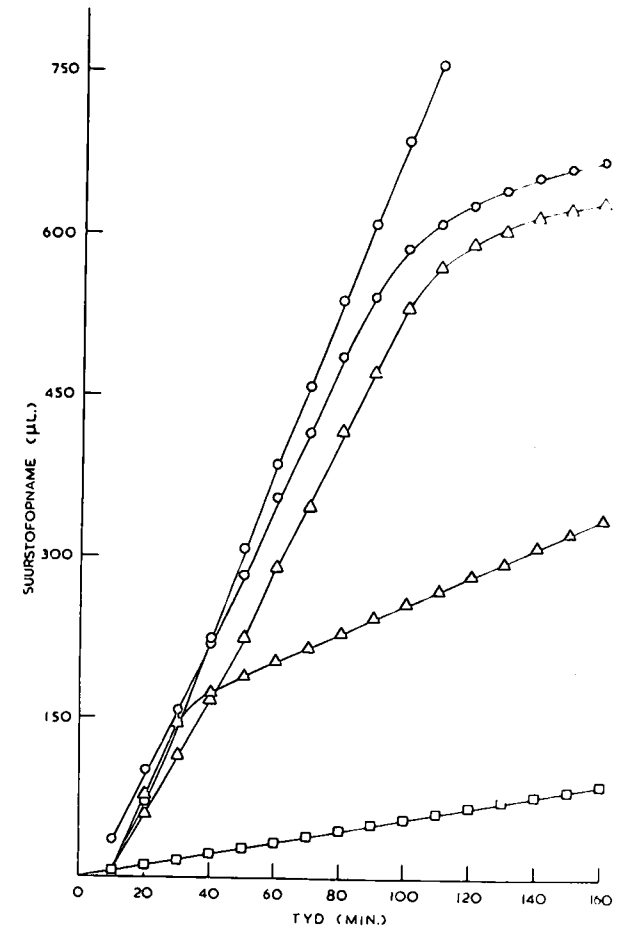


FIG. 5. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 3 WAT OP 'N AMANDELSUUR-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = AMANDELSUUR; ○ = BENSOËSUUR;
△ = KATECHOL.

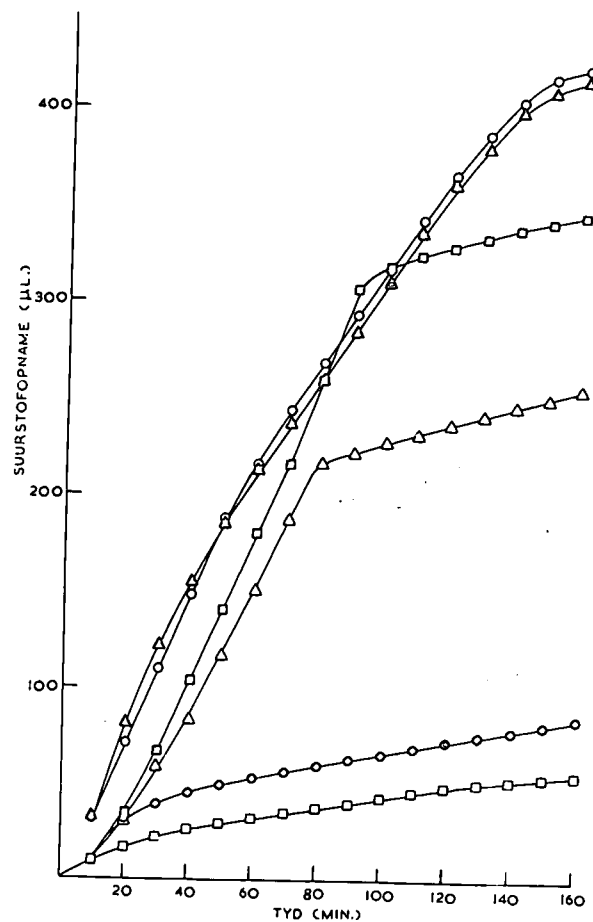


FIG. 6. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR AKTINOMYCEET-ISOLAAT N^o 4 WAT OP 'N TOLUEEN-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = TOLUEEN; ○ = BENZIELALKOHOL;
 △ = BENSALDEHIED; □ = BENSOËSUUR; △ = KATECHOL.

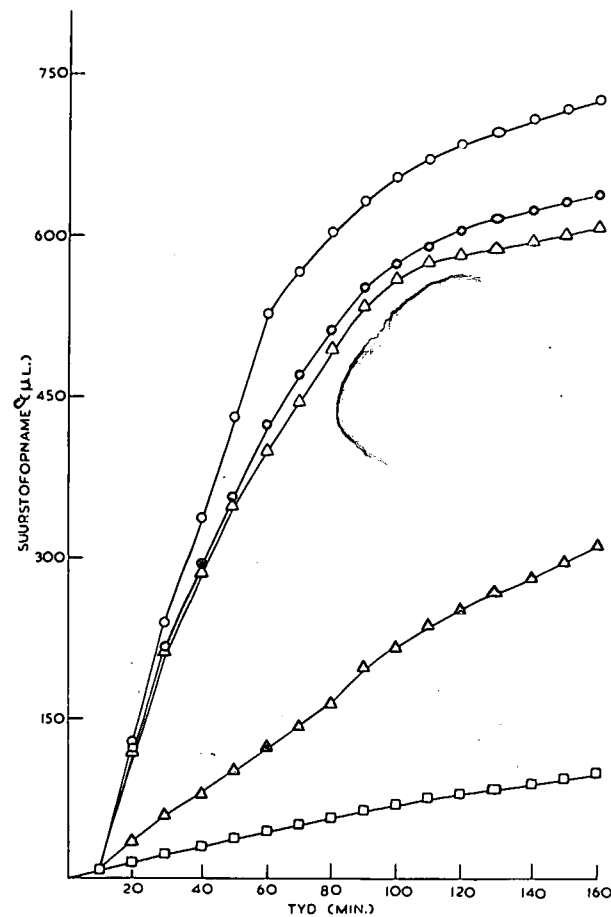


FIG. 7. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 5 WAT OP 'N P-KRESOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = P-KRESOL; ○ = P-HIDROKSIBENSALDEHIED;
 △ = P-HIDROKSIBENSOËSUUR; △ = 3,4-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

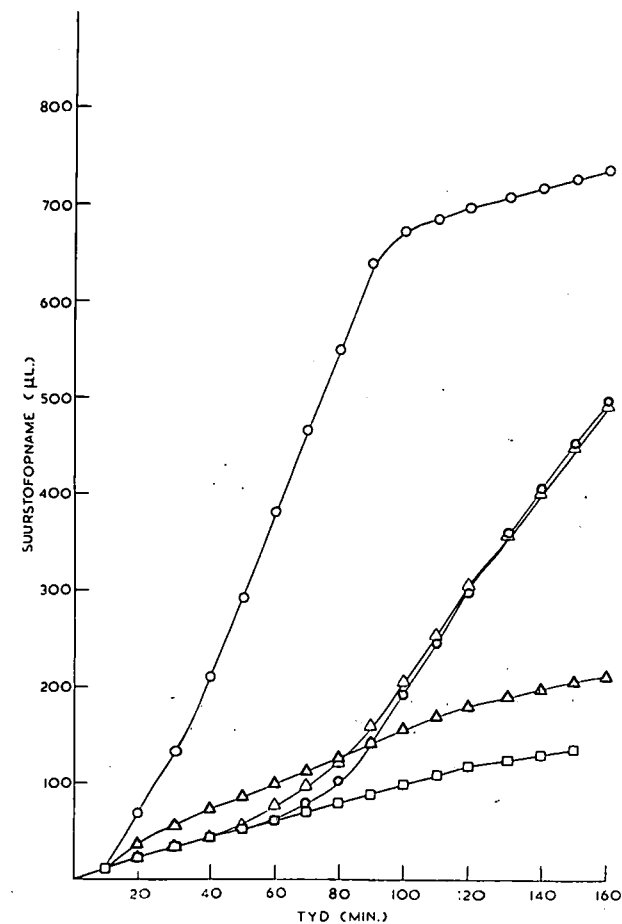


FIG. 8. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 6 WAT OP 'N M-KRESOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = M-KRESOL; △ = M-HIDROKSIBENSALDEHIED;
 ○ = M-HIDROKSIBENSOËSUUR; △ = 2,5-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

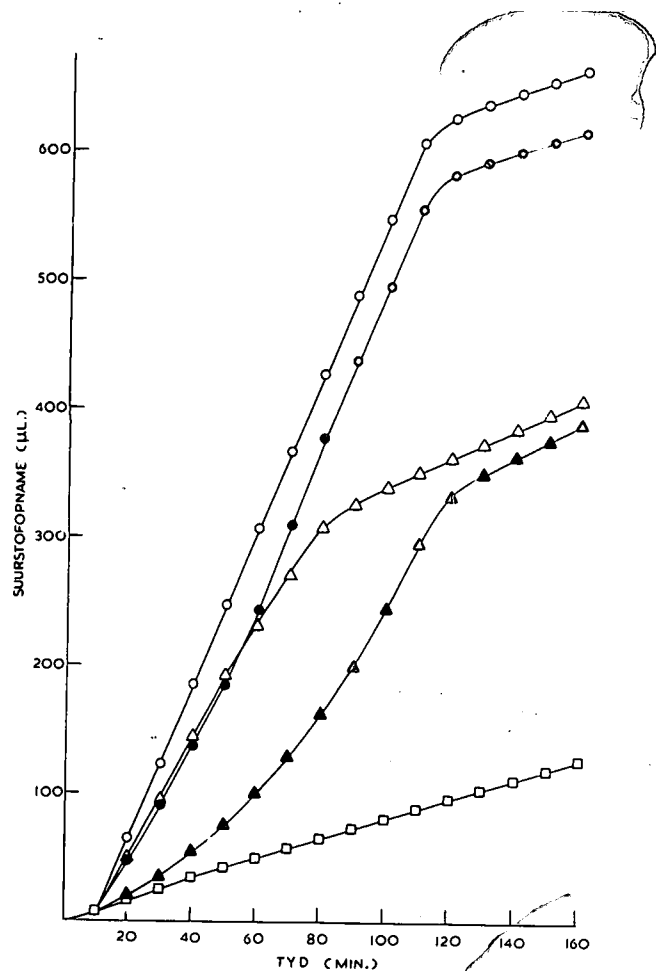


FIG. 9. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 6 WAT OP 'N M-HIDROKSIBENSALDEHIED-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = M-HIDROKSIBENSOËSUUR;
● = M-HIDROKSIBENSOËSUUR; △ = 2,5-DIHIDROKSIBENSOËSUUR;
▲ = 3,4-DIHIDROKSIBENSOËSUUR

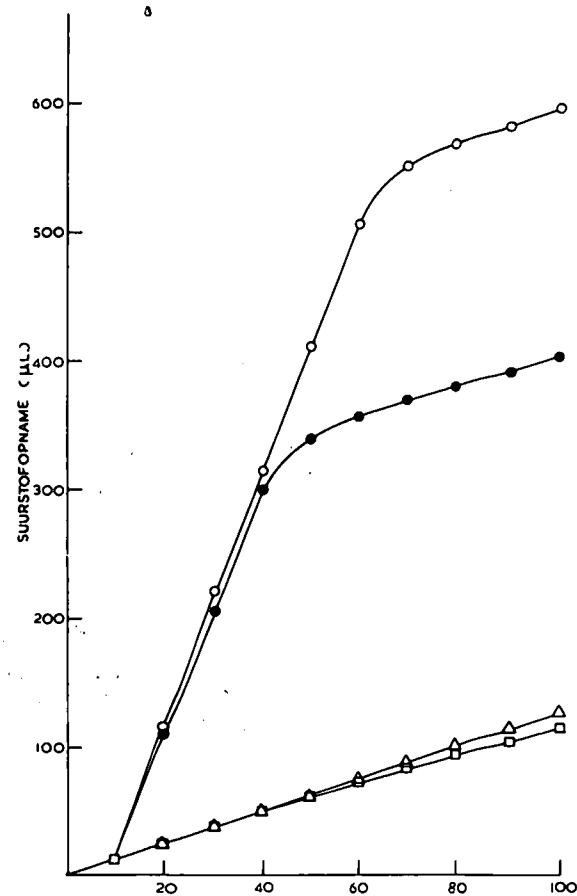


FIG. 10. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 7 WAT OP 'N SALISIËLSUUR-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = SALISIËLSUUR; ● = 2,5-DIHIDROKSIBENSOËSUUR; △ = KATECHOL.

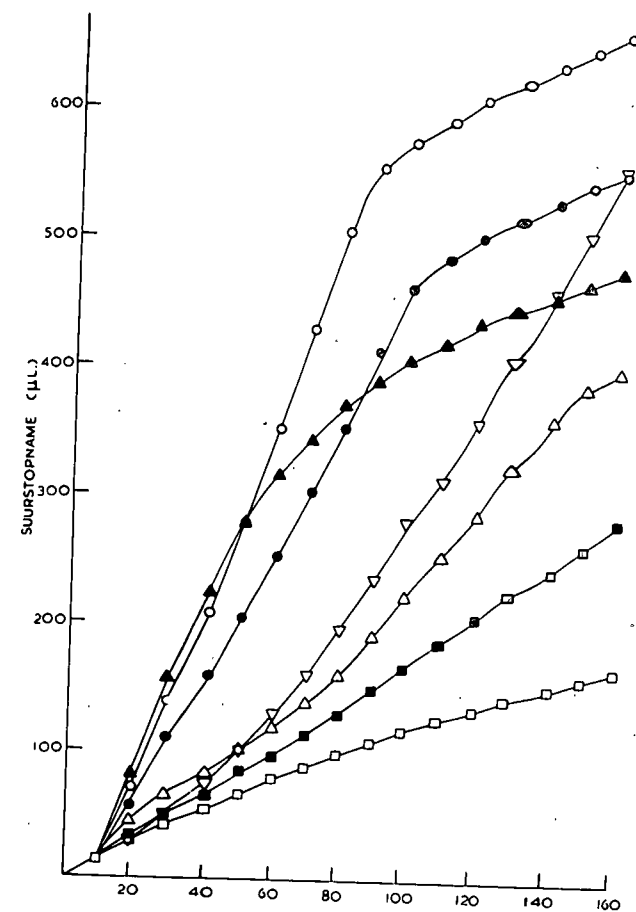


FIG. 11. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLEND AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 8 WAT OP 'N O-KRESOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = O-KRESOL; ● = SALISIËLALKOHOL;
△ = SALISIËLALDEHIED; ▽ = SALISIËLSUUR; ▲ = KATECHOL; ■ = 2,5-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

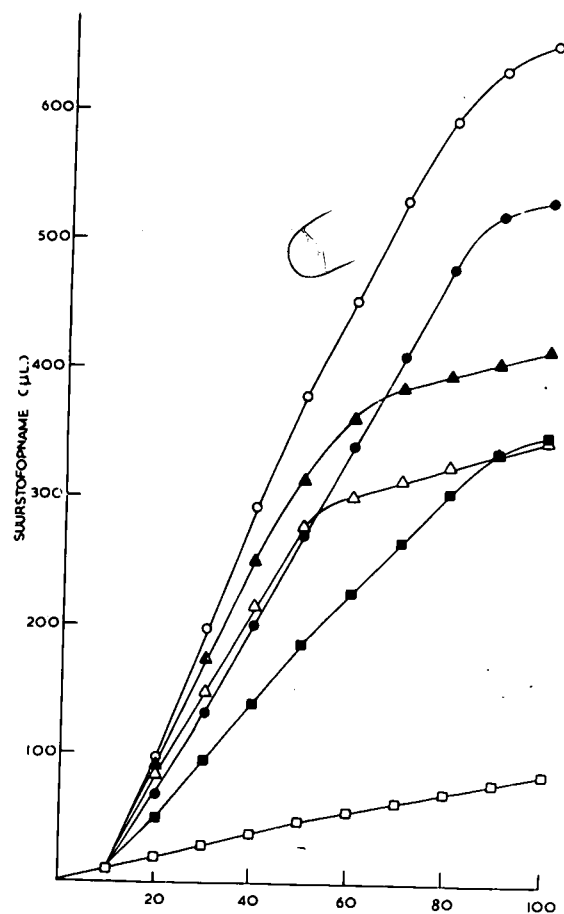


FIG. 12. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 8 WAT OP 'N SALISIELALKOHOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = SALISIELALKOHOL; ● = SALISIEALDEHIED;
▲ = SALISIELSUUR; △ = KATECHOL; ■ = 2,5-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

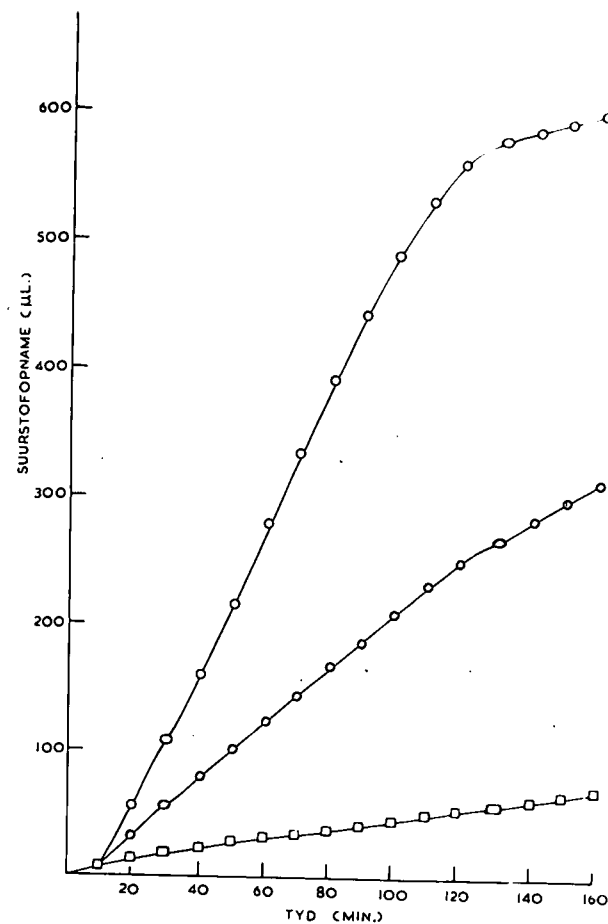


FIG. 13. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 9 WAT OP 'N SYRINGASUUR-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = SYRINGASUUR; ○ = GALLUSUUR.

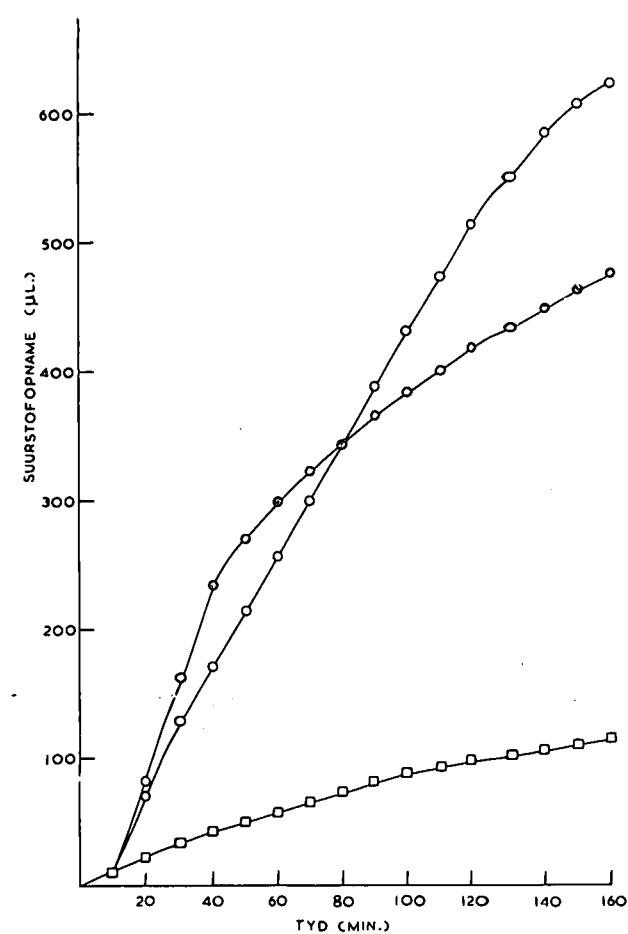


FIG. 14. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 10 WAT OP 'N GUAIAKOL-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = GUAIAKOL; ○ = KATECHOL.

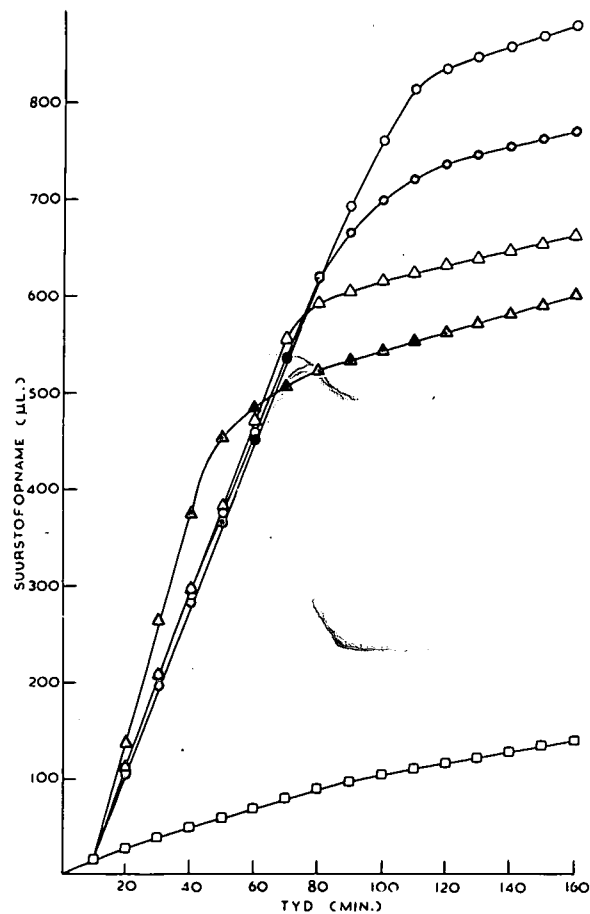


FIG. 15. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 11 WAT OP 'N ANYSALDEHIED-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = ANYSALDEHIED; ● = ANYSSUUR;
 △ = P-HIDROKSIBENSOËSUUR; ▲ = 3,4-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

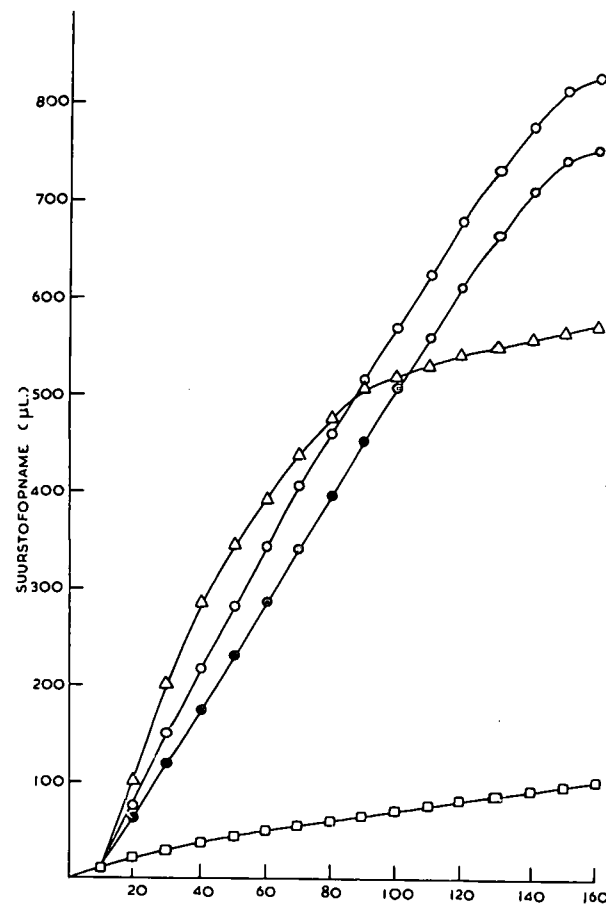


FIG. 16. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 12 WAT OP 'N VANILLIEN-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = VANILLIEN; ● = VANILLIENSUUR;
 △ = 3,4-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

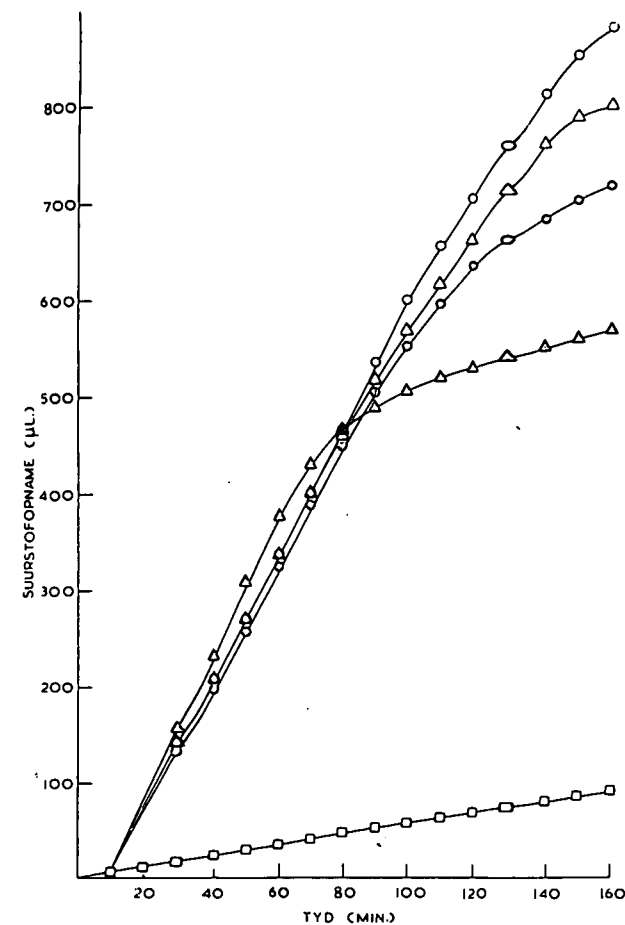


FIG. 17. SUURSTOFOPNAME MET 5 μ MOLE VAN VERSKILLENDE AROMATIESE VERBINDINGS DEUR BAKTERIE-ISOLAAT N^o 13 WAT OP 'N VERATRUMALDEHIED-MEDIUM GEGROEI HET.

□ = ENDOGENE ASEMHALING; ○ = VERATRUMALDEHIED; △ = VERATRUM-SUUR;
 ● = VANILLIENSUUR; ▲ = 3,4-DIHIDROKSIBENSOËSUUR.

HOOFSTUK VIII.

BESPREKING.

Die belangrikste doel van hierdie ondersoek van mikrobiale afbraak van aromatiese verbindings was om die aromatiese tussenprodukte van die oksidasie vas te stel. Vir die doel is gebruik gemaak van die opeenvolgende induksietegniek van Stanier(1947) deur die suurstofopname te bepaal volgens die direkte metode van Warburg.

Met die Warburg-metode is vasgestel dat die afbraak van fenol, bensoësuur, amandelsuur, p-kresol, m-hidroksibensoësuur en anyssuur deur bakterieë en van tolueen deur 'n aktinomyceet in ooreenstemming is met dié soos reeds vasgestel is vir bakterieë en fungi (sien bls 7, 8 en 9). Op grond van die resultate met die Warburg-metode is 'n moontlike oksidasieverloop van die volgende verbindings vasgestel: salisielsuur, salisielalkohol, syringasuur, guaiakol, vanillien en veratrumaldehyd.

Die omsetting van salisielsuur tot 2,5-dihidroksibensoësuur deur bakterie-isolaat no. 7 is in ooreenstemming met die oksidasie van salisielsuur in konyne (Bray e.a. 1948). Die verdere oksidasie van 2,5-dihidroksibensoësuur deur bakterieë is nie bekend nie maar vermoedelik ondergaan dit ringsplitsing (Roof e.a. 1953). Verskeie ondersoekers, o.a. Walker en Evans (1952) en Roof e.a. (1953), het egter by Pseudomonas-soorte vasgestel dat die bakteriële oksidasie van salisielsuur plaasvind via katechol.

Die omsetting van saligenien deur bakterie-isolasie no.8 is in ooreenstemming met 'n skema wat indertyd opgestel is deur Tausson (1928) vir die bakteriële omsetting van fenantreen. Die skema fenantreen, saligenien, o-hidroksibensaldehyd, salisielsuur en katechol het Tausson opgestel op grond van die vinnige assimilasië van hierdie stowwe deur die bakterieë. Rogoff en Wender (1957) het egter vasgestel dat fenantreen deur Ps.aeruginosa geoksideer word via l-hidroksi-2-naftoënsuur tot salisielsuur en katechol.

Die waarneming dat metoksielverbindings deur bakterieë gedemetileer word tot die ooreenkomstige hidroksielverbindings is in ooreenstemming met die bevindings van Henderson (1957) met fungi. Daar is in hierdie ondersoek aanduidings gevind dat 3,4-dihidroksibensoësuur 'n oksidasieproduk is van vanillien en veratrumaldehyd, en katechol 'n oksidasieproduk van guaiakol. Soos reeds vir bepaalde bakterieë vasgestel is, ondergaan 3,4-dihidroksibensoësuur en katechol ringsplitsing, en dit is dus moontlik om per analogie aan te neem dat vanillien, veratrumaldehyd en guaiakol deur die ondersogte bakterieë opgebreek word tot eenvoudige verbindings.

Die oksidasie van o- en m-kresol kon nie met sekerheid met die Warburg-metode vasgestel word nie en dit sou wenslik wees om vir die stowwe ander metodes soos chromatografie en spektrofotometrie toe te pas.

Kluyver het reeds in 1931 daarop gewys dat by die analisering van die aktiwiteite van die lewende sel daar nie sonder meer aangeneem kan word dat een enkele metode van ondersoek 'n juiste voorstelling gee van wat werklik plaasvind nie. Die beginsel van Kluyver is bevestig deur Evans (1958) wat verskillende metodes van ondersoek aanbeveel het vir die mikrobiale afbraak van aromatiese verbindings. Dit sou dus wenslik wees om die bevindings wat in hierdie ondersoek met die Warburg-metode verkry is, nader te bevestig met ander metodes (sien bls. 3 - 7).

By die studie van die oksidasie van aromatiese verbindings deur mikro-organismes blyk dat hulle op verskillende maniere deur verskillende ensieme geoksideer kan word. Die aromatiese verbindings wat ondersoek is ondergaan ten slotte almal die „aromatiese afbraak“ („aromatic pathway“) waarby die oksidasie tot opbreking van die aromatiese kern lei en verdere oksidasie tot eenvoudiger komponente plaasvind sodat die koolstof vir selsintese beskikbaar gestel word. Die ensieme wat hierby betrokke is, is suiwer adaptief van aard en behoort vir 'n groot deel tot die suurstoftransferases 'n Ander manier waarop aromatiese verbindings deur mikro-organismes geoksideer kan word, is die vorming van kinone uit hidrokinone. Die ensieme wat hierby betrokke is, behoort tot die polifenoloksidases en speel 'n rol by humiensuur- en melanien-vorming (vgl. Küster 1953).

By sommige van die mikro-organismes wat ondersoek is ten opsigte van die afbraak van aromatiese verbindings, is daar ook 'n polifenoloksidase-aktiwiteit vasgestel. Die twee meganismes van oksidasie staan egter blykbaar apart van mekaar en is heeltemal verskillend.

In hierdie studie is nie op die identiteit en sistematiese plek van die geïsoleerde stamme waarmee die oksidasie van aromatiese verbindings ondersoek is, ingegaan nie. Waarskynlik behoort die meeste stamme tot die genus Pseudomonas en die fluoreserende groep daarvan. Saam met Vibrio-soorte is hierdie groep die meeste ondersoek by die afbraak van aromatiese verbindings. Volgens Bergey (1957, sien bls. 90) is die genera Vibrio en Pseudomonas baie nou met mekaar verwant. Uit die literatuur en uit hierdie werk blyk dat die ondersogte bakterie-stamme soms slegs van mekaar verskil deur die af- of aanwesigheid van enkele ensieme wat hom uiter in die vermoë om bepaalde aromatiese verbindings al of nie te kan gebruik. Dit sou egter gevaarlik wees om 'n dergelike eienskap alleen as basis vir soortafgrensing te neem.

OPSOMMING.

1. In die literatuuroorsig is die ondersoekingsmetodes, die sistematiese en biochemiese aspekte en die betekenis van die mikrobiale afbraak van aromatiese verbindings bespreek.
 2. In 'n voorlopige ondersoek is vasgestel dat 'n aantal nie-selektief geïsoleerde streptomyceet-stamme nie op 'n minerale voedingsmedium met 'n eenvoudige aromatiese verbinding as enigste koolstofbron groei nie.
 3. Bakterieë, fungi en 'n Nocardia-soort wat aromatiese verbindings as enigste koolstof- en energiebron gebruik, is uit ophopingskulture geïsoleer.
 4. Met turbidimetriese groeibepalings is vasgestel dat die optimale selontwikkeling van die ondersogte bakterieë en aktinomyceet in 'n medium met 'n lae konsentrasie aromatiese koolstofbron in die meeste gevalle binne twee dae plaasgevind het.
 5. Met behulp van die direkte metode van Warburg is die oksidasie van 'n aantal aromatiese verbindings deur die geïsoleerde bakterie- en aktinomyceet-stamme bestudeer.
 6. Die metode gebruik vir die yking van die manometers en manometerflessies is beskryf.
 7. Die opeenvolgende induksietegniek is toegepas om die mikrobiale afbraakpad van die ondersogte aromatiese verbindings vas te stel. Met hierdie tegniek is die volgende onbeskrewe reaksies vir bakterieë vasgestel.
 - (i) Salisielsuur $\rightarrow$ 2,5-dihidroksibensoësuur.
 - (ii) Saligenien $\rightarrow$ salisielaldehyd $\rightarrow$ salisielsuur $\rightarrow$ katechol en 2,5-dihidroksibensoësuur.
 - (iii) Siringasuur $\rightarrow$ gallussuur.
 - (iv) Guaiakol $\rightarrow$ katechol.
 - (v) Vanillien $\rightarrow$ vanilliensuur $\rightarrow$ 3,4-dihidroksibensoësuur.
 - (vi) Veratrumaldehyd $\rightarrow$ veratrum suur $\rightarrow$ vanilliensuur $\rightarrow$ 3,4-dihidroksibensoësuur.
- Die afbraakpad van fenol, bensoësuur, amandelsuur, p-kresol, m-hidroksibensoësuur en anyssuur deur bakterieë en van toluen deur Nocardia sp. soos manometries vasgestel, was in ooreenstemming met dié wat reeds uit die literatuur bekend was vir fungi en bakterieë. Die afbraak van o- en m-kresol kon met die gebruikte metode nie met sekerheid vasgestel word nie.

SUMMARY.

1. In a survey of the relevant literature the methods of investigation, the systematic and biochemical aspects and the significance of microbial degradation of aromatic compounds has been discussed.

2. In a preliminary investigation it was found that non-selectively isolated strains of streptomycetes did not grow on a mineral salt medium with a simple aromatic compound as sole source of carbon.

3. Bacteria, fungi and one Nocardia strain able to use aromatic compounds as sole source of carbon and energy, were isolated from enrichment ^{uv}cultures.

4. From turbidimetric growth measurements it was found that optimum cell development of the bacteria and actinomycete investigated in a medium with a low concentration of aromatic substrate in most cases took place within two days.

5. The oxidation of a number of aromatic compounds by the bacteria and actinomycete isolated, was studied with the aid of the direct method of Warburg.

6. The method used for the calibration of manometers and Warburg flasks is described.

7. The technique of sequential induction was applied to determine the pathway of microbial degradation of the aromatic compounds investigated. With this technique the following hitherto unpublished reactions of bacteria have been found:

- (i) Salicylic acid $\rightarrow$ gentisic acid.
- (ii) Saligenin $\rightarrow$ salicylic aldehyde $\rightarrow$ salicylic acid $\rightarrow$ catechol and gentisic acid.
- (iii) Syringic acid $\rightarrow$ gallic acid.
- (iv) Guaiacol $\rightarrow$ catechol.
- (v) Vanillin $\rightarrow$ vanillic acid $\rightarrow$ protocatechuic acid.
- (vi) Veratric aldehyde $\rightarrow$ veratric acid $\rightarrow$ vanillic acid $\rightarrow$ protocatechuic acid.

The degradation of phenol, benzoic acid, mandelic acid, p-cresol, m-hydroxybenzoic acid and anisic acid by bacteria, and of toluene by Nocardia sp., as studied with manometrical methods, was found to be identical with the pathway already described for bacteria and fungi. The degradation pathway of o- and m-cresol could not be established with certainty with the method used

BIBLIOGRAFIE.

Die publikasies met 'n x gemerk is nie in die oorspronklike vorm geraadpleeg nie.

x

Abraham, E.P., 1951.

The Enzymes.

Academic Press, New York, Vol 1, pt. 2.

Audus, L.J., 1949.

The biological detoxification of 2:4-dichlorophenoxyacetic acid in soil.
Plant and Soil 2(1):31-36.

Audus, L.J., 1950.

Biological detoxification of 2:4-dichlorophenoxyacetic acid in soils. Isolation of an effective organism.
Nature (London) 166, 356

Audus, L.J., 1951.

The biological detoxification of hormone herbicides in soil.
Plant and Soil 3,170.

Audus, L.J., 1952.

The decomposition of 2:4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in the soil.
J. Sci. Food Agricult., 3,268-274.

Beijerinck, M.W., 1900.

Über chinonbildung durch Streptothrix chromogena und Lebensweise dieses Mikroben.
Zbl. Bakt., II, 6:2-12.

x

Beijerinck, M.W., 1921-1940.

Versamelde Geschriften,
Delft 1-6.

Bell, G.R., 1957.

Some morphological and biochemical characteristics of a soil bacterium which decomposes 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Can. J. Microbiol. 3(6), 821.

Bhat, M.G., & Ramakrishnan, T., & Bhat, J.V., 1959.

Salicylate as intermediate in the breakdown of aromatic ring by Pseudomonas convexa var. Hippuricum.
Can. J. Micr., 5(1):109.

Behrman, E.J., & Stanier, R.Y., 1957.

The bacterial oxidation of nicotinic acid.
Jour. Biol. Chem. 228(2):923-945. Ref. Biol. Abst.
32(4): 12852.

Benedict, R.G., e.a., 1955.

Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of species of *Streptomyces*.
App. Micr., 3(1):1-6.

Bernheim, F., 1940.

The effect of salicylate on the oxygen uptake of the tubercle bacillus.
Science, 92, 204.

Birkinshaw, J.H., Chaplen, P., & Findlay E.P.K., 1957.

Biochemistry of the wood-rotting fungi. 9. Volatile metabolic products of *Stereum subpileatum*.
Biochem. J. 66(1):188-192.

x

Borner, H., 1956.

Der papierchromatographische nachweis von Ferulasäure in wässrigen extrakten von getreidenstroh und getreiderückständen.
Naturwissensch. 43, 129-130.

Brauns, F.E., 1952.

Chemistry of lignin.
Academic Press Inc., Publish., New York.

Bray, H.G., Lake, H.J., Thorpe, W.V., & White, K., 1950.

Further observations on the use of paper chromatography for the detection of phenolic compounds in metabolic studies.
Biochem. J. 47. xiii.

Bray, H.G., Ryman, B.E., & Thorpe, W.V., 1948.

The fate of certain organic acids and amides in the rabbit. 5.0-and-m.hydroxybenzoic acids and amides.
Biochem. Jour. 43:561-567.

x

Buddin, W., 1914.

Partial sterilisation of soil by volatile and non-volatile antiseptics.
J.agric. Sci., 6, 417.

Cohn, M.J., Monod, J., Pollock, M.R., Spiegelman, S., & Stanier, R.Y., 1953.

Terminology of enzyme formation.
Nature(Lond.) 172, 1096.

Crook. P., e.a., 1950.

The use of sodium propionate in isolating Actinomycetes from soils.
Science, 112 (2918):656.

Csekalowski, J.W., & Skarzynski, B., 1948.

The breakdown of phenols and related compounds by bacteria.
J. Gen. Micr., 2, 231.

Dagley, S., Fewster, M.E., & Happold, F.C., 1952.

The bacterial oxidation of phenylacetic acid.
Jour. Bact., 63, (3), 327.

Dagley, S., Fewster, M.E., & Happold F.C., 1953.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
J.Gen. Microbiol. 8, 1-7.

Dagley, S., & Patel, M.D., 1955.

Microbial oxidation of p-Cresol and Protocatechuic acid.
Biochem. Jour., 60. xxxv.

Dagley, S., & Patel, M.D., 1957.

Oxidation of p-Cresol and related compounds by a
Pseudomonas.
Biochem. Jour. 66(2):227-233.

Dagley, S., & Rodgers, A., 1953.

The citric acid cycle and bacterial oxidation of
aromatic acids.
Jour. Bact., 66(5):620.

Dooren de Jong, L.E. den., 1926.

Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces.
Thesis, Delft. 1926.

Durham, N.N., 1956a.

Bacterial oxidation of p-aminobenzoic acid by
Pseudomonas fluorescens.
Jour. Bact., 72(3):333-336.

Durham, N.N., 1956b.

Effect of structurally related compounds on the
oxidation of p-aminobenzoic acid by Pseudomonas
fluorescens.
Jour. Bact., 73, 612-615.

Durham, N.N., 1957.

Bacterial oxidation of p-aminobenzoic acid by
Pseudomonas fluorescens.
Jour. Bact., 72, 333-336.

Durham, N.N., 1958.

Studies on the metabolism of p-nitrobenzoic acid.
Can. Jour. Micr., 4(2):141-148.

Erikson, D., 1941.

Studies on some lake-mud strains of Micromonospora.
Jour. Bact. 41, 277.

Evans, W.C., 1947.

Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria.

Biochem. Jour., 41, 373.

Evans, W.C., 1955.

The early intermediate formed in the oxidative metabolism of phthalic acid by certain soil bacteria.

Biochem. Jour., 61, x.

Evans, E.C., 1956.

Biochemistry of the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms.

Annual Rev. Chem. Soc., (Lond.) 53, 279-294.

Evans, W., 1958.

Metabolism of aromatic compounds by lower plants. Phenols, quinones and the problem of the biogenesis of benzene nuclei.

Handbuch der pflanzenphysiologie Band X. Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe.

Evans, & Coulson, 1957.

Unpublished data, CF Evans 1958.

Evans, W.C., & Moss, P., 1957.

The metabolism of the herbicide p-chlorophenoxyacetic acid by a soil micro-organism- isolation of a β -chloromuconic acid on ring fission.

Biochem. Jour., 65. 8p.

Evans, R.A., Parr, W.H., & Evans, W.C., 1949.

Paper partition chromatography of phenolic substances. Nature (Lond.) 164, 674.

Evans, R.A., Parr, W.H., & Evans, W.C., 1949.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.

Biochem. J. 44. viii.

Evans, W.C., Smith, B.S.W., Linstead, R.P., & Elvidge, J.A., 1951.

Chemistry of the oxidative metabolism of certain aromatic compounds by micro-organisms.

Nature (Lond.) 168, 772.

x

Evans, W.C., & Happold, F.C., 1939.

The utilization of phenol by bacteria.

J. Soc. Chem. Ind., London. 58, 55.

Evans, W.C., & Smith, B.S.W., 1951.

The oxidation of aromatic compounds by soil bacteria.

Biochem. Jour., 49, x.

Evans, W.C., & Smith, B.S.W., 1954.

The photochemical inactivation and mriicrobiol
metalolism of the chlorophenoxyacetic acid herbicides.
Biochem. Jour., 57, xxx.

Fahraeus, G., 1949.

On the oxidation of phenolic compounds by fungi.
Ann. Roy. Agr. Coll., Sweden, 16, 618-629.

Farmer, V.C., & Morrison, R.I., 1955.

The formation of anisic acid by oxidation of methylated
sphagnum.
Chem. and Ind., 231, Ref. Ann. Report. McCaulay, 1954-1955.

Fewster, M.E., & Hall, D.A., 1951.

Application of buffered solvent systems to the detection
of aromatic acids by paper partition chromatography.
Nature, (Lond.) 168, 78.

Freudenberg, K., Lautsch, W., & Engler, K., 1940.

Die Bildung von Vanillin aus Fichten Lignin.
Ber. chem. Gesellsch, 73:167.

Gale, G.R., 1952a.

The oxidation of benzoic acid by mycobacteria.
I. Metabolic pathway in Mycobacterium tuberculosis,
M. butyricum and M.phlei.
Jour. Bact., 63, 273-278.

Gale, G.R., 1952b.

The oxidation of benzoic acid by mycobacteria.
II. The metabolism of postulated intermediates in
the benzoate oxidation chain by four avirulent and
two virulent organisms.
Jour. Bact., 64, 131-135.

Gots, J.S., ea., 1954.

Tryptophan metabolism and its relation to phage
resistance in Escherichia coli.
Jour. Gen. Microbiol. 11, 7-16.

Gottlieb, S., & Pelczar, M.J., 1951.

Microbiological aspects of lignin degradation.
Bact. Review. 15(2):55-76.

Gray, P.H.H., & Thornton, H.G., 1928.

Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds.
Zentr. Bakt. Parasitenk., II, 73, 74-96.

Gross, S.R., Gafford, R.D., & Tatum, E.L., 1956.

The metabolism of protocatechuic acid by Neurospora
crassa.
Jour. Biol. Chem., 219, 781-796.

Gunsalus, I.C., Gunsalus, C.F., & Stanier, R.Y., 1953.

The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid.

I. Gross fractionation of the system into soluble and particulate components.

Jour. Bact., 66, 538.

Gunsalus, C.F., & Stanier, R.Y., 1952.

The mechanism of D- and L-mandelic acid oxidation.

Bact. Proceed., 1952. pp.138.

Gunsalus, C.F., Stanier, R.Y., & Gunsalus, I.C., 1953.

The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid.

III. Fractionation and properties of the soluble enzymes.

Jour. Bact. 66(5):548-553.

Gunter, S.E., 1953.

The enzymatic oxidation of p-hydroxymandelic acid to p-hydroxybenzoic acid.

Jour. Bact., 66(3), 341-346.

x

Happold, F.C., 1930.

The correlation of the oxidation of certain phenols and of dimethyl-p-phenylenediamine by bacterial suspensions.

Biochem. Jour., 24, 1737-1743.

Happold, F.C., 1950.

The oxidation of aromatic rings by micro-organisms in metabolism.

Biochem. Soc., Symposia 1950, No.5, 85-96.

x

Happold, F.C., & Key, A., 1932.

The bacterial purification of gasworks' liquors. The action of the liquors on the bacterial flora of sewage

J. Hyg., Camb., 32, 573-580.

x

Hayaishi, O., & Hashimoto, Z., 1950b.

Pyrocatechase. A new enzyme catalyzing the breakdown of pyrocatechin.

Med. Jour. Osaka Univ. 2, 33-36.

x

Hayaishi, O., & Hashimoto, K.J., 1950a.

Jour. Biochem. Japan. 37, 371.

x

Hayaishi, O., Katagiri, M., & Rothberg, S., 1957.

Studies on oxygenases : Pyrocatechase.

Jour. Biol. Chem., 229(2):905-920.

Hayaishi, O., Katagiri, M., & Rothberg, S.J., 1955.

Mechanism of the pyrocatechase reaction.

J. Anr. Chem. Soc., 77, 5450.

Hayaishi, O., Rothberg, S., & Mehler, H., 1957.

Studies on oxygenases: Enzymatic formation of Kynurenine from tryptophan.

Jour. Biol. Chem. 229(2):889.

Ref. Biol. Abst. 32(6) 20193.

Hayaishi, O., & Stanier, R.Y., 1951.

The bacterial oxidation of tryptophan.

III. Enzymatic activities of cell-free extracts from bacteria employing the aromatic pathway.

Jour. Bacteriol. 62, 691-709.

Hayaishi, O., & Stanier, R.Y., 1952.

The kynureninase of Pseudomonas fluorescens.

Jour. Biol. Chem. 195, 735.

Henderson, M.E.K., 1955a.

Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdust during decomposition by white-rot Fungi.

Nature, 175, 634.

Henderson, M.E.K., 1955.

A method for studying the metabolism of fungi in the Warburg apparatus using spore suspensions.

J. Gen. Microbiol, 12, iii.

Henderson, M.E.K., 1956.

A study of the metabolism of phenolic compounds by soil fungi using spore suspensions.

J. Gen. Microbiol. 14, 684-691.

Henderson, M.E.K., 1957.

Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi.

J. Gen. Micro. 16(3), 686.

Henderson, M.E.K., & Farmer, V.C., 1955.

Utilization by soil fungi of p-hydroxybenzaldehyde, ferulic acid, syringaldehyde and vanillin.

J. Gen. Microbiol. 12, 37.

Hibbert, H., 1942.

Lignin.

Ann. Rev. Biochem, 11, 183-202.

Hockenhull, D.J.D., Walker, A.D., Wilkin, G.D., & Winder, F.G., 1950

Oxidation of phenylacetic acid by Penicillium chrysogenum.
Biochem. Jour., 50, 605-609.

Hugo, W.B., 1954.

The preparation of cell-free enzymes from micro-organisms.

Bact. Rev. 18(2):87-105.

Hunt, A.L., Hughes, D.E., & Lowenstein, J.M.,

The hydroxylation of nicotinic acid by Pseudomonas fluorescens.

Biochem. Jour., 66, 2 P.(1957.)

Biochem. Jour., 69,(2): 170-173.

Isono, M.,

Oxidative metabolism of phenylacetic acid by Penicillium chrysogenum.

J. Agricult. Chem. Soc., Japan 27, Parto 1-4, 193-301.
(1953). 28, Parto 5-6, 196-205 (1954.)

Jensen, H.L., & Gundersen, K., 1954.

Biological decomposition of aromatic nitrocompounds.
Nature(Lond.), 175, 341.

Jensen, H.L., & Peterson, H.I., 1952a.

Decomposition of hormone herbicides by bacteria.
Acta agricult. scand (Stockh.) 2, 215-231.

Jensen, H.L., & Petersen, H.I., 1952b.

Detoxification of hormone herbicides by soil bacteria.
Nature, 170, 39.

Johnson, M.K., e.a. 1956.

Some factors affecting the respiratory response of
Azotobacter to 2,4-D and related compounds.
Appl. Microbiol. 4(3):109-113.

Jones, J.D., Smith, B.S., & Evans, W.C., 1952.

Homogentisic acid as an intermediate in the metabolism of tyrosine by the aromatic ring-splitting micro-organisms.
Biochem. J. 51, xi.

x

Karstrom, H., 1937/1938.

Enzymatische Adaptation bei Mikro-organismen.
Erg. Enzymforsch. 7, 350-376.

Karlsson, J.L., & Barker, H.A., 1948.

Evidence against the occurrence of a tricarboxylic acid cycle in Azotobacter agilis.
Jour. Biol. Chem. 175, 913-921.

Katagiri, M., & Hayaishi, O., 1957.

Enzymatic degradation of -ketoadipic acid.
Jour. Biol. Chem. 226, 439 - 448.

Katz, E., & Phyllis Pienta. 1957.

Decomposition of actinomycin by a soil organism.
Science 126(3270):402-403.

Kerken, A.E. van., 1958.

Onderzoekinge oor huminesure van verskillende oorsprong.
M.Sc.Tesis. U.O.V.S. Bloemfontein.

Kilby, B.A., 1951.

The formation of β -ketoadipic acid by bacterial
fission of aromatic rings.
Biochem. Jour. 49, 671.

Kilby, B.A., 1948.

The bacterial oxidation of phenol to β -ketoadipic acid
Biochem. Jour. 43,v.

Kitagawa, M., 1956.

Studies on the oxidation mechanism of methyl groups.
Jour. Biochem.(Tokyo) 43(4):553-563.
Ref. Biol. Abstr. 31(11), 35124. 1957.

Klausmeier, R.E., & Strawinski, R.J., 1957.

Microbial oxidation of naphthalene.
I. Factors concerning salicylate accumulation.
Jour. Bact. 73(4), 461-464.

Kluyver, A.J., 1931.

The chemical activities of Micro-organisms.
London: Univ. Press. 1931.

Kluyver, A.J., & van Zijp, J.C.M., 1951.

The production of homogentisic acid out of phenylacetic
acid by Aspergillus niger.
Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol, 17, 315-324.

x

Kunita, Nobuhasa., 1955b.

Bacterial oxidation of phenylacetic acid.
II. The pathway through homogentisic acid.
Med. Jour. Osaka Univ. 6(3):705-708.
Ref. Biol. Abstr. 30(9), 26800.

x

Kunita, Nobuhasa., 1955 a.

Bacterial oxidation of phenylacetic acid.
I. The pathway through homoprotocatechuic acid.
Med. Jour. Osaka. Univ. 6(3): 697-702.
Ref. Biol. Abstr. 30(9), 26599.

Küster, E., 1953.

Mikrobielle Polyphenoloxidasen und Humusbildung.
Zentb. Bakt., Parasitenk, I 160, 207.

Küster, E., 1955.

Humusbildung und Phenoloxidasen by Streptomyceten.
Z. P & Ernähr. Düng., 69(1-3):137-142.

Küster, E., 1956.

Zum Nachweis von phenoloxidasen bei antibiotisch wirksame streptomyceten.
Giornale di Microbiologia 2,351-360.

x

Landa, S., & Eliasek, J., 1956.

Biological degradation of phenols.
Chem. Listy 50, 1834-1839.

x

Lieske, R., & Hofmann, E., 1928.

Untersuchungen über die Mikrobiologie der Kohlen und ihrer natürlichen Lagerstätten.
I. Mitteilung: Die Mikroflora der Braunkohlengruben.
Brennstoff-Chem., 9, 174-178.

Lynch, D.L., & Lynch, C.C., 1958.

Resistance of protein-lignin complexes, lignins and humic acids to microbial attack.
Nature (Lond.) 181(4621):1478-1479.

MacDonald, D.L., Stanier, R.Y., & Ingraham, J.L., 1954.

The enzymatic formation of -carboxymuconic acid.
Jour. Biol. Chem., 210. 809.

Mason, H.S., 1957.

Mechanisms of oxygen metabolism.
Adv. Enzymol, 19 :79-233.

McIlwain, H., 1948.

Preparation of cell-free bacterial extracts with powdered alumina.
Jour. Gen. Microbiol., 2, 288-291.

Moore, F.W., 1949.

The utilisation of pyridine by Micro-organisms.
Jour. Gen. Micr., 3, 143.

Morrison, R.I., 1958.

The alkaline nitrobenzene oxidation of soil organic matter.
Jour. Soil Sci., 9(1), 130.

Murphy, J.F., & Stone, R.W., 1955.

The bacterial dissimilation of naphthalene.
Can. Jour. Microbiol. 1(7), 579.

x

Newman, A.S., Thomas, J.R., & Walker, R.L., 1952.

Disappearance of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from soil.
Soil. Sc., Soc. Amer. Proc., 16, 21-24.

Nutman, P.S., Thornton, H.G., & Quastel, J.H., 1945.

Plant growth-substances as selective weed-killers.
Inhibition of plant growth by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other plant growth substances.
Nature, 155, 497.

Parr, W.H., Evans, R.A., & Evans, W.C., 1949.

The mechanism of the bacterial oxidation of certain aromatic compounds together with the preparation of a cell-free enzyme system which accomplishes ring cleavage.
Biochem. Jour. 45. xxix.

Piek, W.G., 1952.

'n Fisiologiese ondersoek oor die voedingsvereistes van 'n bodem fungus, Scropulariopsis sp.
M. Sc. tesis U.O.V.S.

Potgieter, J.H., 1954.

Ondersoekinge oor die mikro-organismes van die rhizosfeer.
M. Sc. Tesis. U.O.V.S. Bloemfontein.

Proctor, M.H., 1958.

Bacterial dissimilation of indoleacetic acid. A new route of breakdown of the indole nucleus.
Nature London 181(4619):1345.

x

Raper, H.S., 1928.

The aerobic oxidases.
Physiologic. Rev. 8, 245-282.

Robbins, W.J.,

The cause of the disappearance of cumarin, vanillin, pyridine and quinoline in the soil.
Science, 44: 894-895(1916).
Ala. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 195 (1917)
Soil Sci. 7 : 475-485 (1919).

Rogoff, M.H., 1958.

An aromatic intermediate in the bacterial oxidation of quinic acid.
Jour. Gen. Microbiol. 19, 330-339.

Rogoff, M.H., & Irving, W., 1957.

3-Hydroxy-2-naphthoic acid as an intermediate in bacterial dissimilation of anthracene.
Jour. Bact. 74(1) :108-109.

Rogoff, M.H., & Reid, J.J., 1952.

Persistence of weed control agents and effect on nitrification in field and garden soil.
Bacteriol. Proc., p. 13.

Rogoff, M.H., & Reid, J.J., 1954.

Biological decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Bacteriol. Proc., p. 21.

Rogoff, M.H., & Reid, J.J., 1956.

Bacterial decomposition of 2,4-D.
Jour. Bact. 71, 303-307.

Rogoff, M.H., & Wender, I., 1957.

The microbiology of coal .
I. Bacterial oxidation of phenanthrene.
Jour. Bact. 73(2), 264-268.

Roof, B.S., Lannan, T.J., & Turner, J.C., 1953.

Bacterial oxidation of salicylic acid and related antirheumatic phenols .
Proc. Soc. Exper. Biol & Med., 84, 38-41.

Rothberg, S., & Hayaishi, O., 1957.

Studies on oxygenases: Enzymatic oxidation of imidazole-acetic acid.
Jour. Biol. Chem. 229(2):897-903.

x

Russel, E.J., & Hutchinson, H.B., 1908.

The effect of partial sterilisation of soil on the production of plant food.
Jour. Agric. Sci., 3, iii.

Schatz, A., 1952.

Interchangeability of quinolinic and nicotinic acids as growth factors for a pseudomonad oxidising nicotinic acid.
Jour. Gen. Micr. 6(), 278-285.

Schwarze, P., 1958.

Phenole und chinone und die biogene Bildung von Benzolker-
nen bei höheren Pflanzen.
Handbuch der Pflanzenphysiologie. Band x. 507.

x

Sen-Gupta, N.N., 1921.

Dephenolisation in soil.
Jour. Agr. Sci., II : 136-158.

x

Shorey, E.C., 1913.

Some organic soil constituents.
U.S. Dept. Agr. Bur. Soils, Bull 88,
Eighth Intern. Congr. Appl. Chem. 15:247-252.

x

Simpson, J.R., 1954.

M.Sc. Thesis, Univ. of Wales.

Simpson, J.R., & Evans, W.C., 1953.

The metabolism of nitrophenols by certain bacteria.
Biochem. Jour. 55(2): xxiv.

Sistrom, W.R., & Stanier, R.Y., 1953.

The mechanism of catechol oxidation by Mycobacterium butyricum.
Jour. Bact. 66(4). 404.

Sisler, F.D., & Zobell, C.E., 1947.

Microbial utilization of carcinogenic hydrocarbons.
Science, 106, 521.

Sistrom, W.R., & Stanier, R.Y., 1954.

Enzymatic conversion of two geometrical isomers into enantiomorphs.
Nature (Lond.) 174, 513-514.

Sistrom, W.R., & Stanier, R.Y., 1954.

The mechanism of formation of -ketoadipic acid by bacteria.
Jour. Biol. Chem. 210(2):821-836.

Sleeper, B.P., 1951.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
V. Metabolism of benzoic acids labelled with C¹⁴.
Jour. Bact. 62,(5):657.

Sleeper, B.P., & Stanier, R.Y., 1950.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
I. Adaptive patterns with respect to polyphenolic compounds.
Jour. Bact., 59, 117-127.

Sleeper, B.P., Tsuchida, M., & Stanier, R.Y., 1950.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
II. The preparation of enzymatic active dried cells and the influence thereon of prior patterns of adaptation.
Jour. Bact., 59, 129-133.

x

Sloane, N.H., Crane, C., & Mayer, R.L., 1951.

Studies on the metabolism of p-aminobenzoic acid by Mycobacterium smegmatis.
Jour. Biol. Chem. 193, 453.

Smith, B.S.W., Jones, J.D., & Evans, W.C., 1952.

Aromatic oxidative metabolism of certain benzene ring compounds by soil bacteria.
Biochem. Jour. 50, xxviii.

Stanier, R.Y., 1947.

Simultaneous adaptation : A new technique for the study of metabolic pathways.
Jour. Bact., 54, 339.

Stanier, R.Y., 1948.

The oxidation of aromatic compounds by fluorescent pseudomonads.
Jour. Bact., 55, 477-94.

Stanier, R.Y., 1950a.

Problems of bacterial oxidative metabolism.
Bact. Rev., 14, 179.

Stanier, R.Y., 1950b.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
IV. Studies on the mechanism of enzymatic degradation of protocatechuic acid.
Jour. Bact., 59(4), 527-532.

x

Stanier, R.Y., 1952a.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
Symposium sur le métabolisme microbien.
II. Congr. Internat. de Biochemie, p. 64-71.

Stanier, R.Y., 1952b.

Indole formation from tryptophan: A correction.
Jour Bact. 64, 893.

Stanier, R.Y., 1955, 1957.

Cleavage of aromatic rings with eventual formation of β -ketoadipic acid.
In: Methods in Enzymology, vol. 2, p.273-287; vol. 3. p.614-620, edit. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan.
New York: Academic Press Inc.

Stanier, R.Y., & Ingraham, J.L., 1954.

Protocatechuic acid oxidase.
Jour. Biol. Chem., 210, 799.

Stanier, R.Y., Gunsalus, I.C., & Gunsalus, C.F., 1953.

The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid.
II. Properties of the particulate fractions.
Jour. Bact., 66(5):543-547.

Stanier, R.Y., & Hayaishi, O., 1951.

The bacterial oxidation of tryptophan: a study in comparative biochemistry.
Science 114, 326-330.

Stanier, R.Y., Hayaishi, O., & Tsuchida, M., 1951.

The bacterial oxidation of tryptophan.
I. A general survey of the pathways.
Jour. Bact., (62(4)). 355.

Stanier, R.Y., Sleeper B.P., Tsuchida, M., & MacDonald, D.L., 1950.

The bacterial oxidation of aromatic compounds.
III. The enzymatic oxidation of catechol and protocatechuic acid to β -ketodipic acid.
Jour. Bact., 59, 137.

Stanier, R.Y., & Martha Tsuchida, 1949.

Adaptive enzymatic patterns in the bacterial oxidation of tryptophan.
Jour. Bact. 58(1), 45.

x

Stapp, C., und Spicher, G.U.,

Untersuchungen über die Wirkung von 2:4-D im Bodem.
IV. Mitt. Flavobacterium peregrinum und seines
Fähigkeit zum Abbau des Hormones.
Zbl. Bakt., ii Abt. 108, 113.

Steenenson, T.I., & Walker, N., 1956.

Observations on the bacterial oxidation of chloro-
phenoxyacetic.
Plant & Soil 8, 17-32.

Steenenson, T.I. & Walker, N., 1957.

The pathway of breakdown of 2:4-dichloro- and 4-chloro-
2-methylphenoxyacetic acid by bacteria.
Jour. Gen. Micr., 16, 146-158.

Strawinsky, R.J., & Stone, R.W., 1943.

Conditions governing the oxidation of naphthalene
and the chemical analysis of its products.
Jour Bact. 45: 16.

Strawinski, R.J., & Stone, R.W., 1954.

Biological oxidation of naphthalene.
Can. Jour. Microbiol. 1:206-210.

x

Störmer, K., 1908.

Über die Wirkung des Schwefelkohlenstoffs und
ähnlicher stoffe auf den Boden.
Zbl. Bakt., 11, 20. 282-286.

x

Suda, M., Hayaishi, O., & Odo, Y., 1949.

Studies of enzyme adaptation.
Tokyo Symp. Enzyme Chem., 1, 79-84.

x

Suda, M., Hayaishi, O., & Oda, Y., 1950.

Studies on adaptation. Successive adaptation with
special reference to the metabolism of tryptophan.
Med. Jour. Osaka Univ., 2, 21-31.

x

Suda, M., Hashimoto, K., Matsuoka, H., & Kamahora, T., 1951.

Further studies on pyrocatechase.
Med. Jour. Osaka, Univ., 2, 43-49.

x

Suda, M., Matsuoka, H., & Kamahora, T., 1952.

Enzymatic formation of β -ketoadipic acid.
Med. Jour. Osaka Univ., 3, 125-128.

x

Suda, M., & Takeda, Y., 1950.

Metabolism of tyrosine. Application of the successive adaptation of bacteria for the analysis of the enzymatic breakdown of tyrosine.

Med. Jour. Osaka Univ., 2, 37-40.

x

Tattersfield, F., 1928.

The decomposition of naphthalene in the soil and the effect upon its insecticidal action.

Ann. appl. Biol., 15, 57.

x

Tausson, W.O., 1927.

Naphthalin als Kohlenstoffquelle für Bakterien.
Planta, 4, 214-256.

x

Tausson, W.O., 1928a.

Naphthalene as a carbon source for bacteria.
Chem. Abstr., 23:408.

x

Tausson, W.O., 1928b.

Die oxydation des Phenanthrens durch Bakterien.
Planta, 5, 239-273.

x

Tausson, W.O., 1929.

Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien.
Planta, 7, 735-758.

Tchan, Yao-Tseng., 1946.

La benzoatase des Azotobacter.
L'Acide salicylique, terme intermédiaire de l'oxydation de l'acide benzoïque.
Ann. Inst. Pasteur 72, 826.

Thornton, H.G., 1923.

The destruction of aromatic antiseptics by soil bacteria.
Nature (Lond.) iii, 347.

x

Treccani, V., 1953.

Produzione di acido salicilico da naftalina per azione di uno schizomicete isolata da terreni petroferi
Ann. Microbiol., 5, 232.

Treccani, V., Walker, N., & Wiltshire, G.H., 1954.

The metabolism of naphthalene by soil bacteria.
Jour. Gen. Microbiol., ii : 341-348.

Tsuchida, M., Hayaishi, O., & Stanier, R.Y., 1952.

The bacterial oxidation of tryptophan.
IV. Analysis of two blocked oxydations.
Jour. Bact., 64, 49-54.

Umbreit, W.W., Burris, R.H., & Stauffer, J.F., 1947.

Manometric techniques and related methods for the
study of tissue metabolism.
Burgess Publish. Co. Miuneapolis.

x

Waksman, S.A., & Woodruff, H.B., 1942.

Soil Sci., 53, 233.

Walker, N., & Evans, W.C., 1952.

Pathways in the metabolism of the monohydroxybenzoic
acids by soil bacteria.
Biochem. Jour., 52, xxiii.

Walker, R.L., & Newman, A.S., 1956.

Microbial decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.
Appl. Microbiol. 4(4), 201.

Walker, N., & Wiltshire, G.H., 1953.

The breakdown of Naphthalene by a soil bacterium.
Jour. Gen. Microbiol. 8, 273-276.

Walker, N., & Wiltshire, G.H., 1955.

The breakdown of naphtalene by a soil bacterium.
Jour. Gen. Micr., 12, 478-483.

Walters, E.H., 1915.

The isolation of p-hydroxybenzoic acid from soil.
Jour. Amer. Chem. Soc., 39:860-863.

Webley, W.M., Duff, R.B., & Farmer V.C., 1956.

Evidence for β -oxidation in the metabolism of saturated
hydrocarbons by soil species of Nocardia.
Nature, 178, 1467-1468.

Webley, D.M., Duff, R.B., & Farmer, V.C., 1957.

Formation of a β -hydroxy acid as an intermediate in the
microbiological conversion of monochlorophenoxybutyric
acids to the corresponding substituted acetic acids.
Nature (Lond.) 179, 1130-1131.

Zwart, A.G., 1952.

Short communications.
Preliminary Notes, 9:104.