

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER DISSIMILATIE VAN VETZURE ZOUTEN EN KOOLHYDRATEN DOOR THERMOPHIELE BACTERIËN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE LANDBOUWKUNDE AAN DE LANDBOUW-
HOOGESCHOOL TE WAGENINGEN, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS Ir. J. W. DIEPERINK,
HOOGLEERAAR IN HET LANDMETEN, HET WATER-
PASSEN EN DE GEODESIE, VOOR EENE, — OVER-
EENKOMSTIG ART. 46, LID 3 VAN DE WET VAN
15 DECEMBER 1917 TOT REGELING VAN HET
HOGER LANDBOUWONDERWIJS (STAATSBLAD
No. 700), ZOOALS DIE LAATSTELIJK IS GEWIJZIGD
BIJ DE WET VAN 29 JUNI 1925 (STAATSBLAD No. 283),
— DAARTOE BENOEMDE COMMISSIE UIT DEN
SENAAT, TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 9 DECEMBER
1927, DES NAMIDDAGS TE DRIE UUR, DOOR

CASPAR COOLHAAS

LANDBOUWKUNDIGE AAN DE LANDBOUWHOOGESCHOOL
GEBOREN TE HELDER



H. VEENMAN & ZONEN — WAGENINGEN — 1927

VOORWOORD

Bij het voltooiën van een proefschrift bestaat de goede gewoonte een woord van dank te richten tot allen, die aan het tot stand komen ervan hebben bijgedragen, doch ook zonder deze traditie, zou ik de gelegenheid niet gaarne missen, om mijn grooten, diepgevoelden dank te betuigen aan U, hooggeleerden SÖHNGEN, hooggeachten promotor.

Dat gij mij, bij het beëindigen mijner studie tot Uw medewerker hebt verkozen, zal op mijn geheele leven een machtigen stempel drukken. Wat ik van U, en misschien nog meer door U, heb geleerd, is met geen woorden weer te geven.

Het is echter niet alleen, dat mijn geest is verrijkt, door het groote voorrecht te mogen werken in het door U zoo uitmuntend ingerichte laboratorium, noch de gelegenheid steeds weer te mogen profiteeren van Uwe, dikwijls geniale, gedachten, doch evenzeer door den vriendschappelijken omgang, waardoor ik mocht putten uit de bron van Uwe groote kennis en zuiver oordeel op zoo menig ander gebied, dan dat der exacte wetenschap.

Wanneer ik mijne gedachten een oogenblik laat teruggaan naar den tijd, waarin de grondslagen werden gelegd voor mijne vorming, dan kan ik niet anders dan opnieuw de gelegenheid prijzen, die mij in staat stelt, dank te betuigen aan allen, van wien ik onderwijs heb mogen ontvangen; meer in het bijzonder denk ik daarbij aan U, zeergeleerde VAN LOHUIZEN en VAN DEN ENDE. Door Uwe lessen werd bij mij voor het eerst belangstelling en liefde opgewekt voor wetenschappelijke studie.

Ook aan U, hoogleeraren dezer hoogeschool, die door Uwe leiding aan mijne opleiding hebt bijgedragen, breng ik oprechten dank.

Het was op Uw laboratorium, hooggeleerde ABERSON, dat ik voor het eerst kennis maakte met het wetenschappelijk experiment; Uwe bezielende leiding en groote belangstelling in Uwe leerlingen is ook voor mij van onschatbare waarde geweest.

Ook aan U, hooggeleerden OLIVIER ben ik grooten dank verschuldigd; Uwe heldere colleges waren het, die een hechten grondslag hebben gelegd voor de in mijn vak zoo noodzakelijke kennis der chemie.

Naast den dank echter, die ik aan mijne leermeesters verschuldigd ben, voel ik nog eene andere verplichting, deze bestaat in alles wat ik verplicht ben aan het *Wageningsch Studentencorps*. Den invloed van den omgang met anderen, welke het gevolg is van een zoo hechten band, als door deze eenheid wordt gelegd, acht ik van bijna even groote waarde, als het genoten onderwijs.

Ten slotte breng ik een woord van dank aan allen, die hebben medegewerkt aan het tot stand komen van dit proefschrift, in het bijzonder aan U, waarde WIERINGA, ben ik grooten dank verschuldigd voor de bereidwilligheid, waarmede Gij, als oudere collega, voor mij het pad hebt geëffend. Ook aan de studenten, die onder mijne leiding, sommige proeven hebben uitgevoerd, breng ik mijn dank.

De beide amanuenses van het laboratorium dank ik voor de blijmoedigheid, waarmede zij mijne dikwijls minder aangenaam riekende culturen hebben opgeruimd.

STELLINGEN

I

De systematiek der Schizosaccharomyceten dient slechts twee speciës te onderscheiden, t.w. Sch. octosporus en Sch. tetrasporus, tot welke laatste soort alle bekende viersporige deelende gisten moeten worden gerekend.

II

Het aantonen van acetaldehyde bij biochemische dissimilatieprocessen door middel van z.g. „Abfangverfahren”, is geen deugdelijk bewijs voor het werkelijk ontstaan van deze verbinding als tusschenprodukt.

III

De reactie op jodaten, t.w. het aantonen van vrij jodium door toevoeging van verdund zwavelzuur, kan ook bij aanwezigheid van nitriet, zonder voorbehandeling worden uitgevoerd.

IV

Alleen in de in een galactoseoplossing nieuw geproduceerde gistcellen (van *S. Cerevisiae*), heeft een verandering plaats in het zymase-complex, wat een vergisting dezer suiker ten gevolge heeft.

V

Ultraviolette lichtstralen kunnen slechts een schadelijken, nimmer een stimuleerenden invloed uitoefenen op de alcoholische gisting.

VI

Voor het constateeren van groote verschillen in de hoeveelheden van voor de planten opneembaar phosphorzuur en kali in den bodem, is de methode van NEUBAUER bruikbaar en kan in overeenstemming hiermede dienst doen bij het onderzoek naar de mestbehoefte van den grond als een orienteerende proef, voorafgaande aan- en in samenwerking met veldproeven.

VII

Voor het in de vorige stelling genoemde doel, is de methode van LEMMERMAN te verkiezen boven die van NEUBAUER.

VIII

Wettelijke standarisatie van melk is in het algemeen belang.

IX

Het door de codex alimentarius genoemde getal *Zeven*, waarmede het gevonden stikstofbedrag moet worden vermenigvuldigd, teneinde het eiwitgehalte in melk te bepalen, is te hoog.

X

Het weder in actie komen van een kaliumvrij gespoeld hart door de Ringersche vloeistof, welke een met radium of polonium bestraald hart is gepasseerd, kan verklaard worden door

absorptie dezer stralen, zoodat de aanname van een gevormd hormoon onnoodig is.

(H. ZWAARDEMAKER: Versl. Kon. Ac. van Wetensch., 27 Nov. 1926 en 26 Maart 1927.)

XI

De vergisting van cellulose tot koolzuur en methaan, is het gevolg van de samenwerking van meer dan één bacterie.

XII

Men moet zich het leven op aarde ontstaan denken uit levenlooze stof.

INHOUD.

	Blz.
Inleiding	1
Hoofdstuk I: Bespreking van de literatuur over Thermophile organismen in het algemeen.	
§ 1. De oudste onderzoekingen.	3
§ 2. Thermophile bacteriën in heete bronnen. Reductie van sulphaten en ijzerverbindingen.	4
§ 3. Het voorkomen van thermophile bacteriën op plaatsen, waar zelden of nooit bijzonder hoge temperaturen worden aangetroffen.	7
§ 4. Physiologische eigenschappen der thermophile bacteriën.	13
§ 5. Onderzoek der dissimilatieprocessen bij hoge temperatuur.	18
§ 6. Résumé.	21
Hoofdstuk II: Thermophile methaangistingen.	
§ 1. Inleiding.	23
§ 2. De vergisting van Calciumacetaat tot koolzuur en methaan.	23
§ 3. De vergisting van enkele andere zouten tot koolzuur en methaan.	34
§ 4. De vergisting van pepton en van rietsuiker tot koolzuur en methaan.	40
§ 5. De vergisting van cellulose tot koolzuur en methaan....	43
Hoofdstuk III: De dissimilatie van zetmeel door thermophile bacteriën.	
§ 1. Inleiding.	46
§ 2. Aerobe aantasting en vergisting van zetmeel in de ruw-culturen	47
§ 3. De isolatie der betreffende zetmeelaantastende bacteriën..	49
§ 4. Isolatie van verschillende aerobe zetmeelhydrolyseerende stammen en de beschrijving der voornaamste.	51

	Blz.
§ 5. De aard en de snelheid der zetmeelhydrolyse door de reïnculturen van de stammen I en II.....	56
§ 6. Identificatie der bacteriesoort.....	62
 Hoofdstuk IV: De vergisting van suiker door thermophile bacteriën tot koolzuur, waterstof en organische zuren.	
§ 1. Inleiding.....	64
§ 2. De vergisting van saccharose en van glucose in ruwcultuur.	65
§ 3. De isolatie van de thermophile gistende bacterie.....	68
§ 4. Beschrijving van de geïsoleerde gistende bacterië.....	76
§ 5. Kwalitatief onderzoek naar de gevormde producten bij de vergisting van glucose, saccharose en zetmeel.....	79
§ 6. Kwantitatieve analyses.....	83
§ 7. Identificatie der thermophile gistende bacterië.	94
§ 8. Een vergelijkend onderzoek naar de vergisting van glucose saccharose, gelijke deelen glucose en laevulose, laevulose, maltose en zetmeel.....	95
§ 9. Enkele waarnemingen omtrent het chemisme dezer gistingen.	97
§ 10. Conclusies	100
 Hoofdstuk V: Dissimilatie van cellulose door thermophile bacteriën.	
§ 1. Inleiding.....	103
§ 2. De vergisting van filtreerpapier in ruwcultuur.....	112
§ 3. De isolatie van de thermophile cellulose-aantastende bacterie.....	114
§ 4. Beschrijving van de aerobe thermophile cellulose-aantastende bacterie.....	117
§ 5. Pogingen om vergisting te verkrijgen met de geïsoleerde reïncultuur.	118
 Hoofdstuk VI: De mogelijkheid van toepassing van thermophile gistingen.	
§ 1. Inleiding.....	122
§ 2. Ondervindingen bij de vergisting van gebruikte hop.	123
§ 3. Methaangisting van koolafval bij verschillende temperatuur.	124
Samenvatting	136
Alphabetisch register der geraadpleegde literatuur	141

INLEIDING

Het is bekend, dat de voornaamste beteekenis der micro-organismen in de huishouding der natuur bestaat uit het weder doen uiteenvallen van de samengestelde verbindingen, welke door de hooger georganiseerde wezens zijn opgebouwd, een reeks biochemische processen, welke in het algemeen worden aangeduid met den term „*dissimilatie*”, een proces, dat bij de micro-organismen vaak het tegenovergestelde, de opname van eenvoudige verbindingen, de „*assimilatie*” verre overtreft.

Sedert nu in 1879 door MIQUEL voor de eerste maal een organisme werd geïsoleerd, nog in staat zich bij 72° C. te vermenigvuldigen, zijn talloze mededeelingen verschenen over deze „*thermophile bacteriën*”, doch over het aandeel dezer merkwaardige micro-organismen in de dissimilatieprocessen was tot nu toe weinig bekend.

Toch was uit deze onderzoekingen al wel gebleken, dat in ophooping van organisch materiaal de hoeveelheid thermophile bacteriën buitengewoon groot is, een gevolg van de daar heerschende hooge temperatuur, ontstaan door een z.g. zelfverhitting, die door vele onderzoekers mede aan de werkzaamheid dezer organismen wordt toegeschreven. Het is dus zeer waarschijnlijk, en voor de dissimilatie van cellulose ook reeds bekend, dat thermophile bacteriën hier een belangrijke functie verrichten.

Het doel van dit onderzoek was onze kennis hieromtrent uit te breiden, waarbij meer in het bijzonder aandacht zou worden geschonken aan de bij hooge temperatuur verloopende

gistingsprocessen, omdat deze als den snelsten vorm van dissimilatie moeten worden beschouwd.

Een directe aanleiding hiertoe was een mondelinge mededeeling van Prof. SÖHNGEN, dat, naar hem gebleken was bij het onderzoek over de methaangistingen, ook bij 60° C. en hooger, Calciumacetaat tot koolzuur en methaan kon worden vergist, een proces, dat bezien in verband met enkele in de literatuur voorkomende onvolledige mededeelingen omtrent eene vergisting van suikers en van dextrine, zoowel als van de meer uitgebreide onderzoekingen over de vergisting van cellulose bij hooge temperatuur, van groot belang is, omdat het juist de vetzure zouten zijn, welke hierbij als eindprodukt optreden.

Het leek mij gewenscht, om aan eene bespreking van hetgeen omtrent de dissimilatie van koolstofverbindingen bekend was door thermophile bacteriën, een beknopt overzicht te doen voorafgaan over de belangrijkste in de literatuur voorkomende mededeelingen over deze organismen in het algemeen.

Daar de grenzen tusschen deze en andere bij lagere temperatuur groeiende „*mesophile*” organismen niet scherp zijn gesteld, is het gewenscht voor een juiste bepaling van het begrip „*thermophil*” voorop te stellen, dat bij mijn eigen onderzoek steeds zal worden gewerkt bij een temperatuur varieerend van 55—65° C., terwijl een organisme, welks optimumtemperatuur boven 50° C. en welks minimumtemperatuur boven 30° C. ligt, zal worden beschouwd, als te behooren tot de thermophile groep.

HOOFDSTUK I

BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER THERMOPHIELE ORGANISMEN IN HET ALGEMEEN

§ 1. De oudste onderzoekingen.

De grootte van het temperatuurgebied, waarbinnen het organisch leven op aarde mogelijk is, vertoont een merkwaardig verschil tusschen den hoogsten grens voor de meer gedifferentieerde vormen en die voor de micro-organismen; voor de eerstgenoemden zal zij de 40° C. niet noemenswaard overschrijden, voor de laatsten klimt zij niet minder dan ruim 30 graden hoger. Gebleken is niet alleen, dat er verschillende micro-organismen zijn, welke bij deze, naar menschenlijke begrippen abnormale levenstemperaturen kunnen groeien en zich vermenigvuldigen, doch verscheidene vormen vertoonen bij 60° C. en hoger optimale levensfuncties en kunnen zich beneden de 50 graden geheel niet ontwikkelen.

De eer der prioriteit op dit belangrijke terrein der microbiologie komt toe aan den Franschman MIQUEL, die reeds in 1879 een mededeeling publiceerde over een bij 72° C. groeiende bacillus, welke hij isoleerde uit het water van de Seine bij Parijs; vóór dien tijd had de door COHN beschreven *Bac. subtilus* gegolden als de bacterie, die de hoogst bekende temperatuur voor levend protoplasma verdroeg, n.l. 50° C.

Daar de vondst van MIQUEL door VAN ERMENGEM in twijfel werd getrokken, volgde een hernieuwde publicatie in 1881, waarbij MIQUEL de door hem gevonden bacterie wat nader

beschrijft en den naam geeft van *Bac. thermophilus*. Het is een staafje met eindstandige sporen, welke op agar bij 50 à 60 graden Celsius koloniën vormt en zeer gemakkelijk is te isoleeren uit grond, slootwater en darmkanalen.

Hij besluit met de opmerking dat, daar alle protoplasma-eiwitten bij deze temperatuur stollen, zijn bacterie een geheel afwijkende protoplasma-samenstelling moet bezitten.

De ontdekking van MIQUEL, omtrent het bestaan van een levend organisme, nog in staat zich bij 72° C. te vermenigvuldigen wordt al spoedig bevestigd door VAN TIEGHEM, die twee bacterie-soorten, een bacillus en een micro-coccus isoleerde, beiden nog in staat zich bij 74° C. te vermeerderen.

Sedert dien is het aantal publicaties over de thermophile micro-organismen tot een zeer groot aantal gestegen; aanvankelijk bleef het slechts bij een korte beschrijving der isolatie en het vermelden van eenige morphologische eigenschappen der bacteriën en van de koloniën op verschillende voedingsbodems, naderhand werd ook meer aandacht geschonken aan de physiologische kenmerken.

De voornaamste publicaties zal ik aan een korte bespreking onderwerpen terwijl die, waarin dissimilatie van organische stoffen door thermophile bacteriën wordt besproken, meer uitvoeriger worden behandeld.

§ 2. Thermophile bacteriën in heete bronnen. Reductie van sulphaten en ijzerverbindingen.

Een biologisch onderzoek van in de natuur voorkomende warme bronnen werd voor de eerste maal ingesteld door CERTES en CARRIGOU in 1886.

Zij onderzoeken het bezinksel en het water van de heete bronnen bij Luchon in de Pyreneeën, wier water een temperatuur bezit van 64° C. Zij vinden kleine beweeglijke staaf-

bacteriën, zeldzamer ook onbeweeglijke draden; zwavelkorrels worden hier niet waargenomen; algen, diatomeeën, infusoriën e.d. ontbreken.

Verder van de bron af echter, waar het water nog een temperatuur boven de 50° C. heeft, worden in het slib zeer veel staafvormige bacteriën aangetroffen en zoëgloëën met door reductie ontstane zwavel. Deze bacteriën gelijken in bijna alle opzichten zeer veel op die in de bron, welke echter geen zwavel bevatten.

Zij beëindigen hun interessante mededeeling met de opmerking:

„Quant à l'action chimique et au rôle biologique des bâtonnets et des filaments, ils ne peuvent être établis que par des expériences plus complètes. Les phénomènes de décomposition des sulfates qui coïncident avec le développement des organismes microscopiques paraissent constants.”

KARLINSKI en kort daarna ook TEICH onderwerpen de zwavelthermen van ILIDZE in Bosnië aan een biologisch onderzoek in 1895 en '96.

De temperatuur van de oude bron is 51°, van de nieuwe 58° C. Uitzaaïngen bij kamertemperatuur hebben dikwijls geen resultaat, daarentegen worden op aardappel en op bloedserumagarplaten bij 55° C. twee verschillende stammen geïsoleerd, welke geen van beiden beneden 50° meer groei vertoonen. De eerste, *Bact. Ludwigii* genoemd, maakt een geel pigment, is in staat eenig zuur uit glucose te vormen en vertoont nog tot boven 75° vermeerdering; de tweede, *Bac. Ilidzensis capsulatus* is een staafbacterie, welke nog bij 68° sporen vormt en geen pigment bevat. De sporen zijn na 4 min. bij 100° gedood.

In hetzelfde jaar volgt een publicatie van MIYOSHI „Ueber das massenhafte Vorkommen von Eisenbakterien in den Thermen von Ikao in Japan”.

De heete bron van Ikao in Japan vertoont een modderafzetting, welke geheel uit bacteriën blijkt te bestaan; het zijn geelachtig gekleurde draderige cellen van een halve μ doorsnede, door behandeling met verdund zoutzuur worden zij ontkleurd, het ijzeroxyde bevindt zich blijkbaar ook in de cel. In dergelijke bronnen bij Bad Yumoto, waarvan de temperatuur wisselt van 51—70° C. worden ook zwavelbacteriën aangetroffen.

Eveneens is het water onderzocht van de warme bronnen van het eiland Ischia door M.^{elle} TSIKLINSKY. Zij vond in het water van 43, 51 en 73° onbeweeglijke grampositieve staafbacteriën, welke een optimum groeitemperatuur hadden van 60° C. en nog bij 70° zich vermenigvuldigden. Over de heete bron bij Josan Kei, waarin een nog bij 77,5° C. groeiende Bacillus voorkomt, bericht MOLISCH in zijn reisbeschrijving van Japan.

In aansluiting met bovenstaande mededeelingen omtrent de sulfaatreductie in verschillende warme bronnen, vermeld ik hier een recente publicatie van ELION over een door hem uit grachtwater geïsoleerd thermophil sulfaatreducerend organisme, een gramnegatieve weinig gebogen bacterie, welke reeds 12 uur na de enting bij 55° C. onder anaerobe omstandigheden door zwavelijzer zwart gekleurde koloniën in de agar vertoont.

De bacterie, welke *Vibrio thermodesulfuricans* werd genoemd, vertoonde bij deze temperatuur zijn optimalen groei; zwavelwaterstof kan nog worden gevormd tot 65° C.; de laagste grens voor de ontwikkeling der bacterie ligt bij 30° C.

In mijn eigen werk over de suikergistingen bleek deze bacterie ook van tijd tot tijd als infectie op te treden, wat tot gevolg had het grijs van kleur worden van het Calciumcarbonaatbezinksel op den bodem der gistingkolf en de ontwikkeling van kleine hoeveelheden zwavelwaterstof.

§ 3. Het voorkomen van thermophile bacteriën op plaatsen, waar zelden of nooit bijzonder hoge temperaturen worden aangetroffen.

Reeds de allereerste onderzoekingen van MIQUEL toonden aan, dat in het water van de Seine een bacterie voorkwam met een buitengewoon hoge optimumtemperatuur; dat het aantal van zulke bacteriën in den gewonen tuingrond zeer groot is, werd bewezen door GLOBIG.

Hij isoleerde daaruit bij 60° niet minder dan dertig op aardappel verschillende kolonievormen vertoonende soorten en een enkele schimmel, waarvan echter het mycelium zeer was gereduceerd.

Het zijn allen sporenvormende staafbacteriën, vele groeien behalve bij hoge, ook zeer goed bij veel lagere temperaturen, andere echter vertoonen een zeer hoge minimumtemperatuur, n.l. van 50° C. en enkele zelfs nog hooger. GLOBIG onderscheidt dan ook voor het eerst *thermotolerante*-, d.w.z. die behalve lage ook zeer hoge temperatuur verdragen kunnen en *thermophile* bacteriën, voor welke deze laatste temperatuur noodzakelijk is voor hunne ontwikkeling.

Hij doet nu waarnemingen aangaande het aantal dezer thermophile bacteriën in grondlagen op verschillende diepte en komt dan tot het resultaat, dat deze organismen, mits de proef gedaan wordt met nog nimmer bewerkten grond, uitsluitend in de allerbovenste laag te vinden zijn.

Natuurlijk doet zich de vraag voor: hoe komt het, dat bacteriën gevonden worden in gronden onzer gematigde luchtstreek, welke organismen in het laboratorium een minimumtemperatuur vertoonen, slechts overeenkomend met zeer zelden en onder abnormale omstandigheden waargenomen temperaturen onzer lucht of bovenste grondlagen?

GLOBIG vraagt zich af, of het wellicht mogelijk is, dat directe

zonbestraling van donker gekleurde aardoppervlakten voldoende is, om voor dergelijke organismen gunstige levensomstandigheden te voorschijn te roepen.

Aardappelschijven, gelegd tegen zwarten achtergrond worden geïnfecteerd met verschillende zijner thermophile bacteriestammen en aan loodrechte zonbestraling blootgesteld; deze proeven mislukken echter alle door indroging van den voedingsbodem, voordat er iets van groei daarop is te zien geweest.

Ook wordt door hem in verschillende grondsoorten tegen zwarten achtergrond bij directe loodrechte zonbestraling de temperatuur gemeten; de hoogst waargenomen waarde was in tuinaarde op zwarte plank, 56° C. om 3 uur in den namiddag in de maand Juli.

Veel wordt door deze proeven dus niet opgehelderd; een aanwijzing, dat de klimatologische factoren toch een rol van betekenis spelen acht GLOBIG het menigvuldiger voorkomen der thermophile bacteriën in tropische gronden, dan in den grond onzer gematigde luchtstreek.

Ook wordt door DE KRUYFF in gronden op Java zeer vele thermophile bacteriën gevonden, niet alleen is het aantal individuën groter maar ook het aantal soorten; hij vond ook in deze gronden gedurende vele uren per dag temperaturen, hoog genoeg voor een goede ontwikkeling dezer bacteriën.

Echter, en dit blijkt wederom uit de proeven van GLOBIG, treft men er, hoewel minder in aantal, zelfs aan in de gronden van Drontheim en van de Hebriden.

Hoewel dus het grooter aantal thermophile stammen in de tropen wel degelijk het gevolg is van de verhoogde temperatuur der gronden zelve, blijkt toch wel uit het werk van GLOBIG zelf en ook van anderen, dat in onze streken de plaats der isolatie, wat de temperatuur betreft, die er voorkomt, in geenerlei verband staat tot de aanwezigheid van thermotolerante of zelfs thermophile organismen. Dat directe zonbestraling de ver-

klaring zou kunnen zijn van het veelvuldig voorkomen dezer microben, zoowel in gronden, wateren, spijsen en dranken als in de darmkanalen van allerlei dieren, moet uitgesloten worden geacht.

Een tweede onderstelling wordt aan de hand gedaan door M.^{elle} TSILKINSKY, die zich veel met de isolatie dezer organismen heeft beziggehouden en niet alleen, zooals reeds vermeld, uit warme bronnen, doch ook vele thermophile-soorten isoleerde uit den grond en uit het darmkanaal van volwassenen en zuigelingen. Bij één harer onderzoekingen vond zij, dat een bacillus, geïsoleerd uit de heete bron bij Ischia alle overeenkomst vertoonde met *Bac. subtilis*. Zij kwam toen op het idee te probeeren of *Bac. subtilis* uit hare laboratoriumverzameling door overentingen naar steeds hogere temperaturen zou zijn aan te passen aan de hooge groeitemperatuur van de bacterie uit de bron, zoodat dan alle verschillen zouden zijn weggewallen. Dit gelukte ook werkelijk; bij de tiende overenting was *Bac. subtilis* uit het laboratorium tot dezelfde hooge groeitemperatuur aangepast als die uit de bron, n.l. 58,5° C., bij welke temperatuur beiden nu evengoed groeiden. Op deze waarneming berust hare veronderstelling, dat het voorkomen der thermophile bacteriën op plaatsen, waar de minimum groeitemperatuur niet bereikt wordt, verklaard moet worden door de aanpassingsmogelijkheden der levende cellen.

In een recente publicatie van GOLIKOWA wordt gewezen op de mogelijkheid eener atavistische aanpassing, waartoe verscheidene bacteriën in staat zouden zijn, indien zij bij stijgende temperatuur gedwongen waren te leven. Merkwaardig is wel, dat hij niet in aansluiting met die theorie probeert allerlei mesophile stammen door overentingen tot thermotolerante of zelfs thermophile bacteriën te maken, maar omgekeerd tracht de optimale groeitemperaturen van eenige thermophile stammen omlaag te krijgen.

Het gelukte hem een bij 70° C. optimaal groeiende bacterie zeer goed bij 37° te cultiveeren, wanneer men steeds overentte naar een temperatuur iets lager dan de voorgaande. De bacteriën toonden dan echter zeer vele afwijkingen, de lange dunne aaneengeregen staven werden korte dikke bacteriën. Eenige eigenschappen, welke bij de hooge temperatuur nog aanwezig waren, bleken verloren gegaan te zijn, n.l. zuurvorming uit eenige koolhydraten. Wanneer wederom naar de oorspronkelijke optimumtemperatuur wordt teruggeënt, dan treden de verloren gegane eigenschappen opnieuw op, hetgeen wel bewijst, dat de hooge en niet de lagere temperatuur de normale is.

De beide stammen, d.w.z. de oorspronkelijke thermophile en de bij lagere temperatuur door aanpassing verkregen stam, maakten dezelfde antilichamen bij konijnen, hetgeen door aglutinatieproeven werd aangetoond; in dit opzicht bleven zij zich dus als één en dezelfde bacteriesoort gedragen.

Hoewel dus wel eens een dergelijke verandering in de maximumtemperatuur geslaagd is, gelukt dit echter meestal niet, zooals blijkt uit het werk van anderen, bijvoorbeeld uit de proeve van GILBERT met thermomyces en ook door eigen waarneming kon dit worden vastgesteld met verschillende thermophile aerobe bacteriën.

In dit verband wijs ik nog op een zeer recente mededeeling van TANNER en WALLACE, die een groot aantal proeven hebben gedaan over de groeisnelheden van een drietal bacteriestammen; zij komen daarbij tot de volgende resultaten: De drie gebruikte bacteriën groeiden zoowel bij 55, als bij 37 en bij 20° C.

De groeisnelheid was echter steeds bij de eerste temperatuur de grootste, bij de beide andere temperaturen was een vrij langdurige periode waarin geen groei werd waargenomen, door hen incubatietijd genoemd, merkbaar. Het is duidelijk, dat in geval van een aanpassing van de bacteriën aan een

hoogere optimumtemperatuur, deze incubatietijd steeds korter zou moeten worden, iets dergelijks wordt echter door hen nimmer waargenomen.

Moeten wij dus aannemen, dat de klimatologische omstandigheden niet in belangrijke mate het voorkomen van thermophile bacteriën bepalen, en dat evenmin het aantal bacteriesoorten, welke ten opzichte van de temperatuur aanpassingsverschijnselen vertoonen, een belangrijk gedeelte dezer organismen uitmaken, dan is het duidelijk, dat wij naar groeiplaatsen dezer thermophile bacteriën moeten zoeken, in de veronderstelling, dat zij van daaruit over de gansche aardoppervlakte worden verbreid.

Inderdaad blijkt, bij nadere beschouwing, deze veronderstelling zeer goed met de feiten in overeenstemming; de thermophile bacteriën zijn immers vrijwel allen sporenvormers, zoodat zij dan ook in staat zijn, overal waar de temperatuur voor hen te laag is, gedurende zeer langen tijd in leven te blijven.

Welke zijn echter deze kweekplaatsen? Reeds in 1893 werd door COHN gewezen op het groote aantal thermophile organismen in allerlei aan zelfverhitting onderhevige ophooping van organisch materiaal. MIEHE vindt in broeiend hooi zeer vele thermophile bacteriën; hij schrijft deze warmteontwikkeling ook toe aan de ademhaling en andere biochemische processen der micro-organismen in opeenvolgende volgorde naar de hoogte hunner verschillende maximumtemperaturen. Ook MACFAYDEN en BLAXALL vinden in dergelijke ophooping vele thermophile organismen; zij zijn de eersten, die zich de vraag stellen, wat hier wel hunne functie zou kunnen zijn en meenen, dat zij in de dissimilatie der organische stof een groote rol spelen, met name in de fermentatie van cellulose, welk proces mede één der oorzaken kan zijn der temperatuursver-

hooging, zoodat dit zou worden ingeleid door vele mesophile schimmels en bacteriën, en het proces, naar gelang de temperatuur stijgt, steeds meer in thermophile richting wordt verschoven.

Deze meening wordt niet gedeeld door BOEKHOUT en DE VRIES, die in deze zelfverhitting slechts een zuiver chemisch proces zien, terwijl BURRY en ook LAUPPER het waarschijnlijk maken, dat enzymatische werkingen in de plantenresten zelve hier de oorzaak zouden zijn van de oplopende temperatuur. In een recente publicatie van HILDEBRANDT wordt echter weer de meening, gesteund door een groot aantal proeven, uitgesproken, dat het tot een temperatuur van 70°, hoofdzakelijk verschillende micro-organismen zijn, welke als de oorzaak moeten worden beschouwd van de verwarming.

Hoe dit ook zij (het meest waarschijnlijke lijkt mij, dat hier factoren van geheel verschillenden aard samenwerken), het is zeker, dat in deze ophooping en de voorwaarden uiterst gunstig zijn voor een snelle vermeerdering der thermophile organismen, n.l. groote hoeveelheden organisch materiaal en een zeer hooge temperatuur; het aantal dezer bacteriën is dan ook, zooals tal van proeven van verschillende onderzoekers hebben aangetoond, buitengewoon groot, zoodat de alomtegenwoordigheid van sporen der thermophile bacteriën m.i. gerust verklaard mag worden door mechanisch transport vanuit deze kweekplaatsen, wier aantal ongetwijfeld zeer groot is en zeker niet alleen de door den mensch opgeworpen mesthoopen of hooibergen omvat (vergelijk ook RAMANN). Een daadwerkelijke steun voor deze theorie zijn in de eerste plaats de proeven van GLOBIG zelf over het aantal thermophile bacteriën in bewerkte en in onbewerkte gronden, maar ook het werk van NOACK, die over het voorkomen dezer organismen een zeer groot aantal proeven deed, leidt tot deze conclusie evenals de zeer recente onderzoekingen van MICHUSTIN, die het aantal ther-

mophile bacteriën in den grond afhankelijk vindt van de hoeveelheid gebruikten stalmest.

§ 4. Physiologische eigenschappen der thermophile bacteriën.

Kunnen de door MIQUEL, VAN TIEGHEM, GLOBIG e.a. gedane onderzoeken beschouwd worden als de interessante beschrijving van een aantal biologische curiositeiten, al spoedig volgen mededeelingen, waarin meer aandacht geschonken wordt aan de biochemische eigenschappen der geïsoleerde bacteriën en treedt dus de vraag op den voorgrond in hoeverre zij deel nemen aan de biochemische dissimilatie der door de hoogere organismen opgebouwde organische stoffen.

LYDIA RABINOWITSCH isoleerde uit grond, mest, stof, ja zelfs uit sneeuw op aardappel en op agarplaten een achttal thermophile bacterie-soorten, welke zij ook op eenige physiologische eigenschappen onderzocht; No. 1, 3, 5 en 8 vormen zuur in bouillon, No. 4, 6 en 7 alkali, alle reduceeren nitraten en waren onbeweeglijke sporenvormende staaftbacteriën met een optimumtemperatuur van 60—70° C. Ten opzichte van gisting, welke ook met de door haar beschreven soorten werd bestudeerd, zegt zij: „Meine Versuche, die Entwicklung von Gasen bei den thermophilen Bakterien zu bestimmen, ergaben keine erheblichen Resultaten. Die Produktion von Kohlensäure konnte zwar festgestellt werden, aber nur in kleinen Quantitäten und zwar bildeten die Bakterien merkwürdigerweise in einfachen Bouillon mehr Kohlensäure als in Traubenzuckerbouillon.”

LAXA maakt melding van een z.g. „Schaumgärung” in de suikerfabrieken, veroorzaakt door bij 55° C. groeiende bacillen, welke uit pepton ammoniak vrijmaken en veel slijm vormen op aardappel; in bouillon met 10 % saccharose wordt gasontwik-

keling waargenomen, een huid groeit aan de oppervlakte.

CATTARINA vermeldt een in bouillon bij 60° C. zuurvormende slijmige bacillus, welke ook melk coaguleert en den naam gegeven werd van *Bac. thermophilus radiatus*.

Een meer volledige beschrijving van de physiologische eigenschappen dan tot nu toe was gedaan, vinden we van vijf verschillende thermophile soorten, geïsoleerd door OPRESCU in 1895. Hij onderzocht op gelatinevervloeiing, melkcoagulatie, zetmeelsplitsing, nitraatreductie en vergisting van glucose. Gelatinevervloeiing en melkcoagulatie werd waargenomen bij twee van de vijf soorten, door hem *Bac. thermophilus liquefaciens aërophilus* en *Bac. thermophilus liquefaciens tyrogenus* genoemd. Het proteolytische enzym kon uit 20 dagen oude culturen worden aangetoond door middel van dooding van het levend protoplasma met thymol.

Op deze wijze gelukte het eveneens uit No. 1 een amylolytisch enzym aan te toonen. Reductie van nitraten en indolvorming werd waargenomen bij de vierde bacterie, welke den naam kreeg van *Bac. thermophilus reducens*. Gisting van glucosebouillon kon bij gene dezer bacteriën worden aangetoond.

Veel aandacht aan de physiologische eigenschappen werd ook geschonken door MICHAËLIS, welke uit bronwater vier soorten isoleerde door voedingsbouillon met evenveel bronwater bij 55° C. weg te zetten en uit te zaaien op agarplaten. *Bac. thermophilus aquatilis liquefaciens* coaguleert melk en vervloeit eenigszins gelatine, glucosebouillon is na eenigen tijd zuur, bouillon zonder glucose alkalisch, gasontwikkeling wordt niet waargenomen. *Bac. thermophilus aquatilis liquefaciens aerogenes* vervloeit sterk gelatine, maakt geen zuur noch gas uit glucose- of lactosebouillon, uit bouillon alleen alkali. *Bac. thermophilus aquatilis chromogenus* maakt een bruinroode kleur in het condenswater, groeit niet op gelatine, maakt in

bouillon alkali en eenig zuur uit glucose, gasontwikkeling wordt niet waargenomen. *Bac. thermophilus aquatilis aquinosus* maakt grauw-gele koloniën, groeit bij 37° zeer weinig, coaguleert melk, maakt zuur uit glucose, doch ook hier treedt geen gasontwikkeling op.

SAMES isoleerde uit het meest uiteenlopend materiaal een achttal thermophile bacteriën, waarvan eenige alkali maakten in bouillon en zuur uit koolhydraten, terwijl enkele ook hydrolyse van zetmeel vertoonden.

Van de voorgaande onderzoeken kan gezegd worden, dat zij hebben aangetoond, dat verschillende thermophile bacteriesoorten vele biochemische omzettingen tot stand kunnen brengen, doch de bacteriebeschrijving is te onvolledig, om het mogelijk te maken identiteit van de genoemde soorten onderling of van enkele dezer met de in het eigen onderzoek verkregene vast te stellen.

Een zeer volledige bacteriebeschrijving daarentegen wordt gegeven door BLAU, WEINZIRL en BERGEY, waarvan ik echter hier slechts een bespreking der physiologische eigenschappen laat volgen, terwijl bij de beschrijving van de door mij geïsoleerde diastasebevattende stammen een vergelijking met eenige hunner bacteriën noodig zal zijn.

De door BLAU geïsoleerde *Bac. cylindricus* vormt alkali in bouillon, bevat glycogeen als reservestof en hydroliseert zetmeel. *Bac. tostus* bevat eveneens diastase, vormt ammoniak in eiwitrijke voedingsbodems en zuur uit glucose. *Bac. robustus* maakt eveneens zuur, bevat glycogeen als reservestof, doch vertoont geen zetmeelhydrolyse. *Bac. calidus* bevat glycogeen en vultine als reservestoffen en maakt evenmin diastase. Geen enkele der beschreven bacteriesoorten ontwikkelt gassen uit koolhydraten.

WEINZIRL isoleert uit verduurzaamde levensmiddelen *Bac. thermoindifferens*, welke zuur doch geen gassen maakt uit glucose, niet uit lactose, saccharose en manniet, zetmeel wordt gehydrolyseerd en gelatine vervloeit. Melk wordt gecoaguleerd doch ammoniak of indol wordt niet gevormd. *Bac. aerothermophilis* maakt zuur uit glucose, lactose, saccharose en manniet, melk wordt gecoaguleerd en zetmeel gesplitst, uit eiwitten wordt ammoniak en indol gevormd, gasontwikkeling uit koolhydraten vindt niet plaats. *Bac. thermoalimentophilus* maakt geen zuur noch gassen uit koolhydraten, vormt evenmin ammoniak of indol en bevat ook geen diastase.

BERGEY isoleerde uit verschillend milieu een negental thermophile soorten, waarvan No. 1, *Bac. thermodiastaticus* gelatine vervloeit, melk coaguleert, nitraten reduceert en zetmeel hydrolyseert. No. 3, *Bac. lobatus* vervloeit eveneens gelatine, reduceert nitraten tot nitrieten, maakt een weinig zuur in melk en splitst zetmeel. No. 4, *Bac. Thermononliquefaciens* vervloeit geen gelatine, reduceert nitraten tot nitrieten en ammoniak, maakt eenig zuur in melk, coaguleert niet en hydrolyseert zetmeel.

MORRISON en TANNER geven een uitgebreid in tabelvorm behandeld overzicht van de in den loop der jaren geïsoleerde thermophile bacteriën. Zij verzamelen er zelve niet minder dan 52 en bespreken hiervan een groot aantal physiologische eigenschappen. Zij zijn alle uit water geïsoleerd, en strikt aerob. Ze vormen alle sporen en vervloeien gelatine, melk wordt steeds gecoaguleerd of, indien geen peptonisatie optreedt, wordt toch zuurvorming waargenomen; ook wordt zuur gevormd uit vele koolhydraten en steeds, hoewel verschillend in intensiteit, zetmeel gehydrolyseerd. Alle stammen rekenen zij dan ook te behooren tot één enkele groep en een onderscheiding is alleen ten opzichte der physiologische eigenschappen mogelijk door een verschil in gedrag tegenover koolhydraten. De optimum-,

minimum- en maximumtemperaturen moeten nog nader worden bestudeerd.

TANNER en HARDING waren in staat uit alle melkmonsters, welke zij direct na het verlaten van de stal onderzochten, thermophile bacteriën te isoleeren; verscheidene waren strikt thermofiel en vertoonden geen groei meer bij 37° C., anderen groeiden zelfs nog bij 20°. De meeste soorten waren facultatief anaerob, enkele strikt aerob, vele splitsten zetmeel en maakten zuur uit glucose en saccharose, niet echter uit lactose. De omzettingen in melk verliepen echter slechts zeer langzaam, eenige stolling en alkalivorming werd waargenomen. Van een viertal anaerobe bacteriën wordt door DAMON en FEIRER opgegeven, dat zij zuur maken en gas ontwikkelen uit verschillende koolhydraten, doch nimmer uit glucose.

Uit dit zoo beknopt mogelijk gehouden overzicht blijkt dus wel, dat inderdaad bij een groot aantal thermophile bacteriestammen eigenschappen zijn gevonden, welke doen vermoeden, dat zij aan de dissimilatie der organische stoffen in de natuur een werkzaam aandeel nemen; het onderzoek naar deze eigenschappen is echter slechts verricht met de bedoeling de beschrijving der geïsoleerde stammen vollediger te maken, zoodat van de processen zelve en vooral ook over de snelheid, waarmede zij kunnen verlopen, niets bekend is geworden.

Teneinde van de mogelijkheid eener dissimilatie bij hooge temperatuur iets te weten te komen is het ook noodzakelijk om van een in ruwcultuur verloopend proces uit te gaan en, dit eenmaal gevonden hebbende, te trachten de betreffende bacterie te isoleeren.

Een dergelijk onderzoek is slechts door zeer enkele onderzoekers verricht, zooals uit de volgende paragraaf zal blijken.

§ 5. Onderzoek der dissimilatieprocessen bij hoge temperaturen.

De eerste, welke uitgaande van een in ruwcultuur verlopend thermofiel gistingproces, de bacterie trachtte te isoleeren, was SCHILLINGER. Gesteriliseerde melk werd geënt met grond en bij 66° C. weggezet, na 24 uur was de melk gestold en na twee maal 24 uur begon een tamelijk sterke gasontwikkeling, welke 5 à 6 dagen duurde. De analyse van het gas leverde 56 cc. CO₂ en 45,5 cc. H₂. Hij entte 5 % glucosebouillon en 5 % lactosebouillon met grond. Bij 66° C. trad een krachtige gisting op. Uitzaaïngen op agarplaten leidden tot de isolatie van een viertal soorten, waarvan 3 bij 37° gisting vertoonden en stolling van melk; een enkele stam giste nog sterk bij 45°; bij 66° gebeurde er echter niets meer.

De geïsoleerde bacteriën zijn dus waarschijnlijk niet die van de in ruwcultuur bij hoge temperatuur verlopende gisting. Te meer wordt deze veronderstelling gewettigd, daar gebleken was, dat ook bij 60° de steekculturen in agar steeds achteruit gingen.

SAMES verkreeg in glucosebouillon eveneens bij 66° gisting; hij isoleerde een bacillus, welke bij 37° en bij 57° C. nog goed giste en ook bij deze laatste temperatuur beduidend sneller dan bij de eerste. Zij vormden regelmatige koloniën op agarplaten en vertoonden bij 22° nog goeden groei. Een onderzoek naar de gevormde producten had niet plaats.

SCHARDINGER was de eerste, welke de producten der thermofiele suikergisting nader identificeerde. Hij verkreeg met een facultatief anaerobe bacterie uit 3 % zetmeel en 1 % pepton, oplossing van het zetmeel, terwijl azijnzuur, boterzuur en rechts draaiend melkzuur werd gevormd, over gassen werd niet gesproken, het proces verliep niet vlug, n.l. in drie weken bij 60° C. Een anaerobe stam vertoonde gisting van dextrine,

de gevormde producten waren boterzuur en inactief melkzuur.

PRINGSHEIM verkrijgt in stikstofvrij milieu, geënt met grond bij 61° C. gisting van glucose; overenting gelukt niet, wel treedt opnieuw gisting op na wederom opschenken met nieuwe cultuurvloeistof, nadat de eerste gisting is afgelopen. Bij aanwezigheid van grondextract gelukken de overentingen wel, er is echter nog suiker over na afloop der gisting. Reinculturen werden niet verkregen; in de ruwculturen bleek een stikstofvermeerdering te hebben plaats gehad. Een analyse der gistingsproducten werd niet gedaan.

Hoewel dus de literatuur over thermophile vergisting van koolhydraten kostbare aanwijzingen geeft, is het tot nu toe verrichte werk nog zeer onvolledig; de meeste kennis hieromtrent danken wij aan SCHARDINGER, zoodat op zijne onderzoekingen nog nader zal moeten worden teruggekomen.

Veel meer werk is reeds verricht over de thermophile vergisting van cullulose. Reeds de eerste onderzoekingen van MACFAYDEN en BLAXALL brachten hen op het idee, dat de thermophile bacteriën, welke in zoo groote getale te vinden waren in mesthoopen, hooibergen, e.d. wellicht van belang zouden zijn voor de fermentatie van cellulose. Naderhand is door hen hierover een nader onderzoek gepubliceerd, waarbij zij aantoonde, dat onder anaerobe omstandigheden cellulose met grond geënt, wordt vergist. Zij waren de meening toegedaan, dat het proces veroorzaakt werd door de samenwerking van verscheidene organismen.

Ook KROULIK bestudeerde deze in ruwcultuur zeer goed verloopende vergisting. Hij vond hierin twee groepen van bacteriën, aerobe en anaerobe; de eerste werden op platen rein gecultiveerd, doch vertoonden noch op de plaat noch in vitro eenige aantasting van cellulose; hij noemt dit „Begleitbakterien”

het is echter zeer de vraag of deze iets met het proces uitstaande hebben. De anaerobe vertoonden geen groei op platen, zoodat verdere studie daarvan niet kon worden gemaakt. Als eindproducten der in ruwcultuur verloopende gisting noemt hij azijnzuur en mierenzuur.

PRINGSHEIM analyseert de eindproducten der in ruwcultuur verloopende gisting. De samenstelling van het gas is niet zeer constant, n.l. een hoeveelheid koolzuur, welke varieert van 21,9 tot 47,1 %. De rest van het gas is waterstof. Uit 3 gram cellulose wordt gevonden 0,2125 gram mierenzuur, 1,15 gram azijnzuur en sporen melkzuur.

LANGWELL en LYMM isoleerden op glucoseagarplaten een thermophile bacillus, waarmede zij ook in vitro vergisting van cellulose verkregen. De eindproducten der gisting met deze cultuur waren zeer wisselend, nu eens werd methaan, dan weer waterstof gevonden, ook waren de hoeveelheden van de gevormde organische zuren zooals azijnzuur, boterzuur en melkzuur en van het gevormde koolzuur en aethylalcohol zeer ongelijk. Deze wisselende samenstelling van de uitgegiste cultuur werd beïnvloed door verschillende omstandigheden, doch het wordt uit de medegedeelde gegevens niet duidelijk, welke deze waren.

FRED, PETERSON en VILJOEN maken zeer verdunde gietcultures in diepe celluloseagarlagen en verkrijgen tenslotte een reageerbuis met één enkel oplossingsveld en gasbel, welke zij afkomstig achten van een reine kolonie. Zij enten deze over in een steriele, cellulose bevattende voedingsvloeistof en verkrijgen dan onder anaerobe omstandigheden, gisting. Er wordt gevormd waterstof, koolzuur, azijnzuur, alcohol en sporen boterzuur.

MAD. KHOUVINE weet door uitwasschen van de in de gisting betrokken zijnde papiergezels en toepassing van pasteurisatie ten slotte één enkele bacillus over te houden, welke niet op

platen groeit, hetzij aerob, hetzij anaerob. De bacillus vertoont vanaf 35° tot 51° C. gisting van cellulose, waarbij azijnzuur, boterzuur, alcohol, koolzuur en waterstof wordt gevormd.

In al deze onderzoeken treft ons het zeer onstandvastige van het proces, soms wordt waterstof, soms methaan, een enkele maal veel, een anderen keer slechts sporen van een organisch zuur, bijv. van mierenzuur en van boterzuur, gevonden.

Deze, zoowel als andere redenen, vestigen sterk den indruk, dat het wisselende karakter dezer gistingen, ook wanneer zij van agarculturen waren verkregen, het gevolg is van het niet rein zijn van de op de beschreven wijzen bekomen cellulosegistingen.

In verband met mijne eigen onderzoeken en de groote moeielijkheden, die ik daarbij heb ondervonden, zal het dan ook noodig zijn nog uitvoeriger op deze isolatieproeven terug te komen.

§ 6. Résumé.

Wanneer wij de besproken literatuur over de thermophile bacteriën overzien, dan valt ons het groote aantal der boven 50° C. groeiende micro-organismen op. Tevens bevreemdt ons de mogelijkheid van isolatie dezer talloze soorten uit het meest uiteenlopend materiaal, hoewel in dat milieu zelve de temperatuur zelden of nimmer die van hun optimalen groei bereikt. Gedeeltelijk moet de verklaring voor dit verschijnsel worden gezocht in het feit, dat een groot aantal dezer organismen ook bij lagere temperatuur zich kunnen vermenigvuldigen en dus niet tot de strikt thermophile bacteriën gerekend moeten worden.

Van de laatsten moeten wij aannemen, dat hunne ontwikkeling plaats heeft in speciale kweekplaatsen, waar wel degelijk

een zeer hoge temperatuur voorkomt n.l. in allerlei ophooping van broeiend organisch materiaal, vanwaar de sporen dezer bacteriën, welke, hoewel kieming uitblijft, bij lagere temperatuur in leven blijven, door mechanisch transport verbreid worden.

Vele hiervan zijn, met het doel hunne beschrijving vollediger te maken, onderzocht op een aantal biochemische eigenschappen, waarvan eiwitsplitsing en zetmeelhydrolyse het veelvuldigst bleken voor te komen; gisting van suikers werd daarbij niet gevonden.

Uitgegaan van een in ruwcultuur krachtig verloopende vergisting van koolhydraten, werd slechts door SCHILLINGER, SAMES en SCHARDINGER, teneinde daaruit de betreffende bacterie te isoleeren. Hunne mededeelingen bleven echter onvolledig, terwijl ook redenen aanwezig waren om te betwijfelen of de door hen geïsoleerde soorten de in ruwcultuur verloopende dissimilatie veroorzaakten.

Omtrent de vergisting van cellulose zijn de mededeelingen veel uitvoeriger en vollediger, doch ook hier bestaat gegronde twijfel aan de reinheid der door LANGWELL en LYMN en door FRED, PETERSON en VILJOEN verkregen culturen.

Thermophile methaangistingen uit andere verbindingen dan cellulose, wier bestaan mij door mondelinge mededeeling van Prof. SÖHNGEN bekend waren, worden nergens in de literatuur vermeld.

Zoo ooit dus, dan prikkelt het kennis nemen van het tot op heden in de literatuur medegedeelde, tot eigen onderzoek.

HOOFDSTUK II

THERMOPHIELE METHAANGISTINGEN

§ 1. Inleiding.

Bij het onderzoek over het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder invloed van het organisch leven, was reeds aan SÖHNGEN gebleken, dat ook bij een zeer hoge temperatuur methaan uit vetzure zouten kon ontstaan. Deze kwestie is toen door hem niet verder onderzocht en ook ongepubliceerd gebleven, hoewel in het laboratorium te Wageningen reeds herhaaldelijk een bevestiging dezer waarneming was geconstateerd.

Daar ik mij tot taak stelde meer inzicht te verkrijgen in de biologische dissimilatie van organische stoffen bij hoge temperaturen, lag het voor de hand met een aan deze waarnemingen aansluitend onderzoek te beginnen.

§ 2. De vergisting van Calciumacetaat tot koolzuur en methaan.

EIGEN ONDERZOEK.

a. Ervaringen met de ruwculturen.

Met modder uit de Wageningsche gracht als entmateriaal in een vrij dikke laag op den bodem van een literkolf werd bij 63° C. 10 gram Ca-acetaat te vergisten gegeven; als voedingszouten in 1 Liter water toegevoegd 1 gram ammoniumchloride,

1 gram secundair kaliumphosphaat en 0,5 gram magnesiumsulfaat. Na verloop van een vrij grooten incubatietijd, welke bij een groot aantal op deze wijze uitgevoerde proeven varieerde van 5 tot 14 dagen, wordt gisting waargenomen. De gistingssnelheid neemt nu snel toe en kan reeds den daarop volgenden dag 50 a 60 cc. gas per uur bedragen. Het gas blijkt vrijwel geheel te bestaan uit koolzuur en methaan, het wordt opgevangen boven een verzadigde zoutoplossing en de gistingssnelheden afgelezen.

Dergelijke snelheidsmetingen zijn met een groot aantal gistingen uitgevoerd, de uitkomsten van alle hier te vermelden zou echter te veel plaats innemen en heeft ook geen nut; als voorbeeld geef ik op blz. 25 een tabel, waaruit graphische voorstelling I is afgeleid.

De overige proeven stemden met de resultaten van de daar genoemde waarnemingen overeen; het gelukte echter niet steeds een dergelijke lange aaneengesloten reeks betrouwbare waarnemingen te verkrijgen, omdat de grootste snelheden wel eens gedurende enkele uren van den nacht ontwikkeld werden, waardoor zij aan de aandacht ontsnapten; door echter voor het weder toevoegen van nieuw acetaat het meest geschikte moment uit te kiezen, was het mogelijk dit bezwaar te overwinnen.

Uit de tabel en de graphische voorstelling valt af te leiden, dat de maximale gistingssnelheid, welke als een maat voor het aantal organismen kan worden beschouwd, bij weder toevoegen van Calciumacetaat vóór dat de eerste hoeveelheid geheel is uitgegist, steeds toeneemt, doch wanneer de cultuur wordt afgeschonken en geheel nieuwe cultuurvloeistof wordt toegevoegd, blijkt zij belangrijk te zijn achteruitgegaan.

Waarschijnlijk moeten wij dezen achteruitgang verklaren door de bij het weder opschenken verkregen aeratie van de cultuur; het verschijnsel kan dan ook vergeleken worden bij den langdurigen incubatietijd na de eerste enting met modder.

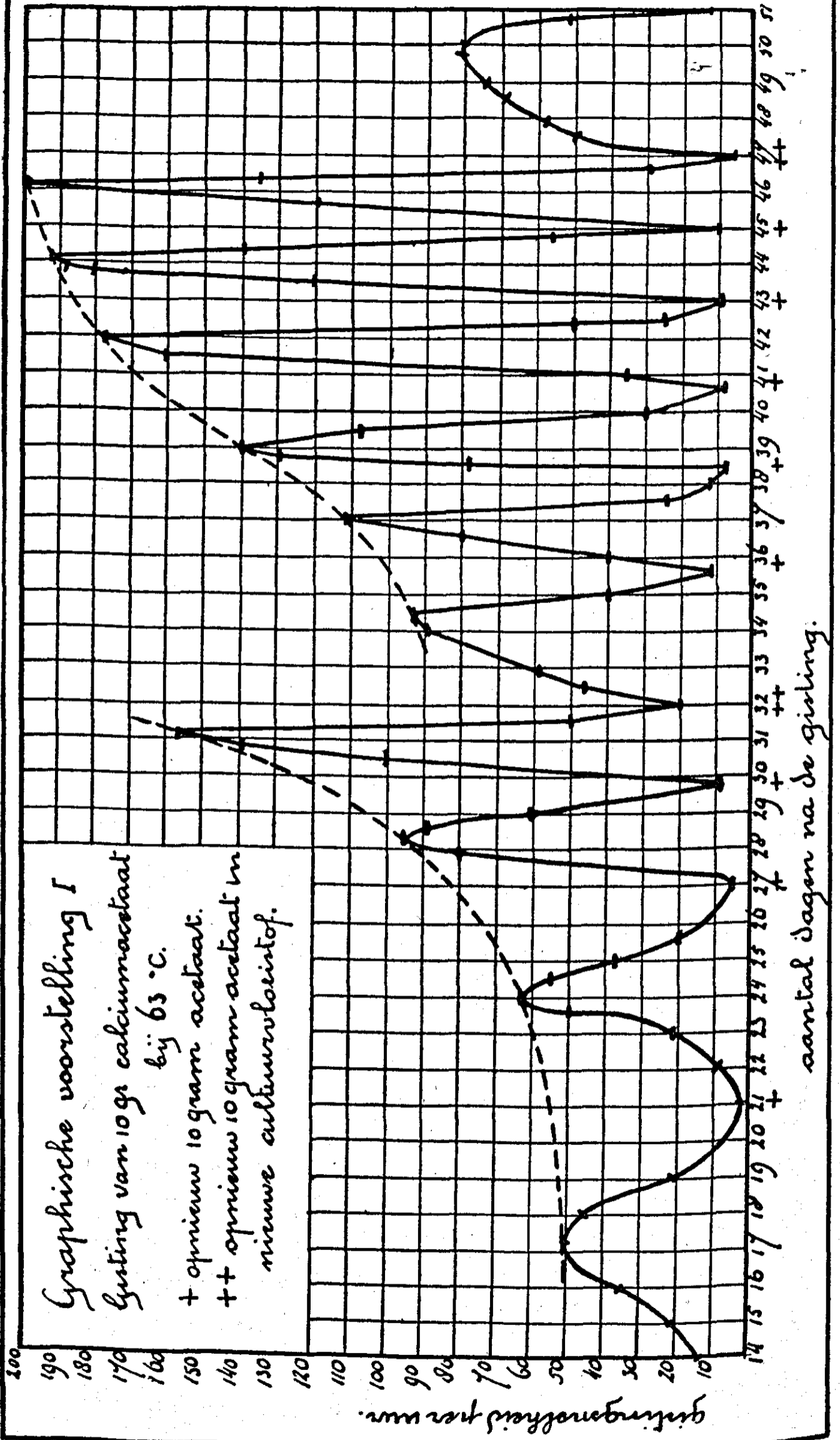
D	T	S	D	T	S
14	12-2	13	38	12-2	12
15	12-2	22	38	5-7	8
16	12-2	36		+	
17	12-2	51	38-39	nacht 10-10	79
18	12-2	46	39	12-2	130
19	12-2	21	39	5-7	141
20	12-2	8	39-40	nacht 10-10	108
21	12-2	3	40	12-2	30
	+		40-41	nacht 10-10	7
22	12-2	8		+	
23	12-2	23	41	12-2	35
23-24	nacht 10-10	50	41	5-7	67
24	12-2	64	41-42	nacht 10-10	160
24-25	nacht 10-10	55	42	12-2	178
25	12-2	38	42	5-7	55
25-26	nacht 10-10	20	42-43	nacht 10-10	25
26	12-2	13	43	12-2	7
27	12-2	5		+	
	+		43-44	nacht 10-10	121
28	12-2	78	44	12-2	180
28	5-7	95	44	2-5	188
28-29	nacht 10-10	88	44	5-7	140
29	12-2	60	44-45	nacht 10-10	56
29-30	nacht 10-10	8	45	12-2	10
	+			+	
30	12-2	24	45-46	nacht 10-10	120
30-31	nacht 10-10	100	46	12-2	180
31	12-2	140	46	2-5	189
31	5-7	157	46	5-7	193
31-32	nacht 10-10	50	46	7-10	135
32	12-2	20	46-47	nacht 10-10	29
	++		47	12-2	6
32-33	nacht 10-10	47		++	
33	12-2	58	47-48	nacht 10-10	50
34	12-2	90	48	12-2	57
34-35	nacht 10-10	92	48-49	nacht 10-10	69
35	12-2	40	49	12-2	74
35-36	nacht 10-10	12	49-45	nacht 10-10	81
	+		50	12-2	80
36	12-2	40	50-51	nacht 10-10	51
36-37	nacht 10-10	81	51	12-2	13
37	12-2	94			
37	5-7	112			
37-38	nacht 10-10	24			

Proef gestaakt
(zie graphische voorstelling I)

- ++ = Nieuwe cultuurvloei stof toegevoegd na afschenken der oude.
+ = opnieuw 10 gram acetaat toegevoegd.
D = aantal dagen na de enting.
T = Tijd, gedurende welke de gemeten gistingsnelheid is ontwikkeld.
S = Snelheid in cc. gas per uur.

Graphische voorstelling I

Gisting van 10gr calciumacetaat
bij 63 °C.
+ opnieuw 10 gram acetaat.
++ opnieuw 10 gram acetaat in
nieuwe cultuurvloistof.



Bij voortzetting der gistingen, door wederom acetaat toe te voegen zonder de vloeistof af te schenken, worden spoedig weer zeer groote snelheden bereikt, tenslotte begint de toename der maximale gistingssnelheden te verminderen; toevoeging van voedingszouten verandert hieraan niets.

Proeven worden nu gedaan, om door overentingen de reincultuur der gisting te verkrijgen. Daar echter al wel gebleken was, dat een bezinksel van fijne structuur op den bodem voor dergelijke methaangistingen onontbeerlijk is, wordt overgeënt met een enkelen droppel in een gesteriliseerde voedingsvloeistof met fijn verdeeld calciumcarbonaat (hetgeen tevens eindproduct der gisting is) op den bodem. Gisting van de overenting wordt niet waargenomen. Deze slaagt slechts, indien met een groote hoeveelheid wordt overgeënt, bijvoorbeeld met 50 cc. van de modder. Wanneer de op die wijze verkregen overenting goed gist, wordt opnieuw met 50 cc. van zijn bezinksel overgeënt in een kolf met dezelfde voedingszouten en Calciumcarbonaat-Laevis op den bodem.

b. De bacteriën, welke deze gisting veroorzaken.

Daar het ondanks de talloze pogingen onmogelijk bleek, in welken voedingsbodem dan ook, de gisting met een zeer kleine hoeveelheid over te enten, noch groei op platen, hetzij aerob, hetzij anaerob, te verkrijgen, moest van het verkrijgen der reincultuur van de betreffende organismen worden afgezien, daar, gezien de teleurstellende resultaten met de bekende methaangistingen bij lagere temperatuur, een verder zoeken in deze richting zeer weinig kansen op succes zou bieden.

Wel was het echter mogelijk iets meer omtrent den waarschijnlijksten veroorzaker van deze buitengewoon snelle methaangisting te weten te komen door gebruik te maken van de mogelijkheid, om de ruwculturen door herhaalde overentingen

met groote hoeveelheden van het bezinksel in nieuwe gistingkolven met calciumacetaat en voorzien van Calciumcarbonaat-Laevis op den bodem, te zuiveren van de oorspronkelijk als entmateriaal gebezigde modder, welke temidden van organische stof, nog andere dan de gewenschte micro-organismen zal herbergen.

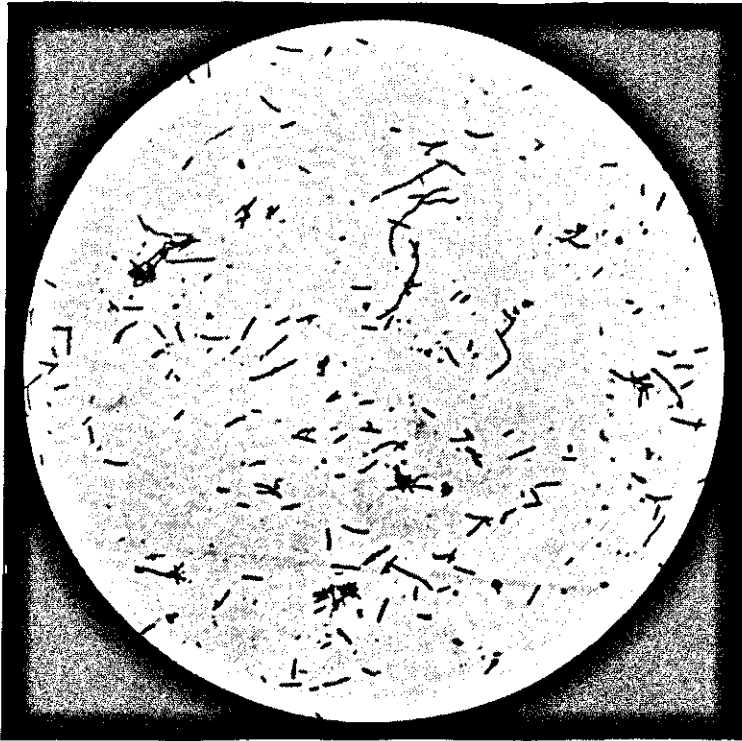
De ophooping van de thermophile acetaatvergistende bacteriën werd dus verkregen door herhaaldelijk het bezinksel van oudere gistingen voor een gedeelte te brengen in literkolven, bestaande uit de volgende voedingsvloeistof:

Water	1000	gr.
K ₂ HPO ₄	1	gr.
NH ₄ CL	1	gr.
MgSO ₄	0,5	gr.
Ca-acetaat	10	gr.
Ca-Carbonaat-Laevis ..	20	gr.

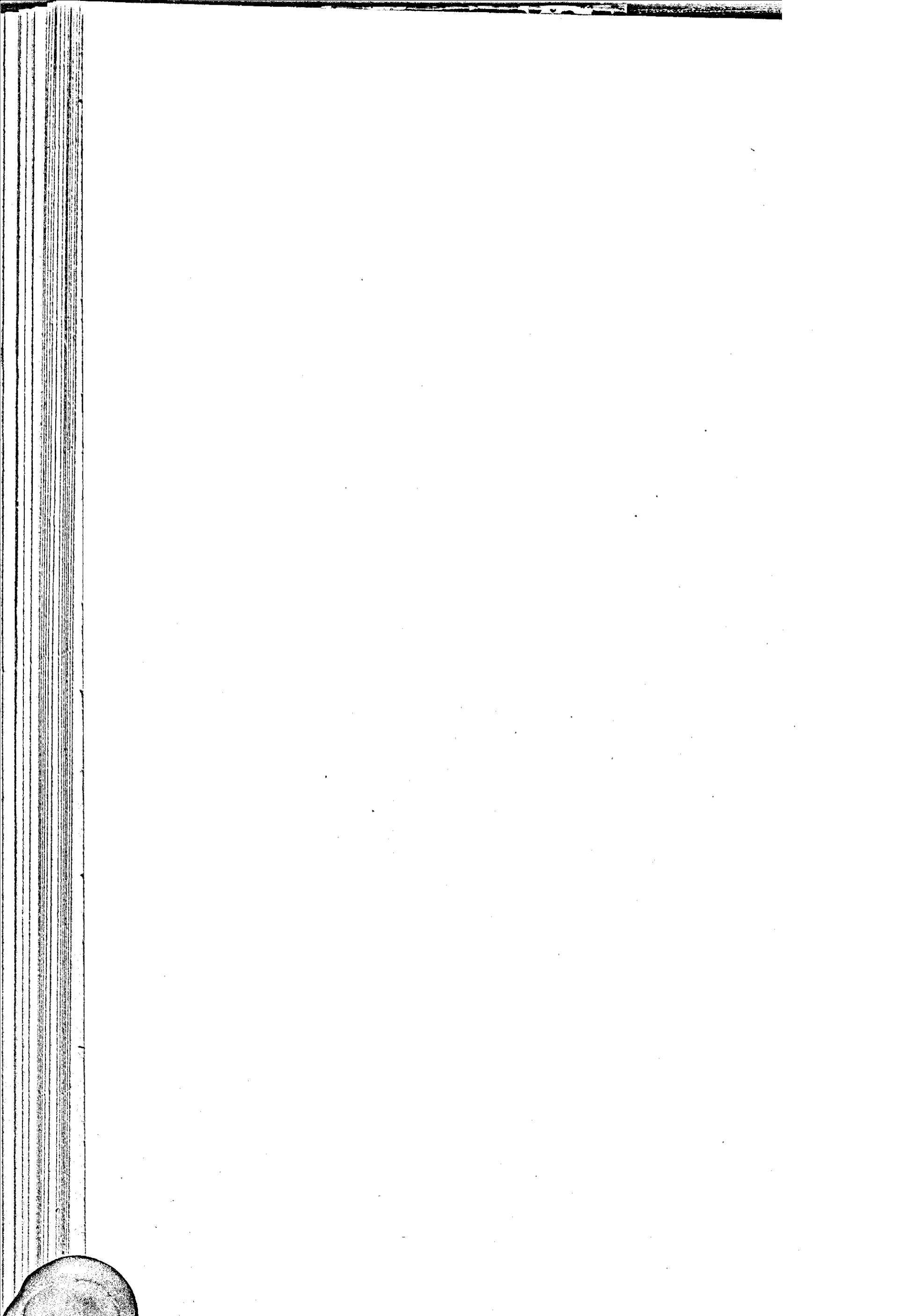
Van een op deze wijze verkregen cultuur, waarvan het bezinksel nagenoeg geheel wit is geworden (eenige maanden verlopen, voordat dit bereikt is), wordt 10 cc. uitgepipetteerd en met een geringe overmaat verdund zoutzuur in een trechtervormig glas geschonken. Nadat het van het carbonaat afkomstig koolzuur is ontweken, blijft een bijna heldere vloeistof over, welke rustig staan blijft. Na eenigen tijd zijn de bacteriën, door middel van het zoutzuur van de krijtdeeltjes ontdaan, bezonken en kunnen worden bekeken en gefotografeerd (zie phot. I).

Het blijkt nu, dat de aldus opgehoopte cultuur bestaat uit dunne lange staafbacteriën, dikwijls tot draadvormige ketens aaneengeregen; de lengte van de staaf varieert van 3 tot 6 μ , sporenvorming wordt hier en daar waargenomen (zie op photo I links onder).

PHOTO I



Thermophile methaan produceerende
bacteriën, gekleurd volgens ZETNOV
vergrooting $\pm 600 \times$



De vraag rijst nu, of we hier met andere bacteriën dan de reeds bekende methaanvormers bij lagere temperatuur te doen hebben. Met absolute zekerheid is deze vraag, zoolang we noch van de thermophile, noch van de mesophile bacteriën rein-culturen bezitten, niet te beantwoorden.

Toch blijven er verscheidene wegen open, om deze kwestie aan een nader onderzoek te onderwerpen. In de eerste plaats het microscopisch onderzoek der op de beschreven wijze gezuiverde culturen.

In de mesophile acetaat- en butyraatgistingen worden gevonden sarcinen- en staafbacteriën. De staafbacteriën der thermophile gistingen verschillen zeer in uiterlijk met die der bij lagere temperatuur verlopende methaangisting; ze zijn langer en dunner en meer tot draden aaneengeregen, terwijl hier ook sporenvorming wordt waargenomen; sarcinen komen in het bezinksel der thermophile gistingen nimmer voor.

Een betere wijze ter vergelijking van de methaangistingen bij hoge en bij lagere temperatuur, ligt echter in de bestudeering der optimum-, minimum-, en maximumtemperaturen.

De optimumtemperatuur der mesophile gistingen ligt ongeveer bij 35° C., zooals door SÖHNGEN is vastgesteld voor de butyraatgisting. Wat de acetaatgisting betreft, werd door mij voor een groot temperatuurgebied de gisting bestudeerd.

Gelijke hoeveelheden cultuurvloeistof met 10 gram Calcium-acetaat als te vergisten stof, werden met evenveel grachtmodder als entmateriaal bij verschillende temperaturen geplaatst, n.l. bij 32, 38, 45, 55, 63 en 69° C.

Bij 32° begon de gisting na 5-, bij 38° na 12-, bij 55° na 13-, bij 63° na 10 dagen. Na drie en een halve week was nog geen gisting waar te nemen bij 45° en bij 69°.

Twee dagen nadat de eerste gasontwikkeling was waargenomen, waren de gistingssnelheden respectievelijk: 12, 8, 0, 32, 48 en 0 cc. per uur.

Uit deze proef blijkt dus, dat er tusschen een snelle methaangisting bij 32° C. en een nog krachtiger bij 63° C. een gebied ligt, waarbij in het geheel geen gisting optreedt.

Met een op de beschreven wijze gezuiverde thermophile acetaatgisting werd nu ook getracht deze bij lage temperatuur te doen gisten, terwijl omgekeerd met een gedurende jaren aangekweekte mesophile acetaatgisting een proef gedaan werd bij hoge temperatuur. Beide proeven leidden tot een negatief resultaat. De thermophile bij 25° C. overgebracht, staakt de gisting; ook na verscheidene maanden wordt geen gasontwikkeling waargenomen. De mesophile naar 63° C. overgebracht, vertoont evenmin gasontwikkeling, ook niet meer na terugplaatsing bij 32°, zoodat we moeten aannemen, dat een temperatuur van 63° C. reeds doodelijk voor deze organismen is geweest.

Al beschikken we dus helaas niet over een reincultuur, genoemde proeven maken het wel zeer waarschijnlijk, dat de thermophile acetaatgisting door andere dan de mesophile, tot dusver niet bekende staafbacteriën wordt veroorzaakt.

c. Kwalitatieve analyses der bij de gisting gevormde gassen.

Van een eerste overenting eener Calciumacetaatgisting met grachtmodder als entmateriaal op den bodem werd het gas buiten den thermostat geleid en opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing. Gedurende het verloop van het proces werden verscheidene monsters van het gas op de volgende wijze op hunne samenstelling onderzocht.

Een bekende hoeveelheid van het opgevangen gas werd in een kwikburet gezogen en door omhoog brengen van een communiseerende kwikburet het gas geperst in een kaliloogpipet; nadat het gas opnieuw in de verdeelde kwikburet is gezogen, wordt de volumevermindering afgelezen en deze, nadat de afwezigheid van zwavelwaterstof door het niet ontkleuren

van een verdunde kopersulfaatoplossing aangetoond was, als de aanwezige hoeveelheid koolzuur in rekening gebracht.

Aan de rest van het gas wordt een overmaat zuurstof toegevoerd en vervolgens het mengsel geperst in een explosiepipet. De volumevermindering na de explosies wordt afgelezen en daarna het gas opnieuw in de kaliloogpipet geperst. De hoeveelheid methaan wordt nu gevonden, door de optredende volumevermindering, veroorzaakt door de oplossing van het bij de verbranding ontstaan koolzuur, als een gelijke hoeveelheid oorspronkelijk aanwezig methaangas in rekening te brengen. Een controle op dit getal levert de reeds eerder waargenomen volumevermindering na de verbranding. Is een enkele maal ook waterstof aanwezig, dan worden de afzonderlijke hoeveelheden methaan en waterstof gevonden, door de hoeveelheid na de verbranding ontstaan koolzuur als evenveel methaan te rekenen en tweemaal dit bedrag van de na de explosies opgetreden volumevermindering af te trekken, terwijl, indien hierna nog een rest overschiet, twee derde daarvan als de oorspronkelijke hoeveelheid waterstof in rekening kan worden gebracht.

Op deze wijze worden van de aldus opgevangen hoeveelheden gas een groot aantal analyses gedaan; de hoeveelheid methaan bedraagt daarbij steeds ongeveer 66 %, terwijl het bedrag aan koolzuur schommelt rondom 34 %, een enkele maal worden sporen waterstof gevonden.

Voor een meer nauwkeurige analyse wordt een tweede overenting gemaakt, waarmede reeds een vrij groote zuivering verkregen wordt, zoodat het bezinksel nog slechts licht grijs van kleur is. De gisting heeft plaats in literkolven met geslepen afsluiting, waaraan een glasbuis is verbonden, die buiten de thermostaat uitsteekt; hieraan wordt door middel van lak een nieuwe glasbuis bevestigd, welke het gas leidt in een met kwik gevulde buret. Eenige der talrijke analyses zijn in onderstaande tabel vereenigd.

Tweede overentingen (hoeveelheden in CC.).

CULTUUR I	CULTUUR II	CULTUUR III
1e gisting van 10 gr.	1e gisting van 10 gr.	1e gisting van 10 gr.
vol. van het gas 26,4 koolzuur 8,7 methaan 17,6	vol. van het gas 30,4 koolzuur 10,2 methaan 20,1	vol. van het gas 26,7 koolzuur 8,6 methaan 18,0
2e gisting van 10 gr.	2e gisting van 10 gr.	2e gisting van 10 gr.
vol. van het gas 72,1 koolzuur 24,2 methaan 47,7	vol. van het gas 67,8 koolzuur 22,6 methaan 44,8	vol. van het gas 58,5 koolzuur 19,5 methaan 38,7

Van cultuur I waren dus bij de twee op elkaar volgende gistingen van 10 gram Calciumacetaat de percentages koolzuur respectievelijk 32,6 en 32,4 %, van cultuur II 33,2 en 33,3 %, van cultuur III 32,2 en 33,3 %, terwijl de overeenkomstige cijfers voor methaan bedroegen 66,6 en 66,1, 66,1 en 66,1, 67,4 en 66,2 %. De gemiddelde getallen dezer analyses bedragen voor koolzuur 32,8 % en voor methaan 66,4 %, er is dus een totale fout in de gemiddelde uitkomsten van 0,8 %, welke een gevolg is van kleine verliezen aan gas in de gasanalyseapparaten. Dit verlies komt in hoofdzaak op rekening van het aanwezige koolzuur, doordat in bij vorige verbrandingen ontstaan water, dat de apparaten steeds weer vochtig maakt, eenig koolzuur wordt opgelost, welke oplossing niet door de aflezingen wordt gevonden.

Uit deze analyses mag men dan ook besluiten, dat de hoeveel-

heid methaan zich verhoudt tot het vrijgemaakte koolzuur als 2 : 1.

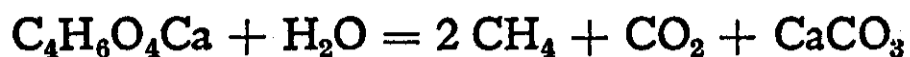
d. Kwantitatieve analyses.

Bovenstaande gasanalyses hebben dus bewezen, dat een vaste verhouding bestaat tusschen de hoeveelheden geproduceerd methaan en koolzuur.

Voor een kwantitatieve analyse is dus slechts noodig één dezer gassen totaal op te vangen en de hoeveelheid vast te stellen. Met dit doel werden de twee culturen I en II van nieuwe cultuurvloestof met respectievelijk 10 en 20 gram Calciumacetaat, voorzien. De gistingsgassen werden nu tot de laatste gasbel opgevangen boven een sterke kaliloogoplossing, zoodat dus het koolzuur geheel oploste en slechts methaan in de opvangbureten aanwezig was, hetgeen door enkele gasanalyses gecontroleerd werd. Cultuur III werd voor deze proef niet gebruikt, omdat bij totale uitgisting een groote afsterving plaats heeft en het noodig was één der drie culturen in leven te houden voor latere proeven.

Op deze wijze werd uit cultuur I opgevangen 2965 cc. en uit cultuur II 6002 cc. gas, waarvan we nagegaan hadden, dat het slechts uit methaan bestond. Met den druk van het gas bij aflezing der bureten was rekening gehouden en steeds gecorrigeerd tot op een druk van 76 cc. kwik. De temperatuur in het vertrek, waar het gas werd opgevangen is echter zeer hoog, n.l. 25° C. omdat voor de plaatsing der thermostaten van 60° C. en hooger steeds één der vertrekjes op constante temperatuur was gekozen. Berekend op 0° C. worden dus de bedragen der opgevangen hoeveelheden methaan bij 76 cc. druk 2723 cc. uit cultuur I en 5498 cc. uit cultuur II.

De maximale hoeveelheid methaan, welke theoretisch valt te berekenen uit eene totale vergisting van het acetaatmolecuul tot koolzuur en methaan volgens de formule:



bedraagt voor 10 gram Ca-acetaat bij 0° C. en 76 cc. druk 2830 cc. en dus voor 20 gram 5660 cc.

Behalve dus, dat de verhouding van de ontstane hoeveelheden koolzuur en methaan overeenkomt met de theoretische verhouding, zooals ze door deze formule verlangd wordt, ook het totale kwantum vrijgemaakt methaangas ligt zeer dicht bij de theoretische hoeveelheid; uit cultuur I werd n.l. opgevangen 96,2 % en uit cultuur II 97,1 % van dit bedrag.

Uit de besproken gasanalyses, welke een constante verhouding van koolzuur tot methaan opleverden van 1 : 2 en uit de totale hoeveelheid opgevangen methaangas concludeeren we dus, dat het Ca-acetaatmolecuul, evenals bij lagere temperatuur, *kwantitatief vergist wordt tot koolzuur en methaan volgens de reeds aangegeven formule.*

§ 3. De vergisting van enkele andere zouten tot koolzuur en methaan.

Een klein aantal oriënteerende proeven werden nog gedaan over de vergisting van een zevental calciumzouten.

Van een tweede overenting eener Ca-acetaatgisting (cultuur III) werd ongeveer 50 cc. van het bezinksel gebracht in literkolven met dezelfde voedingsoplossing en als te vergisten stoffen respectievelijk 10 gram Ca-formiaat, butyraat, isobutyraat, propionaat, oxalaat, lactaat en gluconaat toegevoegd, terwijl wederom de bodem der kolven bedekt was met een laag van 20 gram Ca-carbonaat-Laevis.

Na twee dagen was reeds gisting waar te nemen van het Ca-lactaat en van het gluconaat, na weer twee dagen ook van het formiaat, het oxalaat en het isobutyraat. Gasanalyses toonden aan, dat uit alle gistingen het gas bestond uit koolzuur en methaan in verschillende verhoudingen, terwijl uit de

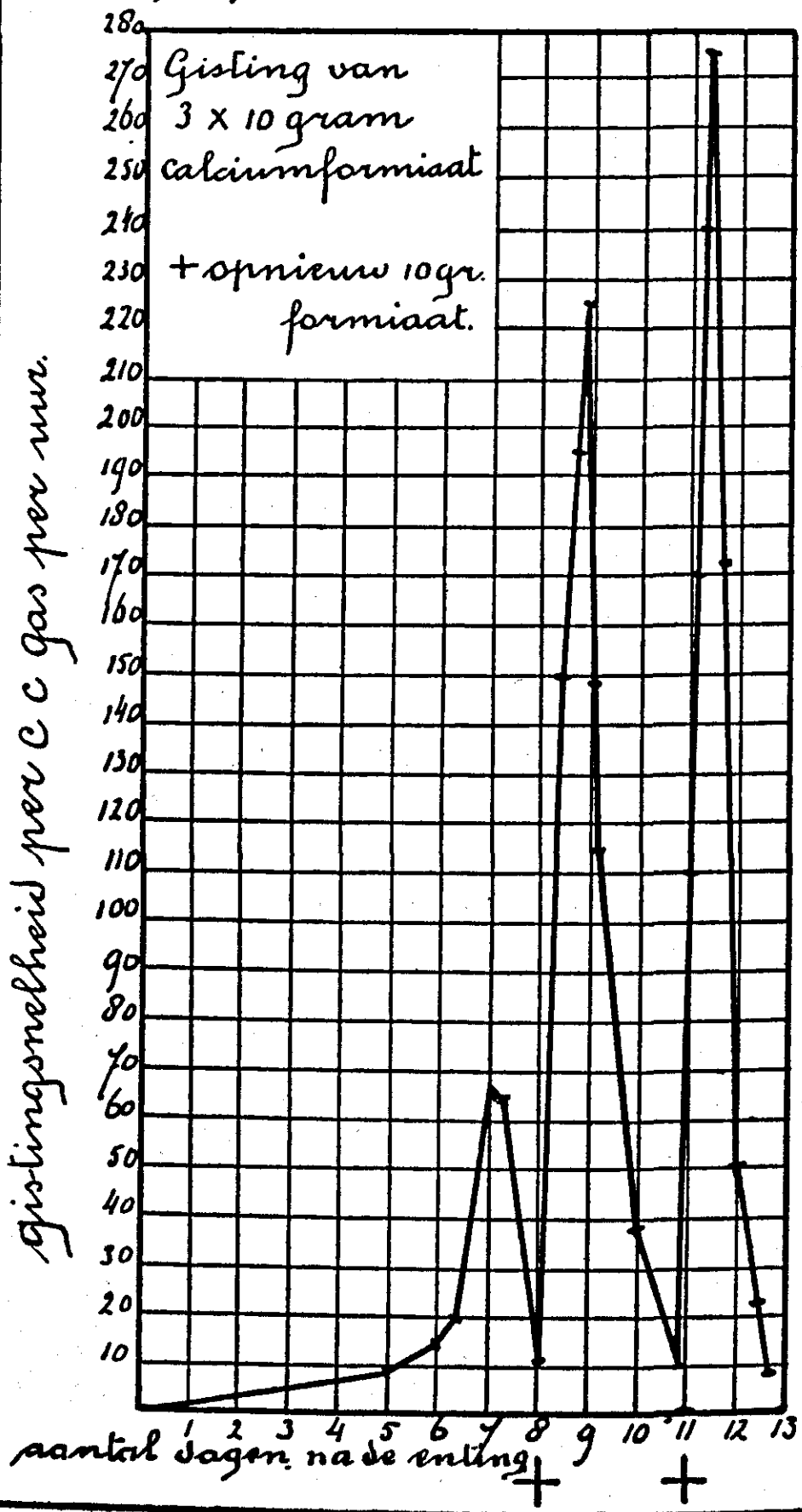
formiaatgisting dikwijls ook een geringe hoeveelheid waterstof werd opgevangen.

Na verscheidenē weken wordt ook een zeer langzame gisting van het Calciumpropionaat waargenomen, nog later vertoont ook het butyraat een langzame gasontwikkeling; gasanalyses toonen aan, dat ook uit deze beide zouten koolzuur en methaan worden ontwikkeld.

Daar de overenting uit de acetaatgisting in de eerst genoemde kolven evengoed slaagt als een zelfde overenting in een kolf met evenveel acetaat en ook het uiterlijk der bacteriën uit deze gistingen geheel overeenstemt met die der acetaatgisting, mogen we aannemen, dat de thermophile acetaatvergistende bacteriën eveneens in staat zijn de zouten van mierenzuur, oxaalzuur, isoboterzuur, melkzuur en gluconzuur tot koolzuur en methaan te vergisten. Ca-propionaat en butyraat schijnen niet of zeer slecht door deze bacteriën vergist te worden. Teneinde te zien of wellicht andere thermophile bacteriën in staat waren deze zouten te vergisten, werd nog herhaaldelijk getracht met modder als entmateriaal gisting te verkrijgen. De resultaten waren steeds dezelfde, n.l. dat na een incubatietijd van 6 tot 8 weken een zeer langzame vergisting van het propionaat werd waargenomen, van het butyraat duurde de incubatietijd meer dan twee maanden, terwijl in een tweede kolf in het geheel geen gisting werd waargenomen. Hier zien we dus een merkwaardig verschil met de methaangistingen bij lage temperatuur, waar de butyraatgisting zeer goed verloopt en het propionaat geheel niet wordt vergist.

De vergisting van Ca-formiaat, welke één van de allersnelste methaangistingen bleek te zijn, werd nu nader bestudeerd. Op de zelfde wijze uitgevoerd als de acetaatgisting kan een zeer snelle gisting van Ca-formiaat worden verkregen met modder als entmateriaal, zooals blijkt uit onderstaande cijfers, waaruit graphische voorstelling II is verkregen.

Graphische voorstelling II



D	T	S	D	T	S
5	12-2	9	10	12-2	39
6	12-2	15	10-11	nacht 10-10	11
6	7-10	20		+	
7	12-2	66	11	12-2	110
7	2-4	64	11	2-5	170
8	12-2	12	11	5-7	240
	+		11	7-10	275
8	7-9	150	11-12	nacht 10-10	172
8-9	nacht 9-9,5	195	12	12-2	50
9	10-12	225	12	5-7	28
9	12-2	148	12-13	10-10	8
9	5-7	120			

+ = opnieuw 10 gram Ca-formiaat toegevoegd.

D = aantal dagen na de enting.

T = Tijd, waarin de afgelezen hoeveelheid gas is ontwikkeld.

S = Snelheid in cc. gas per uur.

De gassen dezer formiaatgisting worden opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing en geanalyseerd; de resultaten van twee dezer analyses waren:

Cultuur	Volume van het gas	koolzuur	methaan	waterstof
No. I	42,7	19,8	20,3	2,5
No. II	51,6	23,8	24,5	3,1

Voor een meer nauwkeurige analyse werden gezuiverde culturen gebruikt, welke verkregen waren door op de beschreven wijze over te enten uit cultuur III der acetaatgistingen in cultuurvloestof van de volgende samenstelling:

water	1000	cc.
Ca-formiaat	10	gr.
Calcarb.-Laev.	20	gr.
NH ₄ Cl	1	gr.
K ₂ HPO ₄	1	gr.
MgSO ₄	0,5	gr.

Na 8 dagen wordt gisting waargenomen, welke zeer snel in kracht toeneemt, na uitgisting wordt opnieuw 10 gram formiaat toegevoegd; de gassen worden op de zelfde wijze, zooals dat bij de acetaatgisting is beschreven buiten den thermostaat van 60° C. geleid en opgevangen boven kwik. Het resultaat der gasanalyses was:

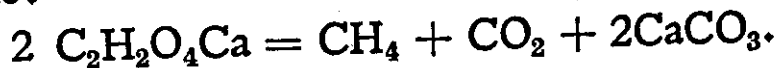
Volume van het gas	koolzuur	methaan	waterstof	cultuur No.
66,4	33,0	32,3	0,8	F I
66,3	33,3	32,0	0,9	F II
70,9	35,8	34,0	1,0	F III

Behalve een geringe waterstofontwikkeling, welke bij de gezuiverde culturen echter veel geringer is, dan bij de eerste gisting boven grachtmodder, wordt een constante verhouding van koolzuur tot methaan gevonden van 1 : 1. De hoeveelheid waterstof werd hier bepaald door de gassen te leiden over zacht verwarmd paladium en daarna de volumevermindering af te lezen. Deze methode werd gekozen, omdat bij aanwezigheid van een groote meerderheid methaan de reeds beschreven methode geen nauwkeurige resultaten opleverde.

Voor de kwantitatieve bepaling van de hoeveelheid methaan werd het gas van cultuur II, nadat geheel nieuwe voedingsvloeistof was opgeschonken, opgevangen boven een sterke kaliloog. De totale hoeveelheid gas bedroeg, berekend op een druk

van 76 cc. kwik; 1775 cc. De temperatuur der opvangbureten is weer 25° C., zoodat dus voor 0° C. en 76 cc. druk de hoeveelheid methaan uit 10 gram Ca-formiaat bedraagt 1623 cc. Het theoretische getal voor eene kwantitatieve splitsing van het formiaatmolecuul bedraagt bij 0° C. en 76 cc. druk 1720 cc., zoodat dus 94,4 % van de grootst mogelijke hoeveelheid is opgevangen.

Uit deze waarneming en de constante verhouding der vrijgemaakte gassen, welke zeer weinig afwijkt van de theoretische, besluiten we, dat de thermophile vergisting van Ca-formiaat, evenals dat het geval is bij lagere temperatuur, verloopt volgens de formule:



Uit de gasanalyses zien we, dat steeds een zeer geringe hoeveelheid waterstof wordt gevormd, waardoor dan ook het totaalcijfer voor het methaan iets wordt gedrukt. Deze analyses wettigen het vermoeden, dat er behalve de methaangisting uit formiaat ook nog een ander proces bestaat, dat echter onder deze omstandigheden zeer weinig op den voorgrond treedt en waarbij naast andere producten waterstof ontwikkeld wordt.

Een enkele maal werd deze gisting werkelijk waargenomen; zij verliep bij een nog veel hogere temperatuur; n.l. bij 68° C. Naast koolzuur werd een enorme hoeveelheid waterstof ontwikkeld, terwijl methaan geheel in het gasmengsel ontbrak. Het bezinksel der gisting vertoonde een geheel afwijkend beeld met dat der methaangisting; de modder, welke ook hier als entmateriaal was gebezigd vertoonde een groote hoeveelheid zeer kleine bacteriën, terwijl tevens een onopgeloste stof, bestaande uit naaldvormige kristallen, was gevormd.

De gisting liet zich bij de eerste pogingen niet overenten en ging helaas door een ongeluk verloren, zoodat een nadere studie er niet van kon worden gemaakt. Latere pogingen om deze waterstofgisting weer te krijgen, faalden.

§ 4. De vergisting van pepton en van rietsuiker tot koolzuur en methaan.

a. Pepton.

Met grachtmodder als entmateriaal wordt ook bij 60° C. een vergisting gevonden van pepton. De gassen, opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing, bestaan voor het grootste gedeelte uit koolzuur en methaan in een verhouding van ongeveer 2 : 1.

Bij de vergisting van 40 gram pepton is gevormd 5400 cc. gas bij 25° C. opgevangen, waarvan dus ongeveer 1800 cc. methaan. Van de 6,4 gram aanwezige stikstof wordt na vergisting teruggevonden 10,3 % als vrije ammoniakstikstof, 73,5 % als gebonden ammoniakstikstof, terwijl de rest in de alkalisch geworden vloeistof is uitgevlokt en onvergist is gebleven.

De gisting is met een kleine hoeveelheid evenmin over te enten, uitzaaiingen op peptonagarplaten leveren talloze koloniën, welke echter nimmer gisting vertoonen, ook anaerobe uitzaaiingen leiden niet tot het gewenschte resultaat, n.l. de reincultuur der thermophile methaanvergistende bacteriën. Microscopisch vertoont de bezonken laag der culturen een ander beeld dan dat der gistingen van de Calciumzouten; de bacteriën zijn dikker, korter, minder tot draadvormige kettingen aaneengeregen en vertoonen veelvuldig eindstandige sporen.

De geringe kans om tot de reincultuur te geraken, zooals bij alle bekende methaangistingen en ook de onaangename geur van de ruwculturen van dergelijke eiwitgistingen, deden mij besluiten het onderzoek hieromtrent niet verder voort te zetten.

b. Methaangisting van saccharose.

Wanneer op de beschreven wijze boven grachtmodder als entmateriaal in anorganische voedingsoplossing suikers, bijvoorbeeld saccharose, ter vergisting gegeven worden, dan is

het resultaat verrassend. Reeds na enkele uren treedt een stormachtige gisting op; het gasmengsel bestaat echter niet uit koolzuur en methaan, doch uit koolzuur en *waterstof*; de gisting is zeer gemakkelijk over te enten en het is duidelijk, dat zij met de beschreven methaangistingen niets heeft uit te staan.

Toch doet zich de vraag voor: Zijn de boven beschreven bacteriën, welke in staat bleken zoovele verschillende zouten tot koolzuur en methaan te vergisten niet eveneens in staat suikers kwantitatief tot deze beide gasvormige componenten af te breken?

Teneinde deze vraag te beantwoorden, wordt na uitgisting van een gezuiverde acetaatgisting deze opnieuw opgeschonken met een nieuwe cultuurvloestof, waaraan echter in plaats van wederom 10 gram Ca-acetaat nu 10 gram saccharose is toegevoegd.

Het gas, dat boven een verzadigde keukenzoutoplossing werd gevangen bleek te bestaan uit:

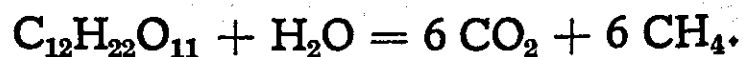
Volume van het gas	koolzuur	methaan	waterstof	cultuur No.
47,5	23,0	23,6	0,8	I
37,0	17,5	18,5	0,7	II

Cultuur I bleek na twee maal 10 gram suiker vergist te hebben plotseling te zijn overgegaan in de reeds eerder gevonden waterstofgisting zooals bleek uit de gasanalyse, welke hieronder volgt.

Volume van het gas	koolzuur	methaan	waterstof	cultuur No.
32,1	16,3	0,0	15,6	I

Van cultuur II werden nu de gassen opgevangen boven een sterke kaliloog, het opgevangen gas bleek voor 98 % uit methaan te bestaan, zooals uit een aantal analyses bleek; slechts op het einde der gisting was de hoeveelheid waterstof toegenomen en bedroeg het percentage methaan 85 %. De totale hoeveelheid van het op deze wijze opgevangen gas uit 10 gram saccharose bedroeg 3996 cc. bij een temperatuur van 25° C.; dit wordt dus bij 76 cc. druk en 0° C. 3655 cc. Theoretisch kan de grootste hoeveelheid methaan bij 76 cc. druk en 0° C. bedragen 3923 cc., zoodat dus 93,3 % daarvan is opgevangen.

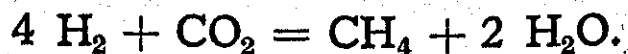
Hoewel dus steeds kleine hoeveelheden waterstof aanwezig waren, komt bij benadering de vergisting van saccharose, mits de oplossing wordt opgeschonken op een gedurende langen tijd opgehoopte cultuur der methaangisting van vetzure zouten, overeen met een kwantitatieve splitsing van het suikermolecuul tot koolzuur en methaan volgens de formule:



zooals volgt uit de verhouding der beide gassen en uit de totale hoeveelheid gevonden methaan.

Het blijkt echter niet mogelijk de methaangisting uit suikers langen tijd te behouden; alle culturen zijn tenslotte overgegaan in de waterstofgisting, welke in hoofdstuk IV zal worden besproken.

Het viel op, dat deze overgang bijna steeds zeer plotseling plaats had, terwijl hieraan dikwijls een achteruitgang van de hoeveelheid koolzuur voorafging, hetgeen doet vermoeden, dat ook hier, zooals dit bij lagere temperatuur gevonden is door SÖHNGEN, vergisting plaats kan hebben van koolzuur en waterstof tot methaan volgens de formule:



§ 5. De vergisting van cellulose tot koolzuur en methaan.

In tegenstelling met de besproken methaangistingen, vinden we omtrent eene thermophile vergisting van cellulose in de literatuur verscheidene mededeelingen, zooals reeds in Hoofdstuk I werd aangegeven. Merkwaardig is, dat bij de thermophile vergisting van cellulose door de verschillende onderzoekers slechts zelden methaan onder de gasvormige afbraakproducten wordt aangetroffen, terwijl bij mijne proeven uit cellulose zoowel een waterstof- als een methaangisting wordt verkregen.

Door PRINGSHEIM wordt uit een papiergisting waterstof en koolzuur opgevangen uit de gisting eener „Sulfitablauge” vindt hij 57 % koolzuur en 43,5 % brandbaar gas, waarvan slechts 3 % methaan. KROULIK deelt uitdrukkelijk mede, dat door hem nimmer methaan was gevonden. Ook de culturen van Madame KHOUVINE en van FRED, PETERSON en VILJOEN produceeren geen methaan. LANGWELL en LIMN zijn de eenigen, die onder de producten hunner cellulosegisting methaan noemen, doch slechts in enkele gevallen.

Door mij werd een krachtige vergisting van cellulose verkregen door een kolf met een cultuurvloeistof bevattend 0,1 % NH_4Cl of 0,1 % asparagine en 0,1 % K_2HPO_4 en 0,05 % MgSO_4 tot den hals toe te vullen, fijn gesnipperd filtreerpapier, dat van te voren tot een papje was gekookt, met Ca-carbonaat toe te voegen en te enten met grond, grachtmodder of stalmest. In parallelculturen werd in plaats van ammoniumchloride evenveel asparagine gebruikt, hetgeen spoediger een goede gisting ten gevolge had.

De gistingen waren met een stukje geel geworden en in afbraak verkeerend papier gemakkelijk over te enten; de overentingen werden voor de helft niet- en voor de andere helft wel gepasteuriseerd, (10' op $78^\circ\text{—}80^\circ\text{C.}$), teneinde na te gaan

of op deze wijze ook een scheiding kon worden verkregen tusschen de waterstof- en de methaangisting, zooals dit door OMMELIANSKY met succes was gedaan bij de mesophile cellulosegistingen.

Hieronder volgen eenige der talrijke gasanalyses; de gassen waren opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing.

2e ongepasteuriseerde overenting					2e gepasteuriseerde overenting			
	vol. v. h. gas	kool- zuur	methaan	waterst.	vol v. h. gas	kool- zuur	methaan	waterst.
I	26,8	7,8	17,9	0,2	23,0	11,3	10,8	0,0
II	35,1	11,0	23,6	0,3	37,8	15,0	21,9	0,4
III	28,5	20,0	0,0	8,2	60,1	48,9	0,0	10,8

Daarna zijn nog talloze overentingen gedaan, steeds weer werden zoowel methaan- als waterstofgistingen aangetroffen, ook gebeurde het meermalen, dat eenzelfde cultuur van de eene in de andere overging, pasteuriseeren of niet pasteuriseeren veranderde aan deze verschijnselen niets.

De verhouding der gassen is zeer wisselend, wat den indruk vestigt, dat in deze culturen geen ophooping plaats had van een enkele bacteriesoort, hetgeen ongetwijfeld in de besproken methaangistingen der vetzure zouten wel het geval is.

Zonder dat echter waterstof in eenige beduidende hoeveelheid gevonden wordt, is het echter zeer goed mogelijk dat de betreffende bacteriën een belangrijk gedeelte van de cellulose tot waterstof en organische zuren vergisten, terwijl dan de daarbij vrijgemaakte waterstof door andere tot methaan wordt vergist, volgens de op blz. 30 gegeven formule. Dit zou de sterk wisselende samenstelling der gassen uit de methaangisting kunnen verklaren, waarbij dikwijls in enkele gevallen veel minder koolzuur wordt gevonden dan in andere, hetgeen in overeenstemming is met deze veronderstelling.

Het verdient echter aanbeveling deze methaangistingen te bespreken in verband met het geheele vraagstuk der thermophile dissimilatie van cellulose, welke zoowel aeren als anaeroob kan verlopen en waarop in hoofdstuk V uitvoerig zal worden teruggekomen.

HOOFDSTUK III

DE DISSIMILATIE VAN ZETMEEL DOOR THERMOPHIELE BACTERIËN

§ 1. Inleiding.

De mededeelingen in de literatuur omtrent zetmeelhydrolyse door thermophile bacteriën zijn zeer talrijk. Zooals in Hoofdstuk I is uiteengezet, is het onderzoek naar het voorkomen van diastase, tesamen met vele andere bepalingen, zooals gelatinevervloeiing, nitraatreductie, indolvorming, e.a. verricht, ten einde de beschrijving der geïsoleerde bacteriën vollediger te maken; echter missen we omtrent de snelheid en den aard van het proces bij deze onderzoekingen alle gegevens.

De goed beschreven thermophile diastasebevattende bacteriesoorten zijn opgenomen in BERGEY's manual of determinative bacteriology, het zijn:

Bac. thermodiastaticus BERGEY.

Bac. thermotranslucens BERGEY.

Bac. lobatus BERGEY.

Bac. thermononliquefaciens BERGEY.

Bac. thermoindifferens WEINZIRL.

Bac. aerothermophilus WEINZIRL.

Bac. cylindricus BLAU.

Bac. tostus BLAU.

Het zijn alle aerobe of facultatief anaerobe bacteriën, welke op zetmeel-agarplaten oplossing te zien geven; hunne verschil-

len liggen in morphologische of in andere physiologische eigenschappen. Vergisting van zetmeel wordt door geen dezer bacteriën veroorzaakt.

Teneinde de meest krachtige zetmeelsplitsende thermophile bacteriën te isoleren, heb ik, door toepassing der ophoopingmethode van BEYERINCK en dus door uit te gaan van een in ruwcultuur verlopende zetmeeldissimilatie en deze in een zelfde gesteriliseerde voedingsoplossing over te enten, getracht door uitzaaiing op zetmeelagarplaten de reinculturen te verkrijgen. Met deze worden proeven gedaan, omtrent de snelheid en den aard der omzetting, zoodat dus kan worden vastgesteld of deze werkelijk overeenkomt met de in ruwcultuur waargenomen verschijnselen.

§ 2. Aerobe aantasting en vergisting van zetmeel in de ruwculturen.

In den thermostaat van 60° C. werd de dissimilatie van zetmeel nagegaan door kolfjes tot den hals te vullen met water, voorzien van 2 % onoplosbaar zetmeel (verstijfseld aardappelmeel), 0,1 % K_2HPO_4 , 0,1 % NH_4Cl , 0,05 % $MgSO_4$ en te enten met grond, modder of stalmest. Daarnaast werd in een dunne laag op den bodem van eenige erlemeyers dezelfde cultuurvloeistof geschonken, met dezelfde materialen geënt en eveneens in den thermostaat van 60° geplaatst.

Reeds na één nacht was bij deze temperatuur in alle kolven en ook in de erlemeyers, oplossing van het zetmeel waar te nemen en trad ook vergisting op; na tweemaal 24 uur eindigde deze gisting, waarschijnlijk door de schadelijke werking der gevormde zuren.

De proef werd daarom nu herhaald met dit verschil, dat aan alle ophoopingculturen calciumcarbonaat werd toegevoegd met het doel de gevormde zuren te binden. De oplossing van

het zetmeel gaat nu zoowel in de anaeroob (de tot in den hals gevulde kolven) als in de aeroob (de erlemeyers) ingezette ruw-culturen door, tot geen blauwkleuring met jodium meer in de vloeistof wordt waargenomen en daarnaast treedt overal een zeer krachtige gisting op.

Alle culturen worden nu met een enkelen droppel in gesteriliseerde cultuurvloeistoffen, welke wederom dezelfde zouten, 2 % zetmeel en een weinig calciumcarbonaat bevatten, overgeent. De overentingen, ook de vele malen herhaalde, slagen alle zeer goed; de verschijnselen in de anaerobe en in de aerobe ophoopingsculturen zijn echter dezelfde; ook in de laatste wordt steeds gisting waargenomen. Het is mij dan ook gebleken, dat de langs deze beide wegen opgehoopte organismen dezelfde zijn, de nu volgende overentingen worden daarom gedaan in vrij hooge vloeistoflagen in kolven van 300 cc.

Van herhaaldelijk overgeënte zetmeelgistingen wordt het gas opgevangen en geanalyseerd; de analyses leverden onderstaande cijfers:

Gas opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing		Gas opgevangen boven een sterke kaliloog	
<i>Cultuur I.</i>		<i>Cultuur II.</i>	
vol. van het gas	43,1	vol. van het gas	53,0
koolzuur	22,2	koolzuur	27,0
waterstof	20,9	waterstof	25,8
		<i>Cultuur III.</i>	
		vol. van het gas	15,0
		koolzuur	0,0
		waterstof	15,1

De snelheid van deze zetmeelgisting is zeer groot en bedraagt bij een gisting van 3 % aardappelmeel in een Liter cultuurvloeistof reeds spoedig 100 à 150 cc. gas per uur.

§ 3. De isolatie der betreffende zetmeelaantastende bacteriën.

Teneinde deze krachtige zetmeelgisting in reïncultuur te brengen werd van herhaald overgeënte culturen uitgezaaid op agarplaten, bevattend twee percent onoplosbaar zetmeel (verstijfseld aardappelmeel), 0,1 % NH_4Cl , 0,1 % K_2HPO_4 , 0,05 % MgSO_4 en de platen gezet bij 60°C . De uitzaaiing geschiedde aerob, daar de overgeënte ophoopingsculturen wel het bewijs geleverd hadden, dat de oplossende en vergistende bacteriën zoowel in de aerobe als in de anaerobe aanwezig waren.

Reeds na één nacht zijn bij deze temperatuur op de zetmeel-agarplaten vele koloniën te zien, waarvan de meeste duidelijke oplossingsvelden in de troebele stijfsel vertoonen. Tevens valt ons een eigenaardig verschijnsel op; van zeer vele koloniën is eigenlijk van een groei der bacteriën aan de oppervlakte der plaat niets of zeer weinig te zien en bij microscopisch onderzoek blijkt het, dat de bacteriën *in* de agar en voornamelijk *in* de zetmeelkorrels, waarvan in de helder geworden agar de wanden overgebleven zijn, voorkomen. Tenslotte zijn ook de blijkbaar minder gemakkelijk aantastbare wanden verdwenen en treden de bacteriën weer naar buiten, hoewel de vorm der zetmeelkorrels in de stijve agar nog zeer goed zichtbaar blijft door de plaatselijke ophooping der meestal sporenlooze staven. Een dergelijk verschijnsel werd bij meerdere mesophile diastase bevattende bacteriën eveneens waargenomen door DE KRUYFF. Kleuring van de plaat met een verdunde jodiumoplossing toont duidelijk kleurloze velden rondom de groeiplaatsen der bacteriën in de blauwgeworden stijfselagar.

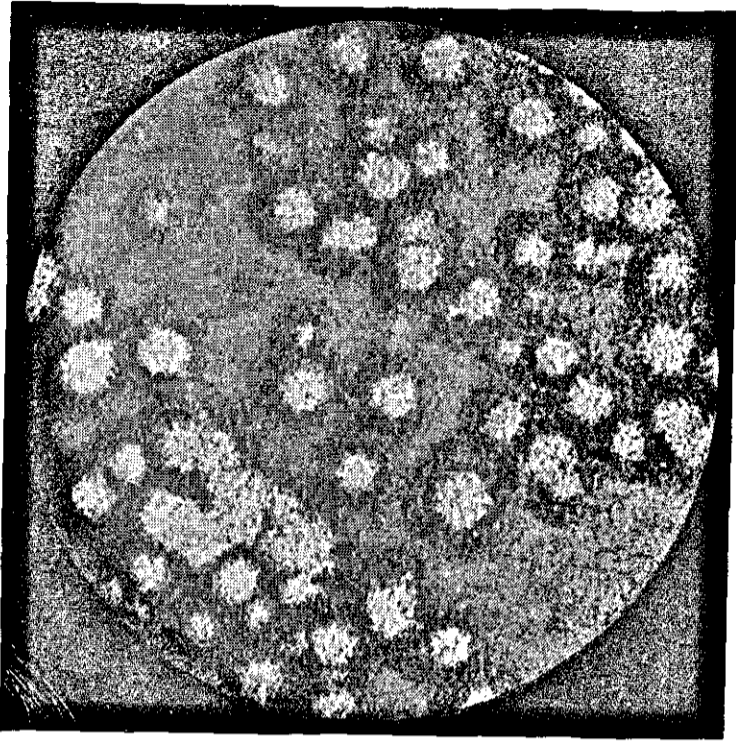
Van de krachtigst oplossende bacteriekoloniën worden op nieuwe platen van dezelfde samenstelling overentingen gemaakt, waarvoor het noodig is met den platinadraad in de agar op

de plaats van den bacteriegroei door te dringen. De overentingen bewijzen, dat de eerste kolonie uit één en dezelfde bacterie was ontstaan, zoodat we dus hiermede een reïncultuur op de plaat verkregen hebben van een thermophile zetmeeloplossende bacterie, terwijl het zeer veelvuldig voorkomen dezer koloniën op de platen, waarop de ophoopingsculturen der zetmeeldissimilatie zijn uitgezaaid, het vermoeden wettigt, dat we hiermede deze zeer snel zetmeelvergistende bacteriën hebben geïsoleerd. Photo II, doet duidelijk de eigenaardige koloniën met hunne oplossingsvelden zien; zij is genomen nadat de plaat, na het verlaten van den thermostaat van 60°, nog 24 uur bij kamertemperatuur heeft gestaan, wat tot gevolg heeft dat ook retrogradatie buiten de oplossingsvelden te zien is; bij 60° heeft deze retrogradatie niet plaats. Photo III vertoont een zelfde kolonie meer vergroot en toont de massa's bacteriën in de zetmeelkorrels; daar natuurlijk niet alle korrels op gelijk niveau liggen, is niet de geheele photo scherp.

Met deze reïncultuur wordt nu getracht een steriele voedingsoplossing, voorzien van Calciumcarbonaat en drie percent zetmeel, tot gisting te brengen. Het blijkt noodzakelijk voor het doen van deze proef langer of hooger te steriliseeren dan gewoonlijk, omdat anders de controle, d.w.z. de ongeënte kolf eveneens oplossing van het zetmeel vertoont en ook gisting. Wanneer men echter de voorzorgen goed genomen heeft door bijv. 20 minuten op 115° C. te verhitten, dan blijft de controle steriel, de met één kolonie van de plaat geënte kolf vertoont reeds na een enkelen nacht staan bij 55° C. een bijna totale oplossing van het zetmeel, gisting wordt echter *niet* waargenomen (zie photo IV).

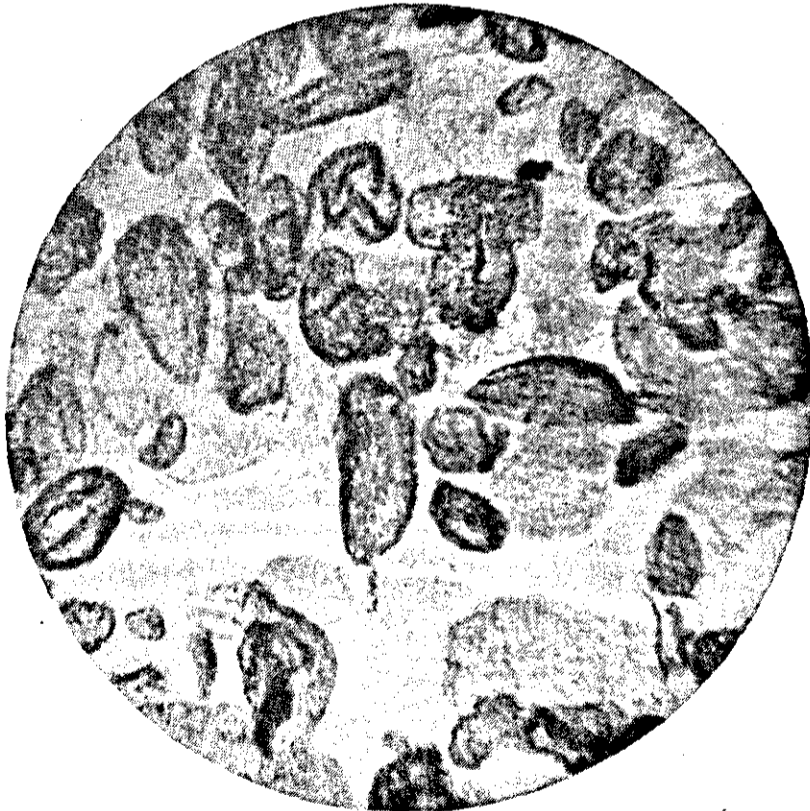
We hebben dus een zeer krachtig zetmeelaantastende bacterie geïsoleerd, doch het is blijkbaar niet die, welke oorspronkelijk werd gezocht, n.l. de bacterie welke een zoo snelle gisting te zien gaf.

PHOTO II



Koloniën van *Bac. Thermo-amylolyticus* n.sp.
op 2 % zetmeelagar, 24 uur bij 55° C. Ongekl.
vergrooting 8 ×

PHOTO III



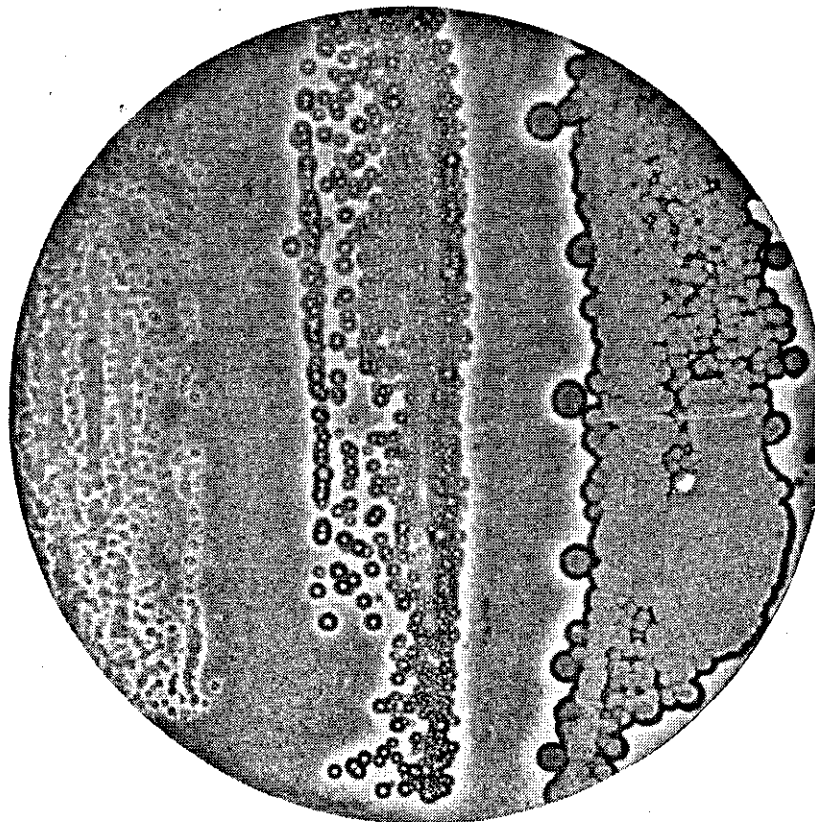
De ophooping van *Bac. Thermo-amylolyticus* n.sp.
in de zetmeelkorrels. Ongekleurd
vergrooting ± 500 ×

PHOTO IV



De oplossing van 3 % aardappelmeel

PHOTO V



Drie verschillende thermophile zetmeel oplossende stammen. 24 uur bij 55° C. Ongekleurd

$\frac{2}{3} \times$ nat. grootte

Het veelvuldig voorkomen ervan in de herhaaldelijk overgeënte ruwculturen wijst er echter op, dat deze bacterie op dezelfde wijze als de gistende soort wordt opgehoopt; het is dus niet onmogelijk, dat de vergisting van het zetmeel door een hydrolyse door deze bacterie wordt ingeleid, zoodat de veronderstelling voor de hand ligt, dat de gisting veroorzaakt wordt door een andere, n.l. die welke ook suikers bij deze hooge temperatuur vergist, welk buitengewoon snel proces we reeds bij de bestudeering der methaangistingen zijn tegengekomen. In dit hoofdstuk zal de zetmeelhydrolyse, welke dus zonder vergisting verloopt, worden behandeld, terwijl aan de vergisting zoowel van suikers als van zetmeel, in het hierop volgende hoofdstuk alle aandacht zal worden geschonken.

§ 4. Isolatie van verschillende aerobe zetmeelhydrolyseerende stammen en de beschrijving der voornaamste.

Reeds bij de eerste uitzaaiing der overgeënte ophoopingsculturen was het opgevallen, dat er koloniën met duidelijke oplossingsvelden waren, welke echter in uiterlijk van elkander verschilden.

Hernieuwde uitzaaiing van de ruwcultuur leidde tot het overenten en in reïncultuur brengen van drie verschillende stammen, welke een kolonievorm op de zetmeelplaten vertoonden, waardoor zij duidelijk van elkander waren te onderscheiden.

Stam I gaf na 12 uur bij 55° C. groote koloniën, waarvan geen enkele bacterie aan de oppervlakte der zetmeelagarplaat groeide, doch waarvan alle in de plaat en in de zetmeelkorrels waren doorgedrongen. Het oplossingsveld rondom de groeiplaats der bacteriën, ontstaan door diffusie der diastase door de agar, was hier niet zeer groot. Na het verlaten van den thermostat van hooge temperatuur treedt ook retrogradatie op, het-

geen te zien is, doordat rondom het oplossingsveld een sterk troebele ring verschijnt.

Stam II is dezelfde, als de oorspronkelijk geïsoleerde en in photo 2 afgebeelde kolonie; na 12 uur bij 55° C. zijn het veel kleinere koloniën als van stam I, de bacteriën zijn grootendeels in den agar doorgedrongen, doch ook is nu dikwijls oppervlakte-groei aanwezig. Vooral op platen, welke wat vochtig zijn of welke minder dan 2 % zetmeel bevatten, vertoont stam II oppervlaktegroei; op dergelijke platen groeit stam I geheel niet of zeer slecht. Het oplossingsveld rondom de veel kleinere koloniën van stam II is echter zeer groot, zoodat de totale hoeveelheid opgelost zetmeel op de platen sterk overeenkomt met die bij een even oude kolonie van stam I. Retrogradatie vindt ook hier even goed plaats na het verlaten van den thermostaat van 55°.

Stam III vertoont evenzeer oplossing en retrogradatie van het zetmeel; de koloniën zijn echter veel kleiner en ook de oplossing is hier gering; de bacteriën groeien alleen aan de oppervlakte der plaat.

Photo V toont de drie verschillende stammen op dezelfde zetmeelagarplaat uitgezaaid; de plaat heeft na een verblijf van 16 uur in den thermostaat van 55° nog een dag bij kamertemperatuur gestaan, gedurende welke laatste periode de retrogradatie zichtbaar is geworden rondom de oplossingsvelden.

Deze drie stammen worden nu als entmateriaal gebezigd van een steriele cultuurvloestof met drie percent verstijfseld aardappelmeel. Het bleek nu, dat zuurvorming of gisting nergens plaats had, doch dat de beide eerste stammen buitengewoon snel de stijfsel tot oplossing brachten, terwijl de derde dit slechts zeer langzaam deed.

Het zou mogelijk kunnen zijn, dat deze laatste feitelijk evenzeer een krachtig hydroliseerende bacterie is, doch dat de

temperatuur van 55°, waarbij alle stammen zijn opgehoopt en geïsoleerd, hier minder geschikt is. Daarom wordt van alle drie de optimumtemperatuur bepaald, door uitzaaïing op een groot aantal platen, welke bij verschillende temperaturen worden weggezet; het bleek uit deze proef, dat er geen verschil in optimumtemperatuur voor één der drie stammen bestond. We moeten dus den derden kolonievorm beschouwen, als afkomstig van eene slechts zwak hydroliseerende bacteriesoort, zij is dientengevolge niet langer in cultuur gehouden en de proeven, dienende om tot een goede bacteriebeschrijving te komen, zijn slechts voortgezet met stam I en II. Het doel van het onderzoek was immers slechts zich bezig te houden met bacteriën, die een krachtig dissimilatieproces vertoonden en niet het isoleeren van een zoo groot mogelijk aantal thermophile bacteriesoorten.

De beschrijving der beide snel hydroliseerende stammen bevat de morphologische kenmerken der bacteriën, met de uiterlijke kenteekenen hunner groei in verschillende media en op verschillende vaste voedingsbodems, en hunne physiologische eigenschappen, waarvan dan in het bijzonder de dissimilatie van zetmeel aan een nader onderzoek is onderworpen.

A. Morphologische eigenschappen.

	<i>Stam I.</i>	<i>Stam II.</i>
vorm der bacteriën	staaf met afgeronde einden	idem
sporen	zelden	dikwijls
plaats van de sporen	eindstandig	idem
grootte van de sporenlouze staaf	5-6 μ lang, 0,6 μ dik	idem
grootte van de sporenbvattende staaf	3 μ lang, 0,6 μ dik	idem
grootte van de spore	1,5 μ lang, 0,6 μ dik	idem

beweeglijkheid met jodium kleurende reservestof	positief	idem
gramkleuring	geen positief	idem idem

B. Uiterlijke kenteekenen der groei op platen of in vitro.

koloniebeschrijving op:	<i>Stam I.</i>	<i>Stam II.</i>
2% zetmeelagar, 15 uur bij 55 gr.	grote ronde kol., $\frac{1}{2}$ cm. in doorsnede, wit van kleur, alle bacteriën zijn in de plaat en in de zetmeelkorrels doorgedrongen, geen sporen.	kleine kol., onregelmatig van vorm, gedeeltelijk aan de oppervlakte (rond, Imm. doorsnede). De groei in de plaat onregelmatig van de oppervlakte uitgaande. In het oppervlakkig gedeelte ook sporen.
2% saccharose-agar	zeer kleine doorschijnende kleurloze koloniën, 1 mm. doorsnede. Weinig sporen. Dikwijls mislukt de groei geheel.	zeer kleine ronde witte koloniën, 1 mm. doorsnede, gekorrelt door de aanwezigheid van sporen.
grondagar, 2% sacchar. met een dunne laag van denzelfden bodem, voorzien van fijn Ca-carbonaat op den eersten.	als boven, oplossing van het krijt.	als boven, geringe oplossing van het krijt.
groei op aardappelsteekcultuur in 2% saccharose-agar.	slecht, geen kleur overal draderige groei in de agar, uitgaande van de steek.	idem idem
groei in bouillon	zwak, geen huidvorming; geen sediment.	idem

C. Physiologische eigenschappen.

	<i>Stam I.</i>	<i>Stam II.</i>
zetmeelhydrolyse	krachtig	idem
eiwitsplitsing	zwak	idem

nitraatreductie	tot nitriet	idem
indolvorming	geen	idem
ammoniakvorming uit eiwitten	geen	idem
katalase	geen	idem
zuurvorming uit kool- hydraten	zeer gering	idem
gasontwikkeling uit koolhydraten	geen	idem
gedrag in melk	geen coagulatie, geen zuurvorming.	idem
optimum temp.	55 graden	idem
maximum temp.	65—68 graden	idem
minimum temp.	30—35 graden	idem

Opmerkingen over de gebruikte methoden bij de bepaling der verschillende eigenschappen der bacteriën.

De optimum-, maximum- en minimumtemperaturen zijn bepaald door uitzaaiing op zetmeelagarplaten, welke in thermostaten werden geplaatst van 20, 26, 30, 37, 45, 55, 60, 65 en 68° C.

Na één nacht was krachtige groei te zien op de platen bij 55°, minder, maar doch duidelijk bij 60°, na anderhalven dag ook op de platen bij 45 en 37°, na drie dagen ook een zeer geringe groei bij 65° en bij 30°. Na eenige weken was op de platen bij 20, 26 en 68° nog geen groei waar te nemen. De platen hebben alle onder een klok gestaan, waaronder een schaalje met water uitdroging van de platen moest voorkomen. Zoals reeds gezegd werd deze proef ook uitgevoerd met stam III.

Het onderzoek naar de aanwezigheid van proteolytische enzymen werd uitgevoerd door uitzaaiing op zgn. caseïneplaten. Deze platen zijn op de volgende wijze samengesteld. De onderste laag bestaat uit agar van gedestilleerd water, waarin met natronloog geneutraliseerde caseïne is opgelost, een dunne bovenste laag bestaat uit agar, waaraan behalve de noodzakelijke

voedingszouten eenig Calciumchloride is toegevoegd. In deze laag nu slaat als een troebele massa Ca-caseïnaat neer en bij aanwezigheid van proteolytische enzymen in de uitgezaaide bacteriën, zien we rondom de koloniën een dichter troebele vlek verschijnen, veroorzaakt door het neerslaan van calcium-paracaseïnaat, welk neerslaan gevolgd wordt door een oplossing tot aminozuren en weiproteïne; de troebele vlek wordt dus langzamerhand een ring, waarbinnen een helder veld verschijnt, helderder, dan de plaat is ook buiten het neergeslagen paracaseïnaat.

Deze plaatmethode werd gevolgd omdat, gezien de hoge optimumtemperatuur dezer bacteriën, uitzaaïen op gelatineplaten niet mogelijk was; wel werd de gelatinevervloeiing bestudeerd door de bacteriën in gelatinehoudende voedingsvloeistof te laten groeien, om daarna te constateeren, dat deze bij lage temperatuur nog stolde.

De reactie op indol werd uitgevoerd met natriumnitriet en sterk zwavelzuur, waarbij een roode of purpere kleur op de aanwezigheid van indol wijst; zooals gezegd was de reactie negatief. Op katalase werd gereageerd door de platen te overgieten met een verdunde H_2O_2 oplossing; het is wel merkwaardig dat deze facultatief anaerobe bacteriën geen katalase bevatten.

§ 5. De aard en de snelheid der zetmeelhydrolyse door de reincultuur van de stammen I en II.

Daar we beide bacteriën door ophoopingsculturen in zetmeelhoudende vloeistoffen hebben verkregen en beide culturen bewezen hebben zeer krachtig deze stof aan te tasten, moet deze eigenschap als de belangrijkste worden beschouwd en zal een verschillend gedrag ten opzichte hiervan voornamelijk beslissen of we met verschillende species te doen hebben.

a. Kwalitatief onderzoek naar de gevormde producten.

Vier kolven van 1 L. inhoud worden gevuld met 750 cc. water, 25 gram aardappelmeel, 1 gram NH_4Cl , 1 gram K_2HPO_4 , 0,5 gram MgSO_4 en eenig Ca-carbonaat ¹⁾. Het zetmeel wordt verstijfseld en alle kolven gesteriliseerd door verhitting in den autoclaaf gedurende 20 min. op 112—115° C. Twee kolven worden geënt met den reincultuur van stam I, de beide anderen met die van stam II.

Daar we reeds weten dat bijna geen zuren, noch gassen gevormd worden, is het onnoodig buizen ter afleiding van koolzuur of andere gasvormige producten aan te brengen. (Bij oriënteerende proeven is dit wel gebeurd en geconstateerd, dat de loog welke de eventueel ontwijkende gassen moesten passeeren nagenoeg onveranderd bleef.)

Na 24 uur bij 55° C. is reeds zeer duidelijk oplossing van het zetmeel merkbaar, vooral in de kolven, geënt met stam I. De helder geworden bovenstaande vloeistof kleurt in alle kolven met jodium nog blauw. Na twee maal 24 uur is in alle kolven vrijwel alle zetmeel opgelost. De heldere oplossingen kleuren met jodium rood, één kolf met stam II geënt vertoont nog een violette verkleuring. Na 5 dagen is in de met I zoowel als in de met II geënte kolven met jodium geen roodkleuring meer waar te nemen. Alle kolven worden nu uit den thermostaat gehaald en de vloeistof onderzocht op hare samenstelling. Ze blijkt bij verhitting met fehling een niet krachtige reductie te vertoonen, na inversie is deze zeer krachtig. Door middel van vergisting in gesteriliseerde gistingsbuisjes volgens Einhorn wordt nu met verschillende gistsoorten de vloeistof uit de kolven op vergisting onderzocht. De resultaten zijn verzameld in de tabel voorkomende op blz. 58.

¹⁾ Bevordert een gemakkelijke verstijfseling en is noodig voor de binding van de sporen gevormd zuur.

De heldere vloeistof uit de culturen, voorzien van evenveel gistextract, gesteriliseerd en geënt met nevenstaande gistsoorten.	Torula monosa	Persgist van de Ned. Gist- en Spiritusfabriek	maltase-vrije lactose-gist
vloeistof uit cultuur No. Ia	—	+	—
” ” ” ” Ia	—	+	—
” ” ” ” Ib	—	+	—
” ” ” ” Ib	—	+	—
” ” ” ” IIa	—	+	—
” ” ” ” IIa	—	+	—
” ” ” ” IIb	—	+	—
” ” ” ” IIb	—	+	—
gistextract-glucose	+	+	+
gistextract-maltose	—	+	—

De cultuurvloeistoffen uit alle kolven worden nu ter vergisting gegeven aan een reincultuur van de persgist der Ned. Gist en Spiritusfabriek, zoodat dus de aanwezige suikers worden weggenomen. Daarna wordt geïnverteerd door met zoutzuur tot een concentratie van 2,5 % op een waterbad drie uur lang te koken en vervolgens dezelfde gistingproef herhaald. Het resultaat is, dat nu in alle monsters gisting plaats heeft door alle gebruikte gisten.

Deze proeven leeren ons, dat de overgebleven heldere cultuurvloeistoffen alle vergist worden door *Saccharomyces Cerevisiae*, niet door *Torula monosa* en niet door een maltase-vrije lactosegist. Hieruit volgt dat aanwezig is *maltose*, geen *saccharose*, geen *monosen*¹⁾. De proeven, gedaan met de cultuurvloeistoffen, nadat deze zijn vergist met de persgist en daarna geïnverteerd, bewijzen dat er nog een vergistbare monose is gevormd bij de inversie. In alle cultuurvloeistoffen is dus naast maltose nog aanwezig *opgeloste met jodium niet kleurende*

¹⁾ Na verloop van langeren tijd is ook een weinig glucose ontstaan.

dextrinen; de werking der bacteriën is dus niet meer dan een hydrolyseerende.

Een proef, ingezet volgens de voorschriften van SCHARDINGER in zijn onderzoek over de vorming van kristalliseerbare dextrinen door *Bac. macerans*, leverde met de door mij geïsoleerde thermophile stammen geen kristalliseerbaar product op.

b. Kwantitatief onderzoek naar de hoeveelheden gevormde suikers en dextrine.

Een aantal kolven van een halve Liter inhoud worden gevuld met 400 cc. water, 10 gram aardappelmeel, 300 mgr. NH_4Cl , 300 mgr. K_2HPO_4 , 100 mgr. MgSO_4 en iets Calciumcarbonaat. Het zetmeel wordt verstijfseld en daarna alle kolven gesteriliseerd door verhitting in den autoclaaf gedurende 20 minuten op 112—115° C. De helft van de kolven wordt geënt met stam I, de andere helft met stam II en alle kolven in den thermostaat van 55° geplaatst. Na een verschillend aantal dagen worden nu de kolven onderzocht op de aanwezige hoeveelheid maltose en dextrine. Genoemd onderzoek wordt verricht door 75 cc. der cultuurvloeistoffen in duplo te vergisten met 15 gram persgist van de Ned. Gist- en Spiritusfabriek. Daartoe wordt gebruik gemaakt van bij een constante temperatuur van 38° C. regelmatig schuddende flesschen, voor welk werk in het laboratorium speciale apparaten aanwezig zijn, en de hoeveelheid ontwikkeld koolzuur af te lezen in buretten, gevuld met een verzadigde keukenzoutoplossing. Controleproeven op precies dezelfde wijze uitgevoerd met bekende hoeveelheden suiker leveren steeds constante hoeveelheden koolzuur, mits men zorg draagt met versche gist te werken.

De suikerbepalingen worden dus gedaan na een verschillend aantal dagen, steeds tweemaal met 75 cc. gistingsvloeistof, zoowel zonder, als na vooraf plaats gehad hebbende inversie (aanzuren tot 2,5 % zoutzuur en drie uur lang op het waterbad koken).

De uitkomsten der proeven zijn in onderstaande tabel verenigd. De hoeveelheden vergistbare suiker zijn berekend uit de gemiddelde koolzuurhoeveelheden in vergelijking met controle waarnemingen.

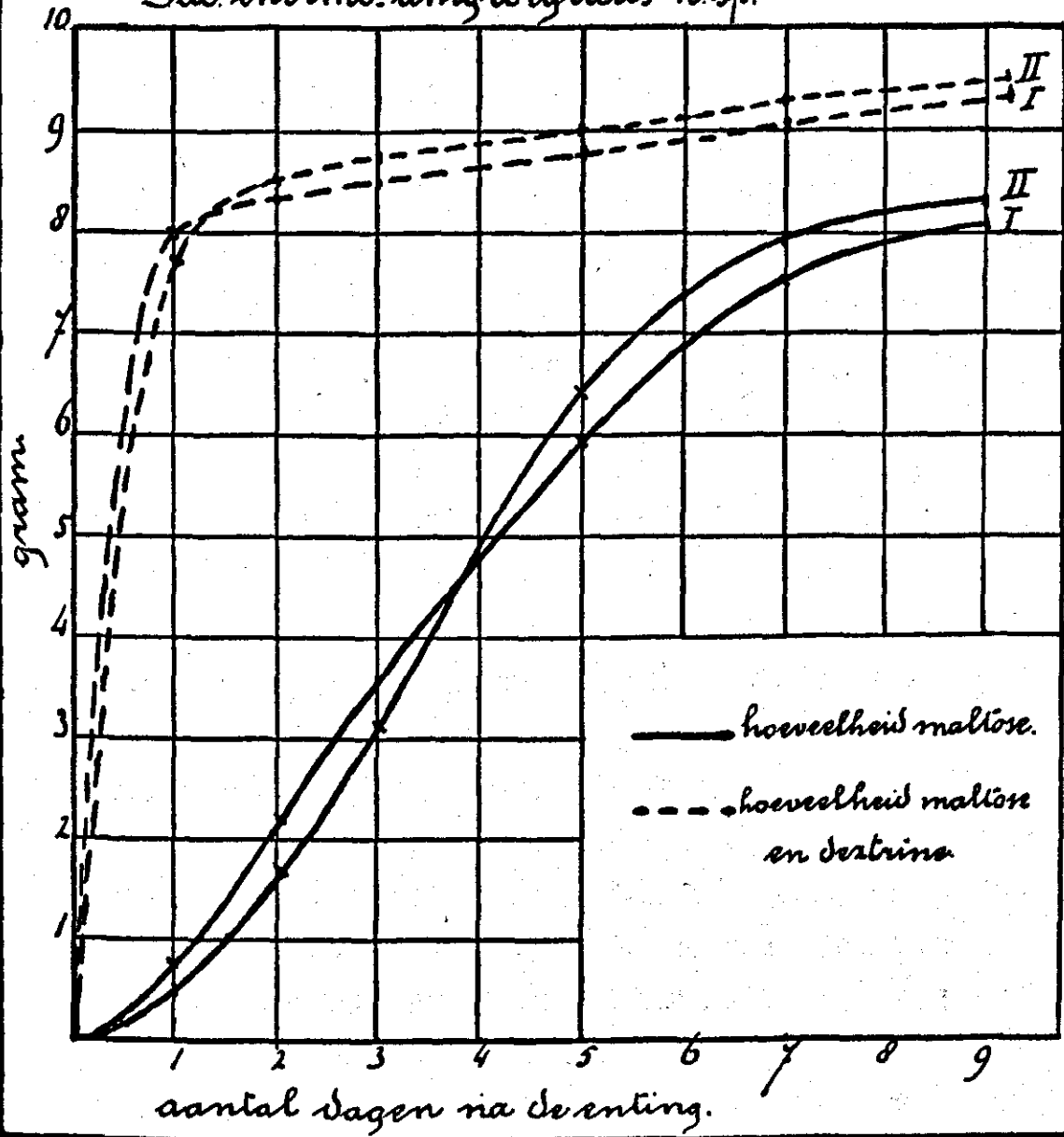
Aantal dagen na de enting	Geënt met stam No.	Hoeveelheid vergistbare suiker	
		vóór inversie	na inversie
1	I	0,7	7,7
1	II	0,6	7,3
2	I	2,2	8,4
2	II	1,7	8,5
3	I	3,1	8,6
3	II	2,8	8,8
5	I	5,9	8,8
5	II	6,4	9,0
7	I	7,5	9,1
7	II	7,9	9,3
9	I	8,1	9,4
9	II	8,3	9,5

Zie tevens graphische voorstelling III.

Conclusies.

Uit bovenstaande cijfers en uit genoemde graphische voorstelling zien we dus, dat het aardappelmeel binnen zeer korten tijd geheel in oplossing gaat, doch dat de hoeveelheid gevormde maltose de eerste dagen nog gering is. In negen dagen tijds echter is ongeveer 95 % van de hoeveelheid zetmeel in oplossing gegaan en is hiervan ruim 80% voornamelijk tot maltose afgebroken. Een eenigszins belangrijk verschil tusschen beide stammen vinden we bij het bestudeeren van het verloop der zetmeelhydrolyse niet en daar ook de overige eigenschappen, op den kolonievorm en de veelvuldigheid van sporenvorming na, niet verschilden, mogen we aannemen met twee variëteiten van dezelfde bacteriesoort te doen te hebben.

Graphische voorstelling III
 De hydrolyse van 10 gram aardappelmeel door
Bac. thermo. amylolyticus n. sp.



§ 6. Identificatie der bacteriesoort.

Wanneer we de op bovenstaande wijze beschreven bacteriesoort trachten te identificeeren en dus moeten vergelijken met één der reeds bekende thermophile diastasebevattende bacteriën, dan valt hierbij op, dat bij de laatste nergens groei in de zetmeelkorrels vermeld wordt, wat reeds doet vermoeden, dat we waarschijnlijk wel met een andere soort te doen zullen hebben, omdat een dergelijk eigenaardig verschijnsel, indien aanwezig, zeker niet bij de beschrijving zou zijn verzwegen. De mogelijkheid blijft echter bestaan, dat altijd op zetmeelagarplaten van een te geringe amyllumconcentratie is gewerkt en daardoor van het verschijnsel niets bemerkt is. Het blijkt echter ook, dat alle bekende soorten afwijkende eigenschappen bezitten in vergelijking met de bovenbeschreven in de zetmeelophoopingsculturen verkregen bacterie.

Bac. thermodiastaticus BLAU en *Bac. lobatus* BERGEY hebben centraal gelegen sporen, *Bac. thermotranslucens* BERGEY vertoont een kruipende kolonie en hydrolyseert slechts langzaam, *Bac. cylindricus* BLAU heeft een optimumtemperatuur van 60—70° C. en bezit glycogeen als reservemateriaal, *Bac. thermomonliquefaciens* BERGEY groeit nog bij 75° C. en vertoont een optimumtemperatuur van 70° C., *Bac. thermoindifferens* BERGEY groeit nog goed bij 20° C., *Bac. tostus* BLAU heeft een optimumtemperatuur van 60—70° C. en bezit glycogeen als reservemateriaal, *Bac. aerothermophilus* WEINZIRL maakt een dik vlokkig sediment in bouillon en vormt alkali in melk.

Uit deze vergelijkingen moeten we dus besluiten, dat de beschreven bacterie, welke verkregen is door ophooping in zetmeel en door selectie naar het hydrolyseerend vermogen, beschouwd moet worden als een nog niet bekende soort, welke kan worden gerekend te zijn een buitengewoon krachtige zetmeelaantastende thermophile bacterie, voor welke de bena-

ming *Bacillus thermo-amylolyticus* mij het meest geschikt voorkomt, hierbij de systematische indeeling volgend der Soc. of American Bacteriologists, zooals deze in BERGEY'S Manual of determinative bacteriology is beschreven, een systematische groepeerling, welke verder gaat en meer gedetailleerd is dan die van LEHMANN en NEUMANN.

HOOFDSTUK IV

DE VERGISTING VAN SUIKERS EN ZETMEEL DOOR THERMOPHIELE BACTERIËN TOT KOOLZUUR, WATERSTOF EN ORGANISCHE ZUREN

§ I. Inleiding.

Zoals in het eerste hoofdstuk is besproken, was voornamelijk uit de onderzoekingen van SCHILLINGER, SAMES en SCHARDINGER reeds bekend, dat ook bij een voor het leven zoo abnormale temperatuur als 60° C. en hooger, gistingsprocessen in suikerhoudende vloeistoffen plaats hadden; ook was bij mijne eigen proeven over de mogelijkheid, om bij deze temperatuur suikers kwantitatief tot koolzuur en methaan te doen vergisten, reeds gebleken, dat in de ruwculturen en na verloop van tijd ook in de ophoopingsculturen der methaanproduceerende bacteriën, een buitengewoon snel verloopende vergisting van saccharose plaats had tot koolzuur en waterstof; een gisting, welke in tegenstelling tot de thermophile methaangistingen zeer goed met een enkelen droppel was over te enten en dus alle hoop gaf voor het in reïncultuur brengen der betreffende bacterie.

In het vorige hoofdstuk is besproken, dat een krachtige gisting eveneens optreedt, wanneer in plaats van rietsuiker zetmeel is toegevoegd aan een cultuurvloeistof met anorganische voedingszouten en grond of grachtmodder als entmateriaal. De gemakkelijk uit deze gistingen te isoleeren zetmeelsplitsende thermophile bacteriën bleken echter geen gisting te

veroorzaken, niettegenstaande dit zeker werd verwacht, omdat zij steeds in zoo grooten getale in de herhaalde malen overgeënte zetmeelgistingen voorkwamen. Het vermoeden lag dus voor de hand, dat deze geïsoleerde bacteriën indirect de oorzaak waren der zetmeelgisting, doordat de door hen verrichte zeer krachtige hydrolyse een vergistbare suiker tot eindproduct had. Hetzij deze veronderstelling juist is of niet, in elk geval moet er nog een andere bacterie zich in de gistende ophoopingsculturen bevinden, waarvan het niet zeker is, of deze werkelijk zetmeel vergist, echter wel suikers. De proeven, ten doel hebbend deze bacterie te vinden, werden dus in het vervolg ingezet met suikers als vergistbaar materiaal.

§ 2. De vergisting van saccharose en van glucose in ruwcultuur.

Een tweetal literkolven worden gevuld met 1 Liter water, 10 gram Calciumcarbonaat, 0,1 % K_2HPO_4 , 0,1 % NH_4Cl , 0,05 % $MgSO_4$ en 10 gram saccharose. Aan twee andere kolven, voorzien van evenveel water, krijt en zouten wordt 10 gram glucose toegevoegd. Alle kolven worden geënt met een paar schepjes modder uit de Wageningsche gracht en geplaatst in den thermostaat van 60° C.

Na 24 uur is in alle kolven duidelijke gisting waar te nemen, waarvan de snelheid spoedig zeer sterk toeneemt. Bij toevoeging van opnieuw 20 gram van dezelfde suikers, nadat de eerste 10 gram zijn opgegist, is de gistingssnelheid den daarop volgenden dag reeds van de saccharosegisting 120 cc. gas per uur, van de glucosegisting bedraagt zij onder dezelfde omstandigheden 74 cc. gas per uur. Op dezelfde wijze zijn een groot aantal oriënterende proeven gedaan; ook werd hierbij dikwijls in plaats van grachtmodder, grond en ook grachtwater als entmateriaal gebruikt. Bij deze proeven is opgevallen, dat steeds de saccha-

rose sneller vergistte dan de glucose en dat de met modder geënte kolven steeds spoediger en sneller gistten, dan de andere. De gassen dezer gistingen zijn steeds opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing, waardoor het mogelijk werd over de gistingssnelheden een groot aantal gegevens te verzamelen en tevens eenige voorloopige analyses uit te voeren. Zoowel de glucose- als de saccharosegistingen blijken steeds een gasmengsel te leveren bestaande uit koolzuur en waterstof in een verhouding van ongeveer 1 : 1.

De bovengenoemde saccharose- en glucosegistingen worden nu overgeënt in dezelfde cultuurvloeistof, als welke oorspronkelijk werd gebruikt. Alle overentingen slagen; wanneer geen Calciumcarbonaat wordt toegevoegd, heeft geen belangrijke gisting plaats. Inplaats van enkel leidingwater wordt ook voor een deel grondextract gebruikt; het blijkt, dat de overentingen hierin sneller gisting te voorschijn roepen en dat de gisting ook krachtiger verloopt.

Een microscopisch onderzoek der overgeënte gistingen toont aan, dat de meeste bacteriën zich in het calciumcarbonaatbezinksel bevinden; het zijn vrij lange staven, welke met tweeën of los van elkander voorkomen; sporen worden zeer zelden waargenomen.

Daar de oriënterende proeven geleerd hadden, dat de aanwezigheid van grondextract en modder, in het algemeen een bezinksel van een fijne structuur, voor het op gang komen der gistingen bevorderlijk is, werd voortaan overgeënt in cultuurvloeistoffen van de volgende samenstelling:

leidingwater	75
grondextract ¹⁾	25

¹⁾ Bereid door 1 K.G. grond te brengen in 2 L. kokend water, een half uur door te koken en daarna te filteren en te steriliseeren. Hoeveelheid droge stof 0.008 %.

amm. chloride	0,1
sec. kaliumphosf. ..	0,1
magnesiumsulf.	0,05
saccharose	1
Calciumcarb. Laev.	1

Steriliseeren 20 minuten op 110—112° C. Het verdient aanbeveling steeds een ongeënt controlekolfje naast de geënte in den thermostaat te zetten, omdat, wanneer iets korter is gesteriliseerd, vooral bij gebruik van kolfjes, welke reeds eerder voor dit werk hebben dienst gedaan, het voorkomt, dat de ongeënte ook gaan gisten, doordat nog enkele sporen de verhitting hebben overleefd. Hooger, dan uiterlijk 115° C. is echter voor de sterilisatie niet aan te bevelen, vooral niet bij proeven over de vergisting van sterk caramelliseerende suikers, zooals bijvoorbeeld glucose.

Overentingen van deze gisting werden ingezet in literkolven met een liter der bovengemelde culuuvloeistof en de gassen opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing en geanalyseerd. Onderstaande cijfers gelden als voorbeeld van een groot aantal verrichte gasanalyses.

Gisting van saccharose, 5^e overenting.

nadat 1,5 L. gas is geproduceerd:		nadat 2,5 L. gas is geproduceerd:	
volume van het gas	55,0 cc.	volume van het gas	52,4 cc.
koolzuur	27,2 cc.	koolzuur	26,3 cc.
waterstof	27,6 cc.	waterstof	25,8 cc.

Gisting van glucose, 3^e overenting.

nadat 1 L. gas is geproduceerd:		nadat 2 L. gas is geproduceerd:	
volume van het gas	47,4 cc.	volume van het gas	45,5 cc.
koolzuur	24,3 cc.	koolzuur	24,3 cc.
waterstof	22,8 cc.	waterstof	20,9 cc.

De uitgegiste vloeistoffen vertoonen een duidelijke boterzuurigheid, de reactie op boterzuur is sterk positief. Het vermoeden ligt dus voor de hand, dat we hier met eene thermophile boterzuurgisting te doen hebben en daar de gasanalyses thans een constant beeld vertoonen, kunnen we aannemen ophoopingculturen te bezitten, waaruit door uitzaaiingen op vaste voedingsbodems reinculturen zijn te krijgen, met welke, indien dit is gelukt, nauwkeuriger analyses zullen worden uitgevoerd.

§ 3. De isolatie van de thermophile gistende bacterie.

Zooals reeds is opgemerkt, zien wij in het bezinksel, hoewel bij krachtige gisting ook in de vloeistof, zeer vele vrij lange staafbacteriën, meestal zonder sporen en los van elkander of bij tweeën samenhangend. Naar alle waarschijnlijkheid zijn dit dus de suikersvergistende organismen, welke wij zullen trachten, door uitzaaiing op een daarvoor geschikten voedingsbodem, in reincultuur te verkrijgen. Daar al wel gebleken was, dat de gisting niet zeer streng anaeroob was, wordt uitgezaaid op aerobe platen, bestaande uit grondagar ¹⁾, 1 % saccharose, 0,1 % NH_4Cl , 0,1 % K_2HPO_4 en 0,05 % MgSO_4 . De platen worden in den thermostaat van 60° C. geplaatst met het deksel omlaag, teneinde het op den agar neervallen van condensatiewater te voorkomen.

Reeds na één nacht staan bij deze temperatuur zijn verscheidene koloniën op de platen gegroeid. In de eerste plaats vallen groote, sterk slijmige koloniën op, bestaande uit vrij lange staafbacteriën, welke veel overeenkomst vertoonen met de in het krijtbezinksel der overgeënte gistingen aangetroffen organismen. Met deze koloniën worden nu gesteriliseerde kolfjes,

¹⁾ Op de gewone wijze uit grondextract bereide agar.

voorzien van de bovenvermelde voedingsvloeistof, geënt; de gasontwikkeling is echter zeer gering. Een nader onderzoek leert, dat deze bacterie uit saccharose een gomachtige slijmige stof produceert, welke echter met sterk zoutzuur aan een terugvloeikoeler gekookt geen vergistbare suiker oplevert. Ofschoon deze bacterie nog enkele interessante eigenschappen vertoont, zooals een krachtige eiwitsplitsing, wordt zij niet langer in cultuur gehouden, daar gebleken is, dat zij bij de gisting geen rol speelt.

Op de platen komen echter nog vele andere koloniën voor, die alle veel kleiner zijn, dan die van dezen slijmvormer. Twee typen zijn te onderscheiden: zeer doorschijnende, dikwijls voor het grootste gedeelte slechts een enkele bacterielaag dikke koloniën en zoowel regelmatig als onregelmatig gekorrelde koloniën. Door herhaalde overentingen op dezelfde aerobe platen worden de reïnculturen verkregen; het blijkt nu, dat beide koloniën van eenzelfde bacteriesoort afkomstig zijn, omdat bij overenting uit een enkele doorschijnende, zoowel als uit een gekorrelde kolonie, steeds weer beide typen voortkomen. Het verschil tusschen beide is, dat de eerste bestaat uit sporenlooze staven, de tweede uit sporenbevattende.

Met de verkregen reïnculturen worden nu met de cultuurvloeistof gevulde kolfjes geënt en in den thermostaat van 60° gezet. Het resultaat van de proef is teleurstellend; de met een enkele kolonie geënte kolfjes gisten niet of zeer slecht.

Zijn dit dus ook niet de gezochte gistende bacteriën? Het is verwonderlijk, dat deze dan in zulk een grooten getale in de zoovele malen overgeënte gistingen voorkomen; ja zelfs zien we op de platen, waarop een druppel uit het bezinksel der herhaalde malen overgeënte gistingen is uitgezaaid, dikwijls niet anders dan deze koloniën. Een tweede poging wordt nog gedaan, waarbij de verkregen koloniën niet van plaat op plaat worden overgeënt, doch direct weder in een gistingskolfje gebracht,

en ziet, nu gelukt het onmiddellijk zonder eenig bezwaar een krachtige gisting te verkrijgen.

Er blijven nu twee mogelijkheden over: òf temidden der zichtbare koloniën op de platen liggen de sporen van andere bacteriën, die op de aerobe platen niet kiemen, maar die we met de koloniën weer in de gistingskolfjes terugbrengen, zoodat zij wederom gisting veroorzaken, terwijl we ze door het overenten van plaat op plaat zijn kwijtgeraakt; òf de koloniën zijn werkelijk die van de gisting veroorzakende bacteriesoort, doch de bacteriën verliezen bij herhaalde overenting op aerobe platen hun vermogen tot anaerobe energiewinning.

Om uit deze moeielijkheid te komen, moest op andere wijze worden te werk gegaan, waarbij natuurlijk in de eerste plaats gedacht wordt aan anaerobe uitzaaiing der gistingen. Dit brengt echter bij een temperatuur van 60° C. eigenaardige moeielijkheden mede; het wilde n.l. niet gelukken een exicator, waarin de platen waren geborgen en welke was leeggepompt en daarna grootendeels met waterstof gevuld, goed gesloten te houden, doordat het stijve vet, dat ik er voor gebruikte, tusschen de op elkander geslepen vlakken uitliep.

Bij 37° geprobeerd, gelukte dit wel, er werd echter geen groei waargenomen, bij 45° was na twee dagen de exicator nog gesloten, zooals te zien is aan een methyleenblauwpreparaat, dat ongekleurd blijft, zoolang zuurstof afwezig is. Na twee dagen was er echter nog geen groei op de platen waar te nemen en den derden dag was ook bij deze temperatuur de lucht in den exicator doorgedrongen.

Van het uitzaaiën op platen in exicatoren moest dus worden afgestapt.

Een tweede weg, die gevolgd werd om koloniën te verkrijgen van bacteriën, welke ook na overenting van plaat op plaat, gisting veroorzaakten in vitro, was het maken van gietculturen. Juist, waar gebleken was, dat de gistende bacteriën bij voorkeur

groeien temidden van een vaste stof van fijne structuur, kon men verwachten, dat het zou gelukken groei dezer bacteriën te verkrijgen *in* den agar, waar dit, zooals het scheen, *op* de plaat niet was gelukt.

Van de overgeënte gistingen werden nu verdunningen gemaakt in grondagar met de genoemde anorganische voedingszouten en 1 % saccharose.

De agar werd uitgeschonken in een zoogenaamde ringplaat van BEYERINCK, welke bestaat uit twee glasplaten, gescheiden door een dunne glasring. Het resultaat is dus, dat men tusschen de twee glasplaten verkrijgt een agarschijf, waarin zeer verspreid de bacteriën voorkomen. Doordat de schijf zeer dun is, zijn de koloniën der daarin groeiende bacteriën duidelijk waar te nemen en na aflichten van één der glasplaatjes gemakkelijk met den platinadraad er uit te pikken.

De proef, aldus uitgevoerd met een in den agar sterk verdunde gisting, had tot resultaat, dat na 24 uur bij 60°, in den agarschijf vele gelijkvormige koloniën te zien waren. Het waren lensvormige witte koloniën, met hier en daar uitloopers van samenhangende bacteriën; na verloop van tijd wordt de agar meestal door gasontwikkeling verscheurd.

Deze koloniën in gistingskolfjes gebracht, veroorzaken daarin zeer spoedig een krachtige gisting; deze gistingen uitgezaaid, vertoonen wederom hetzelfde beeld. Deze proef mag echter evenmin als een vaststaand bewijs er voor gelden, dat we hier in deze lensvormige koloniën werkelijk de reincultuur bezitten van de gezochte gistende bacterie; immers op deze wijze te werk gaande nemen we steeds iets van den agar mee, waarin wel de sporen zich kunnen bevinden van niet tot koloniën uitgroeïende bacteriën. Geheel anders wordt het echter, wanneer het gelukt op platen overentingen dezer koloniën te verkrijgen en hiermede de gisting te doen verlopen.

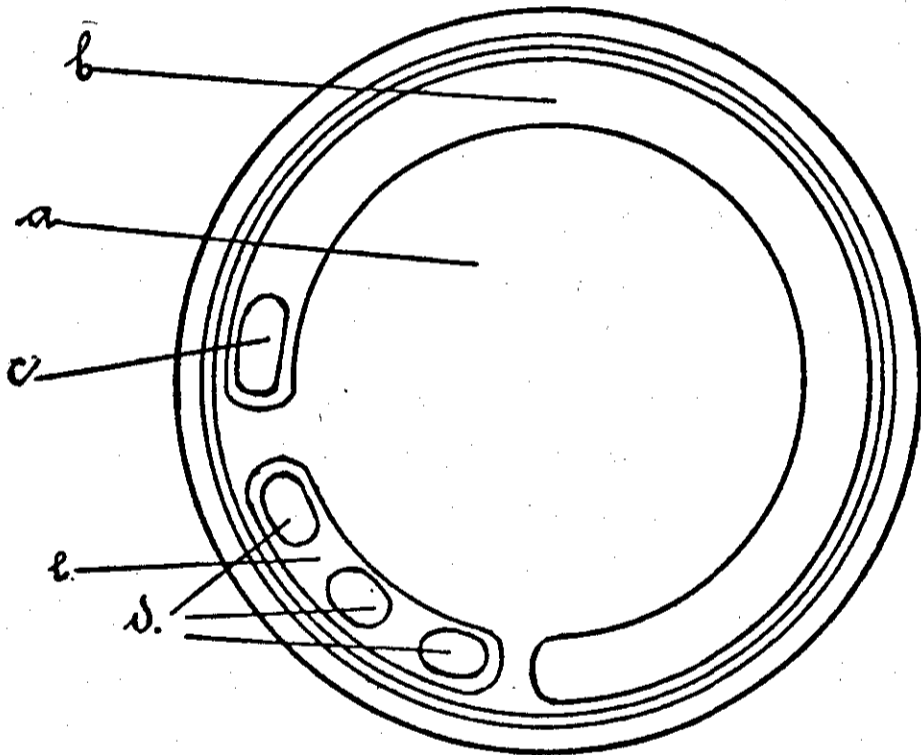
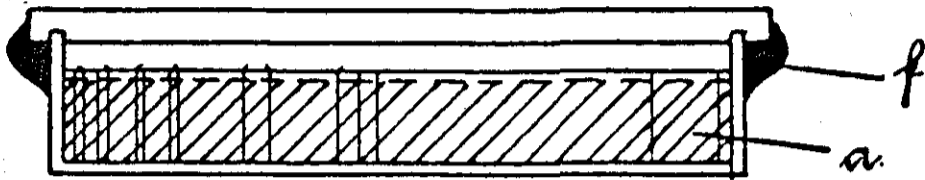
De koloniën in de ringplaten worden daarom uitgestreken

op aerobe agarplaten van dezelfde samenstelling; het valt nu onmiddellijk op, dat we als resultaat dezer overenting dezelfde koloniën krijgen, als we reeds bij directe uitzaaiing der gistingen op deze platen hebben gezien, doch waarvan de overentingen van plaat op plaat geen gisting meer vertoonden. De door uitstrijking van de koloniën in de ringplaten op de aerobe platen verkregen koloniën worden nu op vergisting van saccharose onderzocht; de proef heeft steeds een positief resultaat, wanneer we echter weer verder overenten op aerobe platen, gelukt het op een enkele maal na, niet meer gisting uit de koloniën te verkrijgen. Deze proeven zijn herhaalde malen verricht en leverden steeds dezelfde resultaten; d.w.z. het bleek nu mogelijk om gisting te verkrijgen met op de plaat groeiende koloniën, welke eenmaal uit andere waren overgeënt.

Hoewel met deze proef de tweede veronderstelling, n.l. dat het niet meer gisten van de op aerobe platen overgeënte koloniën een gevolg zou zijn van een onder deze omstandigheden verloren gaan van het vermogen tot anaerobe energiewinning, zeer waarschijnlijk is geworden, leek het mij toch gewenscht nogmaals pogingen in het werk te stellen herhaalde overentingen te verkrijgen op anaerobe platen.

Daar dus gebleken was, dat bij zulke hoge temperaturen de gewone methode om anaerobe bacteriegroei op platen te verkrijgen niet was toe te passen, moest eene andere werkwijze worden gevolgd. Gekozen werd een methode, welke in de vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie was beschreven door KAPSENBERG; hierbij wordt de petrischaal, nadat de uitzaaiing heeft plaats gehad, dichtgeplakt met plasticine (een vette weekblijvende soort stopverf, welke veel voor boetseerwerk wordt gebruikt), terwijl in den agar een schuitje ligt, waarin pyrogalluszuur en kaliloog. Door een scheeven stand van de plaat wordt, voordat de doos is dichtgeplakt, verhinderd, dat de kaliloog bij het pyrogallus-

TEEKENING I



a. agar. b. buis met kaliloog. c. opening waardoor pyrogalluszuur.
d. openingen. e. buis met methyleen-blauwindicator. f. plasticine.

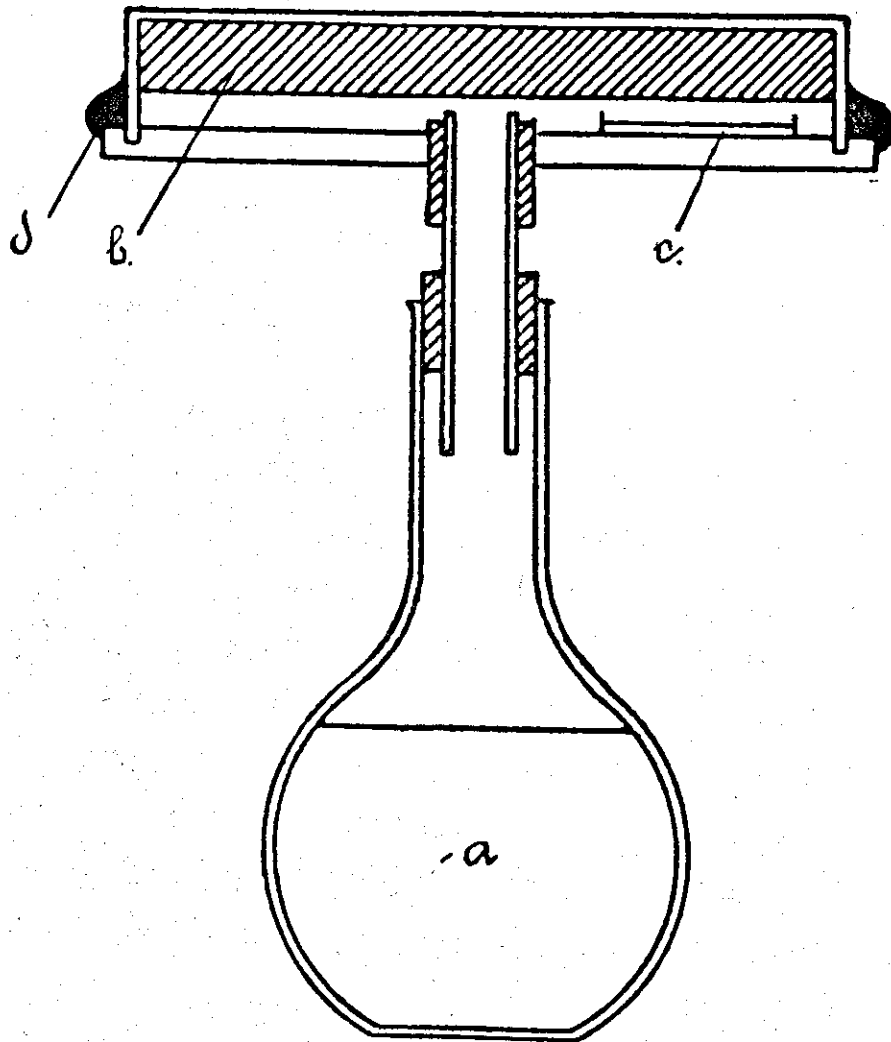
zuur loopt; nadien wordt gemakkelijk door een kleine beweging er voor gezorgd, dat de pyrogalluszure kali de zuurstof uit de doos zal wegnemen, hetgeen gecontroleerd wordt door de aanwezigheid van een tweede schuitje, waarin een methyleenblauwpreparaat als reagens op zuurstof. (Zie teekening I).

Uitzaaiingen op dergelijke platen leverden alle goeden bacteriegroei op, reeds zichtbaar na een verblijf van 12 uur in den thermostaat van 60° . Een groot bezwaar was echter, dat het vrijwel onmogelijk was goeden koloniegroei te verkrijgen, doordat het condensatiewater van het deksel op den agar regende, zoodat het oppervlak altijd nat werd en dus totaal overdekt met den bacteriegroei. Om dit bezwaar te overwinnen, was het noodzakelijk, om evenals dat met de aerobe platen altijd werd gedaan, de doozen omgekeerd in den thermostaat te zetten; men zal echter onmiddellijk inzien, dat dit bij toepassing van deze methode niet mogelijk is, zoodat het noodig was de werkwijze eenigszins te veranderen.

Daartoe wordt in het deksel van een geslepen glasdoos een opening geboord. In een kolfje van 100 cc. inhoud bevindt zich een voldoende hoeveelheid pyrogalluszuur om de aanwezige zuurstof te binden en wanneer nu de uitzaaiing is verricht, wordt de doos omgekeerd, 30 % kaliloog op het pyrogalluszuur in het kolfje geschonken en dit snel door middel van een doorboorde gummistop met de glasdoos verbonden. In de doos bevindt zich weder een schaalte met den indicator op zuurstof, welke bestaat uit gelijke deelen van de volgende oplossingen:

- a. 6 cc. 0,1 N. NaOH tot 110 cc. water.
- b. 3 cc. 0,5 % waterige opl. van methyleenblauw (Grübler) tot 100 cc. water of water-agar.
- c. 6 gram glucose tot 100 cc. water en een kristal thymol. (Zie teekening II).

TEEKENING II



a. kolfje met pyrogalluszure kali. *b.* agar.
c. schaalje met methyleen-blauwindicator. *d.* plasticine.

Uitzaaiingen uit het bezinksel der overgeënte gistingen op deze platen leveren doorschijnende koloniën, meestal niet dikker, dan een enkele laag bacteriën, zij zijn onregelmatig van vorm en hebben eenige neiging tot kruipen. Microscopisch bezien, blijken zij voor het grootste gedeelte te bestaan uit groote sporenlooze staven. Herhaalde overentingen op deze platen slagen alle goed en deze in gistingskolfjes gebracht, vertoonen steeds na één of twee dagen een krachtige gisting. Deze op anaerobe platen groeiende en daarop eenige malen overgeënte koloniën vertoonen dus de gisting van saccharose in reïncultuur en tevens blijkt nu werkelijk, dat we deze reïncultuur in de oorspronkelijke aerobe uitzaaiingen reeds bezaten, doordat de op de anaerobe platen overgeënte bacteriën aeroob uitgezaaid, de reeds bekende korrelige koloniën vertoonen, evenals aerobe uitzaaiingen van de met deze bacteriën verkregen gistende reïnculturen in vitro. In den vervolge zullen de voor de gistingproeven gebruikte reïnculturen dan ook gecontroleerd worden door uitzaaiing op gewone aerobe platen. Photo VI toont de koloniën dezer gistende bacteriën op een aerobe plaat, bestaande uit grondagar met anorganische voedingszouten en 1 % saccharose. Bij deze vergrooting zijn de bacteriën duidelijk zichtbaar; de sporenvorming is dikwijls plaatselijk, vandaar het eenigszins geaderde uiterlijk der koloniën. Dit is tamelijk wisselend met den vochtigheidstoestand van de plaat, hoe droger deze is, des te regelmatig is de vorm en de verdeeling der sporen, op vochtige platen komen vele sporenlooze koloniën voor, welke eenige neiging vertoonen tot kruipen.

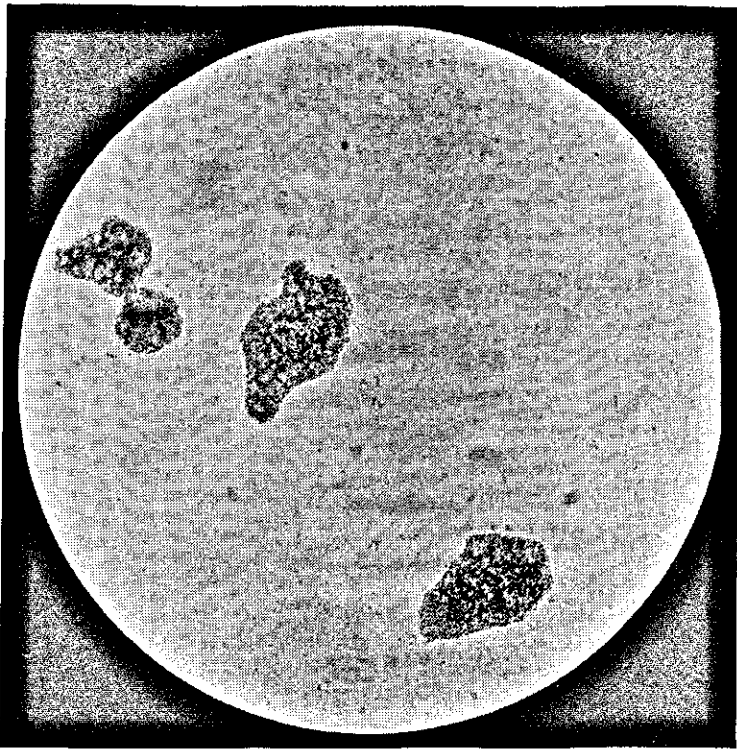
§ 4. Beschrijving van de geïsoleerde gistende bacteriën.

a. *Morphologische eigenschappen:*

vorm der bacteriën
sporen

staaf met afgeronde einden.
in vitro weinig, op aerobe platen
dikwijls vele.

PHOTO VI



Koloniën van *Bac. thermobutyricus* n.sp. op
1 % saccharose-agar (aeroob) 18 uur bij
60° C. Ongekleurd
vergrooting $\pm 20 \times$

plaats van de sporen	eindstandig.
grootte van de sporenlooze staaf	5—8 μ lang, 0,6 μ dik.
grootte van de sporen bevattende staaf	2,5 μ lang, 0,6 μ dik.
grootte van de spore	1,5 μ lang, 0,6 μ dik.
bewegelijkheid ciliën	positief, beneden 45 graden weinig.
met jodium kleurende reservestof	geen
gramkleuring	positief

b. Uiterlijke kenteekenen van den groei op platen en in vitro:

Koloniebeschrijving op:

grondagar-1 % saccharose, aeroob	na 15 uur bij 60° C. 0,5—1 mm. doorsnede, meestal onregelmatig van vorm, gekorrelt door de aanwezigheid van sporen.
grondagar-1 % saccharose, anaeroob	na 24 uur bij 60° C. 1 mm. doorsnede, doorschijnend, zelden sporen.
vleeschagar-1 % glucose 2 % zetmeelagar	weinig verschil met grondagar. kleine onregelmatige koloniën, aan de oppervlakte blijvend, klein oplossingsveld.
aardappel steekcultuur in grondagar-1 % saccharose	weinig groei, geen kleuring. groei overal in den agar doordringend, tenslotte verscheuring van den agar door gasontwikkeling.
groei in bouillon	weinig, geen huidvorming, geen sediment
groei in bouillon glucose	gasontwikkeling
groei in melk	zuurvorming, geen coagulatie.
groei in melk + CaCO ₃	zwakke gisting, geen coagulatie.

c. Physiologische eigenschappen:

eiwitsplitsing	zwak.
diastase	aanwezig.
katalase	ontbreekt.
nitraatreductie	tot nitriet.
indolvorming	ontbreekt.
zuurvorming uit suikers	positief.
gasontwikkeling uit suikers	positief.

optimum temperatuur	60° C.
minimum temperatuur	35—37° C.
maximum temperatuur	68° C.

De reincultuur vertoont gisting van:

glucose	krachtig.
saccharose	zeer krachtig.
lactose	zwak.
galactose	zeer zwak.
laevulose	krachtig.
maltose	krachtig.
dextrine	krachtig.
zetmeel	krachtig.
arabinose	niet.
xylose	niet.
glycol	niet.
glycerine	zeer zwak.
manniet	niet.
glycerinealdehyde	niet.
glycerinezure calcium	goed, doch langzamer dan suikers.
pyrodruivenzure calcium	goed, doch langzamer dan suikers.
Calcium gluconaat	zeer zwak.
Calciumlactaat	niet.

Eenige opmerkingen, omtrent de gebruikte methoden bij het onderzoek naar de verschillende eigenschappen dezer bacteriën.

Het aantoonen der proteolytische enzymen geschiedde weer op caseïneplaten, zooals dit in hoofdstuk III is beschreven en daarnaast in gelatinehoudende gistingskolfjes; de optimum-, minimum- en maximumtemperaturen werden op dezelfde wijze bepaald, als dit geschied is met de zetmeelaantastende bacteriën; de vergistbaarheid van de verschillende koolhydraten en enkele zouten werd nagegaan in gistingskolfjes van 100 cc. inhoud. De zetmeelhydrolyse werd geconstateerd door de uitzaaiing op grondagar met 2 % zetmeel; het viel hierbij op, dat deze hydrolyse veel minder is, dan bij de in het vorige hoofdstuk besproken bacteriën. Niet tegenstaande dat, wordt toch zetmeel zeer krachtig vergist, hierop zal nog nader worden teruggekomen.

§ 5. Kwalitatief onderzoek naar de gevormde producten bij de vergisting van glucose, saccharose en zetmeel.

1. METHODEN VAN ONDERZOEK.

a. Onderzoek naar de aanwezigheid van neutrale vluchtige produkten:

De analyses der gasvormige produkten werden verricht op de reeds in Hoofdstuk II aangegeven wijze, n.l. door opvangen van de gassen boven een verzadigde keukenzoutoplossing en het analyseeren door middel van de genoemde apparaten.

Het was echter wel mogelijk, dat bij de gisting nog vluchtige produkten gevormd zouden worden, welke bij 60° C. met de gassen mee zouden ontwijken en daarna in de keukenzoutoplossing oplossen.

Ten einde, bij aanwezigheid, deze produkten te kunnen aantoonen, werden de gistingsgassen van eenige culturen geleid door twee achter elkander geplaatste waschfleschjes, welke door middel van ijs op 0° waren gekoeld. De reacties op neutrale vluchtige produkten werden nu zoowel met het destillaat van dit water, waardoor de gassen gepasseerd waren, als met het destillaat van de van het calciumcarbonaat afgeschonken gistingsvloeistoffen uitgevoerd. Te verwachten zouden zijn alcoholen en aceton, wellicht ook acetaldehyde.

Op alcoholen werd gereageerd door de herkenning van den geur van butyl- en acethylesters en door toevoeging van benzoylchloride en natronloog, waarbij bij aanwezigheid van alcoholen benzoëzure esters gevormd worden.

Op de aanwezigheid van aldehyden en ketonen wordt gereageerd:

1. Door de reactie van *Bitto*, waarbij een 0,5 % oplossing van nitro-prussidnatrium in zwak alkalische omgeving wordt

toegevoegd, en een roode kleuromslag op de aanwezigheid dezer atoomgroepen wijst.

2. de reactie met het *Schiffschen* reagens, een met sulfiet ontkleurde fuchsineoplossing, welke bij aanwezigheid der meeste aldehyden en ketonen weder de roode kleur vertoont.

3. De reductie van een ammoniakale zilveroplossing, een reactie, welke alleen van toepassing is op aldehyden.

b. Vluchtige zuren.

De gistingsvloeistoffen worden van het Calciumcarbonaat afgefiltreerd en aangezuurd met verdund zwavelzuur of oxaalzuur tot juist blauwkleuring van een congoroodpapiertje en vervolgens gedestilleerd.

In de distillaten wordt gereageerd op:

1. Mierenzuur. Door middel van de reactie van *Serullas* op het met Calciumcarbonaat geneutraliseerde en drooggedampte destillaat. Deze reactie berust op de reductie van mercurizouten door mierenzuur. Toegevoegd worden gelijke deelen van een verdunde oplossing van mercurichloride en natriumacetaat. Een witte troebeling van calomel wijst op de aanwezigheid van mierenzuur. Een tweede reactie, die werd toegepast bestaat in de reductie van zilvernitraat tot metallisch zilver.

2. Azijnzuur. Door het drooggedampte, met calciumcarbonaat geneutraliseerde destillaat bloot te stellen aan droge destillatie en den damp op te vangen in water, waarin nu gereageerd wordt op aceton door middel van vanilline en kaliumhydroxide. Een roode ringreactie bewijst de aanwezigheid van aceton, dus van azijnzuur. Deze reactie is voor azijnzuur specifiek en zeer gemakkelijk uit te voeren. De gevoeligheid gaat volgens opgave van *SCHOORL* tot 1 à 2 mgr. azijnzuur.

3. Boterzuur. Door middel van den ananasgeur der aethyl-ester, welke wordt bereid, door aan het destillaat of aan het met

calciumcarbonaat geneutraliseerde en drooggedampte destillaat in een weinig water, sterk zwavelzuur en een paar druppels aethylalcohol toe te voegen.

Een tweede reactie berust op de eigenschap van het calciumzout om bij 80° C. minder oplosbaar te zijn, dan bij lage temperatuur, een eigenschap, waarmee dit zout zich onderscheidt van het isobutyraat.

4. Propionzuur. Op de aanwezigheid van dit zuur werd gereageerd, door het destillaat met loodoxyde droog te dampen, het zout daarna uit te trekken met water van 40° C. en van de overmaat loodoxyde af te filtreeren. Het filtraat wordt nu verder verhit en bij aanwezigheid van propionzuur slaat nu in de warmte het basisch loodzout $[Pb (C_3H_5O_2)_2, PbO]$ neer.

c. *Niet vluchtige zuren* (te verwachten waren barnsteen- en melkzuur).

Nadat de vluchtige zuren zijn verwijderd, door de gistingsvloeistoffen, na aanzuren met verdund zwavelzuur, aan stoomdestillatie te onderwerpen, worden de overblijvende vloeistoffen 48 uur lang met aether geperforeerd. Hierna wordt de aether afgedestilleerd en met water nog eenigen tijd doorgekookt. In de op deze wijze verkregen waterige oplossing der niet vluchtige zuren wordt nu gereageerd op:

1. Barnsteen- en melkzuur. Door toevoeging van ferrichloride; bij aanwezigheid van dit zuur ontstaat een lichtbruine neerslag van ijzersuccinaat. Tevens wordt toegepast de microchemische herkenning van het loodzout, waartoe een druppel der waterige oplossing der zuren op een voorwerp glas gelegd wordt en verhit, terwijl een kristal loodacetaat is toegevoegd. Bij aanwezigheid van propionzuur ontstaan, mits geen hinderlijke bijmengsels de kristallisatie verhinderen en dus eerst microsublimatie moet worden toegepast, ruitvormige kristallen van loodsuccinaat.

2. Melkzuur. Hierop wordt eveneens micro-chemisch gereageerd. Een druppel der waterige oplossing der zuren wordt daartoe op een voorwerpglas verhit en een kristal zink- of kobaltacetaat toegevoegd. De kristalzuilen dezer lactaten zijn gemakkelijk te herkennen.

d. Andere produkten.

De aanwezigheid van andere produkten zal worden nagegaan, indien bij de kwantitatieve analyses blijkt, dat nog een belangrijk tekort aanwezig is.

2. DE RESULTATEN DER KWALITATIVE ANALYSES BIJ DE VERGISTING VAN GLUCOSE, SACCHAROSE EN ZETMEEL.

Het resultaat der bovengenoemde kwalitatieve analyses, leverde voor de vergisting dezer drie koolhydraten geen verschillen op. Gevonden werd waterstof, koolzuur en geen neutrale vluchtige produkten. Van de aanwezige vluchtige zuren was de reactie op boterzuur zeer sterk positief, de reactie op azijnzuur positief en op propionzuur zwak positief, terwijl van mierenzuur slechts sporen aanwezig waren. Onoplosbare verbindingen werden niet gevonden en als niet-vluchtig zuur bleek melkzuur aanwezig, terwijl de reactie op barnsteenzuur in alle gevallen negatief uitviel.

Slechts de kwantitatieve reactie kan uitmaken of de gevonden hoeveelheid koolzuur slechts afkomstig is van het toegevoegde calciumcarbonaat of dat deze stof ook werkelijk gistingsprodukt is.

§ 6. Kwantitatieve analyses ¹⁾.

1. METHODEN VAN ONDERZOEK.

a. Waterstof.

De hoeveelheid waterstof werd gemeten door de gistingsgassen, welke eenige waschflesschen met loog hadden gepasseerd, te leiden in verdeelde buretten of klokken en het volume, rekening houdend met temperatuur en druk, af te lezen.

b. Koolzuur.

De gistingsgassen worden dus, zooals gezegd, geleid door waschflesschen met loog met het doel het gevormde koolzuur te binden. Daartoe zijn twee groote en één kleine waschflesch achter elkander geplaatst en gevuld met natronloog van bekende sterkte. Deze loog is bereid door pijpjes natriumhydroxide met uitgekookt gedestilleerd water af te wasschen, en daarin op te lossen, zoodat zij werkelijk carbonaatvrij is. De titer wordt voor de proef vastgesteld en deze mag van het derde fleschje, dat ter controle dient, na de gisting niet zijn veranderd. De inhoud der beide andere waschflesschen wordt na afloop der proef bijeen gevoegd en met een overmaat Bariumchloride met 0,1 N. zoutzuur op phenolphtaleïne als indicator getitreerd, waarbij dus de hoeveelheid vrije natronloog wordt gevonden en het verschil der titercijfers voor en na de proef, dus de hoeveelheid aan de loog gebonden koolzuur, geven. Voordat de loog uit de waschflesschen wordt getitreerd, wordt de gistingsvloeistof gedurende een uur op 100° C. in een waterbad verhit en de uitstroomende gassen door de waschflesschen geleid, waardoor dus de hoeveelheid in de vloeistof achterblijvende koolzuur wordt uitgedreven en mede aan de loog gebonden.

¹⁾ Hierbij is gebruik gemaakt van de vele methoden, aangegeven door DONKER in zijn proefschrift over de boterzuur-, butylalcohol- en aceton-gistingen.

Deze methode mocht worden toegepast, nadat de kwalitatieve analyse geleerd had, dat geen neutrale vluchtige verbindingen aanwezig waren.

Op deze wijze vinden we de totale hoeveelheid gevormd koolzuur, welke dus bestaat uit de som van het uit het calciumcarbonaat afkomstige en het eventueel als gistingsprodukt uit de koolhydraten gevormde koolzuur.

Teneinde de hoeveelheid van het krijt afkomstig koolzuur te weten te komen, is een bekende hoeveelheid calciumcarbonaat aan de gistingen toegevoegd en na afloop der proef wordt het bezinksel afgefiltreerd en gedroogd. Van het gedroogde bezinksel der gistingen wordt nu 1 gram afgewogen en hiervan de hoeveelheid calciumcarbonaat bepaald, door een overmaat zuur van bekende sterkte toe te voegen en daarna, nadat eenigen tijd is gekookt, met 0,1 N. loog terug te titreeren.

Uit de op deze wijze gevonden voor de neutralisatie der gevormde zuren verbruikte hoeveelheid calciumcarbonaat, kan de daarbij ontstane hoeveelheid koolzuur door berekening worden gevonden. Het verschil tusschen dit bedrag en het totale, levert de hoeveelheid koolzuur, welke als gistingsprodukt uit de koolhydraten is gevormd.

c. Vluchtige zuren.

De gistingsvloeistof wordt van het calciumcarbonaatbezinksel afgefiltreerd en het op het filter achterblijvende carbonaat nagewasschen, waarna het totaal volume van het filtraat wordt bepaald. 100 cc. hiervan worden met verdund oxaalzuur aangezuurd tot juist blauwkleuring optreedt van een congoroodpapiertje en het oxalaat afgefiltreerd en nagewasschen. Het filtraat wordt aan stoomdestillatie onderworpen; het volume wordt hierbij langzamerhand verkleind tot 100 cc. en daarna constant gehouden.

Het destillaat wordt opgevangen in een verdunde loog van

bekende sterkte en nadat ongeveer anderhalve liter is overgegaan, de hoeveelheid zuur door terugtitratie met phenolphthaleïne als indicator, bepaald.

De componenten, waaruit het totaal van dit mengsel bestaat, kunnen worden gevonden door gebruik te maken van de door BOEKHOUT en DE VRIES verbeterde methode van Duclaux, welke hierop berust, dat de fractieverschillen voor telkens 1 cc. destillaat uit een mengsel van 110 cc. in constant volume gedistilleerd zuur, uitgedrukt in percenten van de hoeveelheid nog in de destillatiekolf achterblijvend zuur, voor de verschillende zuren constante grootheden zijn. Daar de fractietiters zijn samengesteld uit de som der fractietiters der verschillende zuren en elk daarvan zich gedraagt, als ware het alleen aanwezig, kunnen uit een aantal titercijfers van telkens 10 cc. destillaat, bijv. van de eerste, de vijfde en de tiende destillatie, voor drie verschillende zuren, drie vergelijkingen met drie onbekenden opgesteld worden, waaruit in dit geval de hoeveelheden azijnzuur, boterzuur en propionzuur kunnen worden berekend.

Daar de kwalitatieve analyse de aanwezigheid van melkzuur in de gistingsvloeistoffen had aangetoond, ondervinden we dus bij de kwantitatieve analyse de moeielijkheid, dat dit zuur bij de stoomdestillatie ook eenigszins vluchtig is en dus in de uitkomsten der analyse van de vluchtige zuren, een fout doet ontstaan. Volgens SCHOORL is de vluchtigheid echter zeer gering en mag dus worden verwaarloosd. Ter controle werd door mij een hoeveelheid melkzuur van Merck aan destillatie bij constant volume onderworpen; ik vond hierbij voor de achtereenvolgende titercijfers van telkens 10 cc. uitgedrukt in % van het in de kolf achterblijvend zuur respectievelijk: 0.31, 0.2, 0.2, 0.19, 0.13, 0.11, 0.09, 0.073, 0.054, 0.054 percent. Uit deze cijfers zien we, dat dit inderdaad zeer weinig is en de fout dan ook zeker valt binnen de grenzen der waarnemingsfouten

bij de bepaling van drie verschillende vluchtige zuren.

Het sterke dalen van deze titercijfers wijst er bovendien op, dat we in den aanvang hoofdzakelijk onzuiverheden overdestilleeren.

d. Niet vluchtige zuren.

Daar de kwalitatieve analyses bewezen hadden, dat we slechts met melkzuur hebben te doen, wordt de hoeveelheid van dit zuur gevonden door het verschil aan totaal gevormd zuur en de hoeveelheid niet vluchtig zuur. Door een calciumbepaling in de gistingsvloeistof vinden we de totale hoeveelheid calcium aan zuren gebonden, terwijl uit het titercijfer voor het totaal der vluchtige zuren, de hoeveelheid calcium daaraan gebonden valt te berekenen. Het verschil tusschen deze beide calciumcijfers bestaat dus uit de hoeveelheid calcium aan de niet vluchtige zuren gebonden, waaruit dus het bedrag aan melkzuur valt af te leiden. In de hoeveelheid overgebleven calciumcarbonaat, door titratie bepaald, bezitten we een controle. Een enkele maal werd daarnaast nog de hoeveelheid melkzuur bepaald in een aetherperforaat van een bekende hoeveelheid gistingsvloeistof, welke eerst door stoomdestillatie van de vluchtige zuren was bevrijd, door middel van de methode van ULZER en SEIDEL.

Hierbij wordt het melkzuur in alkalische omgeving met behulp van kaliumpermanganaat tot oxaalzuur geoxydeerd, dit zuur als calciumoxalaat neergeslagen en de hoeveelheid daarvan bepaald door titratie met 0,1 N. kaliumpermanganaat.

e. Andere stoffen.

Het bleek bij de bepaling van de hoeveelheid calciumcarbonaat in het bezinksel, dat er nog een andere onopgeloste stof moest zijn gevormd. Bij aanzuren van het krijtneerslag, teneinde daarna met loog terug te titreeren, bleek dat de krijtdeeltjes aaneengekit waren door een stof, welke, nadat de car-

bonaatdeeltjes daarvan waren bevrijd, door ze tegen den rand van het bekeerglas te wrijven, de zoutzure vloeistof geheel troebel maakte en op het moment van de neutralisatie bij de titreering uitvlokte.

De gomachtige stof leverde na droging en verbranding vrijwel geen asch op, bij koken met sterk zoutzuur aan een terugvloeikoeler trad echter geen fehlingreactie op. De hoeveelheid werd bepaald, door het neerslag, dat ontstaat bij de neutralisatie van het in een overmaat zoutzuur opgeloste krijtbezinksel, af te filtreren, te drogen en te wegen.

f. Bepaling van de onvergist gebleven koolhydraten.

Hiertoe wordt een bekende hoeveelheid van de gistingsvloeistoffen, zoo noodig na inversie, onderworpen aan een jodometrische titratie volgens SCHOORL. De hoeveelheid onvergist gebleven zetmeel wordt bepaald door na indamping en inversie met takadiastase of door middel van zoutzuur, de vloeistof met 15 gram persgist der Ned. Gist en Spiritusfabriek te vergisten en de hoeveelheid gevormde suiker te berekenen uit de koolzuurproductie, zooals dit reeds in hoofdstuk III is uiteengezet.

Daarnaast wordt een kleine hoeveelheid van het calciumcarbonaatbezinksel, na te zijn afgefiltreerd, gedroogd en gewogen, met een weinig water opgekookt, teneinde zich door middel van een verdunde jodiumoplossing er van te overtuigen dat geen onopgelost zetmeel meer is overgebleven. Deze reactie valt bij de beide zetmeelgistingen negatief uit, zoodat geen nadere bepaling noodig is.

2. RESULTATEN VAN DE TOEGEPASTE KWANTITATIEVE ANALYSES.

a. De vergisting van saccharose.

Aan drie liter cultuurvloeistof werd steeds 100 gram der koolhydraten toegevoegd en geënt met eenige druppels uit het bezinksel van een gistend kolfje met de ge-

controleerde reincultuur der gistende thermophile bacterie. ¹⁾

De resultaten van de vergisting van saccharose, uitgevoerd in duplo, zijn vereenigd in onderstaande tabel (hoeveelheden in grammen):

	cultuur I	cultuur II
hoeveelheid vergiste saccharose	98,2	96,6
waterstof	1,7	1,8
totaal koolzuur	55,4	54,6
koolzuur uit carbonaat	15,0	14,8
koolzuur uit de saccharose	40,4	39,8
totaal Ca in oplossing	13,0	12,5
Ca gebonden aan vluchtige zuren	10,7	10,3
Ca gebonden aan melkzuur	2,3	2,2
Ca in krijtbezinksel	25,2	25,5
totaal Ca als carbonaat gegeven	38,8	38,8
totaal Ca teruggevonden	38,2	38,0

Het onderzoek naar de samenstelling van het mengsel der vluchtige zuren wordt uitgevoerd met de door BOEKHOUT en DE VRIES verbeterde methode van DUCLAUX. Hierbij wordt van 110 cc. van het zuurmengsel telkens 10 cc. afgetitreerd, waarna wederom 10 cc. water wordt toegevoegd, zoodat het volume in de destillatiekolf constant blijft. Elke fractie van 10 cc. wordt nu getitreerd, welke titercijfers zijn vereenigd in onderstaande tabellen.

Cultuur I.

No. v. d. dest.	titer cc. N/10	percentage van het destillaat
1	18,9	20,3
2	33,8	36,4
3	46,7	50,3
4	58,0	62,5
5	65,8	71,0
6	71,9	77,6
7	78,1	84,3
8	83,8	90,4
9	88,5	95,5
10	92,7	100,0

¹⁾ De gisting bereikt den tweeden dag een snelheid van 400 cc. waterstof per uur en is na 8 dagen uitgest.

Cultuur II.			percentage door B. en d. Vr. gevonden voor boterzuur.
1	9,7	20,0	19,4
2	16,9	35,0	36,0
3	23,5	48,6	50,8
4	29,0	60,1	63,3
5	33,6	69,4	74,1
6	37,4	77,4	82,8
7	40,7	84,2	89,7
8	43,5	90,1	94,8
9	46,0	95,3	98,2
10	48,3	100,0	100,0

Uit deze cijfers blijkt al wel, dat het vluchtig zuur voor het grootste gedeelte uit boterzuur moet bestaan, toch wijst het sterkere dalen der titercijfers op de aanwezigheid van andere zuren. Uit de kwalitatieve analyse weten we, dat deze azijnzuur en een weinig propionzuur zijn.

Daar de titercijfers dezer zuren uitgedrukt in procenten van het in de kolf achterblijvend zuur voor elk afzonderlijk een constante waarde vertegenwoordigen en elke gevonden titer bestaat uit de som der titercijfers der componenten, welke zich gedragen, als waren zij elk alleen aanwezig, is het mogelijk met behulp der uitkomsten van drie niet te dicht bij elkaar liggende titercijfers drie vergelijkingen met de drie zuren als onbekenden op te stellen, waarvoor door BOEKHOUT en DE VRIES een formule is uitgewerkt.

Met behulp dezer vergelijkingen vinden we uit bovenstaande titercijfers de volgende waarden voor de hoeveelheden boterzuur, azijnzuur en propionzuur, welke echter slechts bij benadering de juiste hoeveelheden aangeven.

		Cultuur I	Cultuur II
boterzuur	cc. N/10	87,8	45,8
azijnzuur	„	27,4	14,3
propionzuur	„	4,0	2,1

Wanneer we deze cijfers als verhoudingsgetallen gebruiken, is het dus mogelijk, ongeveer de totale hoeveelheden der verschillende zuren uit te rekenen. Voor de uit saccharose gevormde produkten vinden we nu: (hoeveelheden in grammen)

	Cultuur I	Cultuur II
vergiste suiker	98,2	96,6
koolzuur	40,4	39,8
waterstof	1,7	1,8
boterzuur	34,3	33,4
azijnzuur	7,3	7,0
propionzuur	1,4	1,3
melkzuur	11,1	9,9
onoplosbaar koolhydraat	6,2	6,4

De koolstofbalans, opgemaakt voor de beide duplo's levert onderstaande cijfers: (hoeveelheden in grammen)

	Cultuur I	Cultuur II
koolstof uit koolzuur	11,0	10,9
„ „ boterzuur	18,7	18,2
„ „ azijnzuur	2,9	2,5
„ „ propionzuur	0,7	0,6
„ „ melkzuur	4,4	3,7
„ „ onoplosbaar koolhydraat, berekend als polimeer van suiker	2,6	2,7
totaal gevonden koolstof	40,3	38,6
koolstof in vergiste hoeveelheid suiker...	41,3	40,7

b. De vergisting van glucose.

Gevonden werden de volgende waarden: (hoeveelheden in grammen)

	Cultuur I	Cultuur II
vergiste glucose	95,8	96,9
waterstof	0,9	0,9
totaal koolzuur	34,4	35,1
koolzuur uit carbonaat	19,0	19,3
koolzuur uit de glucose	15,1	15,8

	Cultuur I.	Cultuur II.
Ca in oplossing	16,5	16,1
Ca gebonden aan vluchtig zuur	9,8	10,2
Ca gebonden aan melkzuur	6,7	6,6
Ca in bezinksel	21,5	22,0
totaal Ca als carbonaat gegeven	38,8	38,8
totaal Ca teruggevonden.....	38,0	38,1

Met de vluchtige zuren van cultuur I werd nu wederom een Duclauxbepaling verricht, deze leverde onderstaande titercijfers:

No. v. d. destillatie	titer cc. I/10 N.	percentage van het destillaat.
1	10,4	19,8
2	19,0	36,1
3	26,0	49,6
4	31,8	60,6
5	37,2	70,8
6	40,9	77,9
7	44,5	84,7
8	47,5	90,5
9	50,1	95,4
10	52,5	100,0

Uit deze titercijfers zien we een volkomen overeenstemming met de percentages der titercijfers van de overeenkomstige bepaling bij de saccharosegistingen. De samenstelling van het mengsel der vluchtige zuren is dus vrijwel gelijk. Door middel van de drie vergelijkingen van BOEKHOUT en DE VRIES worden nu weer de componenten gevonden, welke getallen weder als verhoudingscijfers worden ingevoerd bij de berekening der totale hoeveelheden der verschillende zuren afzonderlijk.

Gevonden wordt nu uit de vergisting van de glucose, (deze berekening is alleen uitgevoerd met cultuur I, omdat de overige gevonden cijfers reeds geleerd hebben, dat er tusschen beide duplo's overeenstemming bestaat), (hoeveelheden in grammen):

glucose vergist	5,8
waterstof	0,9
koolzuur	15,4
boterzuur	31,3
azijnzuur	6,7
propionzuur.....	1,2
melkzuur	29,8
onoplosbaar koolhydraat	5,5

De koolstofbalans dezer gisting levert de volgende cijfers, (hoeveelheden in grammen):

hoeveelheid koolstof uit:

koolzuur	4,2
boterzuur	17,1
azijnzuur	2,7
propionzuur.....	0,6
melkzuur	11,9
onoplosbaar koolhydraat, berekend als poli- meer van suiker	2,3
<hr/>	
totaal gevonden	38,8
koolstof in de vergiste suiker.....	40,3

c. De vergisting van zetmeel.

Uit twee duploculturen werd gevonden, (hoeveelheden in grammen):

	Cultuur I	Cultuur II
hoeveelheid vergiste zetmeel	46,4	46,0
waterstof	0,4	—
totaal koolzuur	21,9	20,2
koolzuur uit carbonaat	6,6	6,4
koolzuur uit het zetmeel	15,3	13,9
Ca in oplossing	6,5	6,5
Ca aan vluchtig zuur gebonden	6,2	6,1
Ca aan melkzuur gebonden	0,3	0,4
Ca in krijtbezinksel	4,8	4,7
totaal Ca als carbonaat gegeven	11,7	11,7
totaal Ca teruggevonden.....	11,3	11,2

Met de vluchtige zuren van cultuur I wordt nu weer een Duclauxbepaling uitgevoerd. Deze leverde onderstaande cijfers:

No. v. d. destillatie	titer cc. 1/10 N.	percentage van het destillaat
1	13,9	20,0
2	25,2	36,2
3	34,5	49,6
4	42,2	63,6
5	48,9	70,3
6	54,9	79,0
7	58,6	86,0
8	62,7	90,2
9	66,7	96,1
10	69,5	100,0

Uit deze cijfers volgt dus, dat wederom de samenstelling van de vluchtige zuren vrijwel overeenstemt met die der suikergistingen.

Met de drie zelfde vergelijkingen wordt nu weer elk der zuren berekend en de op deze wijze gevonden waarden als verhoudingsgetallen gebruikend, kunnen de totale hoeveelheden der drie vluchtige zuren worden gevonden. De berekening wordt weer alleen uitgevoerd met cultuur I, omdat de overige gevonden waarden reeds de overeenstemming der beide duplogistingen hadden aangetoond. Gevonden wordt nu uit het vergiste zetmeel (hoeveelheden in grammen):

vergiste zetmeel	46,4
waterstof	0,4
koolzuur	15,3
boterzuur.....	19,8
azijnzuur	4,2
propionzuur.....	0,2
melkzuur	1,3
onopgelost koolhydraat	2,6

De koolstofbalans dezer gisting levert onderstaande cijfers, (hoeveelheden in grammen):

hoeveelheid koolstof uit:	
koolzuur	4,2
boterzuur	10,8
azijnzuur	1,7
propionzuur.....	0,1
melkzuur	0,7
onoplosbaar koolhydraat, berekend als poli- meer van suiker	1,1
<hr/>	
totaal gevonden	18,6
koolstof in de vergiste zetmeel.....	19,4

§ 7. Identificatie der thermophile gistende bacterie.

Daar we nu de voornaamste eigenschappen dezer gistende bacteriën kennen, is het mogelijk tot de identificatie daarvan over te gaan. Zooals reeds in Hoofdstuk I is beschreven, vinden we in de literatuur eenige mededeelingen omtrent deze thermophile gistingen en zijn ook reeds bacteriebeschrijvingen gegeven. De door SCHARDINGER gegeven beschrijving is de meest volledige. De door hem geïsoleerde bacterie vergistte dextrine tot boterzuur en melkzuur; de gisting was echter niet zeer vlug (50 gram dextrine waren bij 60° C. pas na vier weken uitgelist) en blijkbaar streng anaeroob, daar hij de vloeistoflaag met parafineolie afsluit. De bacterie wordt geïsoleerd op anaerobe platen en vertoont lichtgele koloniën. Deze eigenschappen maken het weinig waarschijnlijk, dat de door SCHARDINGER gevonden gistende bacterie identiek is met de door mij geïsoleerde, hoewel dit met zekerheid moeilijk valt te zeggen, omdat de mededeelingen van SCHARDINGER omtrent deze bacterie zeer onvolledig zijn.

De door SCHILLINGER en door SAMES geïsoleerde gistende bacteriën vertoonden achteruitgang bij een temperatuur boven 58°, zoodat deze zeker niet identiek zijn met de door mij gevondene. Wel is het zeer waarschijnlijk, dat zij bovenstaande

thermophile boterzuurgisting in ruwcultuur hebben gehad.

Daar dus uit het in de vorige paragrafen behandelde gebleken is, dat naast koolzuur, boterzuur het hoofdprodukt dezer thermophile gisting is, heb ik gemeend deze bacterie te moeten aanduiden met den naam van *Bac. thermo-butyricus*, in overeenstemming met de systematische indeeling der Bacillaceae volgens de Soc. of american bacteriologists.

§ 8. Een vergelijkend onderzoek naar de vergisting van glucose, saccharose, gelijke deelen glucose en laevulose, laevulose, maltose en zetmeel.

Als resultaat van de kwantitatieve analyses van de eindprodukten der saccharose, glucose en zetmeelgistingen was gebleken, dat de samenstelling der vluchtige zuren dezelfde was, doch dat er een groot verschil bestond in de verhouding der hoeveelheden koolzuur, vluchtig zuur en niet vluchtig zuur. Zoo blijkt, dat de hoeveelheid waterstof bij de saccharosegisting beduidend veel grooter is, dan bij de andere gistingen, terwijl de hoeveelheden koolzuur en vluchtige zuren bij de saccharosegisting en de zetmeelgistingen veel grooter zijn dan bij de glucosegisting, waar meer melkzuur wordt gevormd.

Om deze redenen werd nog een proef gedaan over de gisting van saccharose, glucose, gelijke deelen glucose en laevulose, laevulose en maltose.

Bepaald werden nu alleen de gevormde hoeveelheden waterstof, koolzuur, en het aan melkzuur en aan de gezamenlijke vluchtige zuren gebonden Calcium.

De resultaten dezer gistingen zijn vereenigd in onderstaande tabel, waarin ook de overeenkomstige cijfers voor de zetmeelgisting, verkregen uit de reeds beschreven proeven, zijn ingelascht.

	hoeveelh. vergist	waterst.	koolzuur	calcium aan vl. z.	Calcium aan niet vl. z.
saccharose I.....	49,1	0,8	20,2	5,4	1,0
saccharose II.....	50,0	0,8	21,0	5,6	1,1
glucose I.....	48,9	0,4	8,0	5,4	3,0
glucose II.....	49,1	0,4	8,7	5,1	3,0
laevulose I.....	48,4	0,5	10,2	5,6	2,1
laevulose II.....	49,1	—	10,4	—	—
glucose-laevulose I..	47,8	0,6	7,8	5,4	2,7
glucose-laevulose II..	47,1	0,5	7,3	5,2	2,8
maltose I.....	47,2	0,4	8,7	4,4	3,0
maltose II.....	46,9	0,4	8,8	4,1	2,8
zetmeel I.....	46,4	0,4	15,3	6,2	0,3
zetmeel II.....	46,0	—	13,9	6,1	0,4

Uit deze cijfers zien we, dat de vergisting van glucose, gelijke deelen glucose en laevulose en van maltose geen belangrijke verschillen opleveren. Zeer afwijkend daarentegen zijn de vergistingen van saccharose en van zetmeel, waarbij veel meer koolzuur en veel minder melkzuur ontstaat, terwijl de hoeveelheden der gezamenlijke vluchtige zuren ongeveer overeenkomen met die der overige gistingen.

Hieruit moet dus de conclusie getrokken worden, dat de vergisting van saccharose en van zetmeel niet wordt ingeleid door een eenvoudige inversie.

Dat in ruwcultuur de verhouding koolzuur tot waterstof 1 : 1 werd gevonden, is een gevolg van het feit, dat bij de saccharosegisting de hoeveelheden van beide gassen zooveel grooter zijn, terwijl bij de zetmeelgisting de meeste waterstof in den aanvang van het proces wordt gevormd.

Wanneer we zetmeel in de cultuurvloestof zoowel met *Bac. thermo-butyricus* als met *Bac. thermo-amylolyticus* enten, zien we weinig verschil in de uitkomsten optreden, wel komt de gisting spoediger op gang.

De snelle oplossing van het zetmeel door de laatste bacterie is dus oorzaak, dat de eerste spoediger gemakkelijk vergistbaar materiaal aantreft, doch het betrekkelijk langzaam ontstaan daarbij van maltose verhindert, dat de gisting het beeld eener maltosegisting vertoont.

§ 9. Enkele waarnemingen omtrent het chemisme dezer gistingen.

Zonder dat het in de bedoeling kan liggen, binnen de grenzen van dit proefschrift een studie te betrekken over het chemisme der thermophile boterzuurgisting, is het toch wel van belang, eenige waarnemingen mede te deelen over de proeven verricht, aangaande de vergisting van het calciumzout van pyrodruivenzuur en het aantoonen van acetaldehyde in deze gistingen door middel van een z.g. „Abfangverfahren”.

Door NEUBERG is voor het eerst aangetoond, dat de alcoholgist in staat is ketonzuren in aldehyde en koolzuur te splitsen. Deze eigenschap, welke de levende cel, zoowel als het daaruit verkregen perssap vertoont, wordt toegeschreven aan het enzym „carboxylase”. In verband hiermede is door NEUBERG een theorie opgesteld voor het chemisme der alcoholische gisting, waarbij pyrodruivenzuur als tusschenprodukt wordt aangenomen, welk zuur door de carboxylase in acetaldehyde en koolzuur wordt gesplitst.

Nadien zijn door verscheidene onderzoekers voor verschillende bacteriële gistingen gistingsschema's opgesteld, welke zijn gebaseerd op de theorie, dat het molecuul hexose eerst in twee triosen wordt gesplitst, waarvan een gedeelte zich tot melkzuur stabiliseert en een ander deel aan een verdere dissimilatie is onderworpen, waaronder splitsing tot mierenzuur en acetaldehyde of tot pyrodruivenzuur en waterstof wordt

gerekend. Het molecuul pyrodruivenzuur zal dan weder tot acetaldehyde en koolzuur uiteenvallen. In beide gevallen is het acetaldehyde uitgangspunt voor verdere omzettingen.

NEUBERG en REINFURTH hebben voor de eerste maal aangetoond, dat in de alcoholische gisting acetaldehyde kan ontstaan door deze stof „weg te vangen” door middel van sulfiet, waardoor deze atoomgroep wordt gebonden volgens de vergelijking: $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{SO}_3\text{Na} + \text{NaOH}$.

Op deze wijze werd door hen 75,45 % van de toegevoegde hoeveelheid suiker teruggevonden.

Nadien is het aan NEUBERG en medewerkers en door vele andere onderzoekers gelukt door middel van deze methode en ook door toepassing van nog een tweede „abfangverfahren”, de z.g. dimedonmethode van NEUBERG en REINFURTH, acetaldehyde aan te toonen in zeer vele bacteriële gistingen.

Bij de thermophile boterzuurgisting ontstaat melkzuur, waterstof en koolzuur en tevens is het bekend, dat pyrodruivenzure calcium een vergistbaar produkt is.

In analogie met de voor andere gistingen opgestelde theorieën, kan men dus veronderstellen, dat bij de thermophile gisting het molecuul hexose uiteenvalt in twee triosen, waarvan zich een klein gedeelte tot melkzuur stabiliseert. Een ander deel zou dan uiteenvallen in pyrodruivenzuur en waterstof, terwijl dit zuur op zijn beurt gesplitst wordt in koolzuur en acetaldehyde en dit laatste produkt voor het grootste gedeelte tot boterzuur wordt gecondenseerd.

Naar aanleiding van deze overwegingen werden nu proeven verricht over de vergisting van pyrodruivenzure calcium. Daar de bacteriën echter zonder suiker slecht groeien, was het noodig voor een goede gisting van dit zout, deze eerst in een saccharosegisting aan te kweken en wanneer dit proces vrijwel geheel is afgelopen, de cultuurvloeistof af te schenken en deze te ver-

vangen door die met het pyrodruivenzure zout. Op deze wijze gelukte het steeds goede gistingen te verkrijgen; een bezwaar was echter de vrij sterke caramellisatie bij 60° C. en waarschijnlijk daardoor het niet uitgisten van de cultuur.

Kwalitatieve analyses van verschillende gistingen toonden aan, dat gevormd werd koolzuur, azijnzuur, mierenzuur en een weinig propionzuur. Waterstof werd niet gevormd, zooals ook de theorie verlangt, *doch boterzuur kon niet worden aangetoond*, ook niet, nadat door oxydatie met permanganaat het mierenzuur was weggenomen en door gefractioneerde distillatie de hoeveelheid azijnzuur was verminderd.

Hier vinden we dus een totaal verschillend beeld met de suikergistingen, zoodat het molecuul pyrodruivenzuur, althans in dezelfde structuurchemische samenstelling als in het gegeven calciumzout, bezwaarlijk als een tusschenprodukt kan worden beschouwd.

Tevens werden enkele proeven gedaan, om te trachten door middel van natriumsulfiet in de gistingen van glucose, saccharose en pyrodruivenzure calcium, acetaldehyde aan te toonen ¹⁾.

De proef was als volgt ingericht:

Zes kolven van een halve liter inhoud worden gevuld met de normale cultuurvloeistof en saccharose ter vergisting gegeven. Geënt wordt met de reincultuur van *Bac. thermobutyricus* en nadat deze saccharosegistingen zijn uitgegist, worden nieuwe cultuurvloeistoffen toegevoegd. In de eerste kolf wordt opgeschonken een normale cultuurvloeistof met 2 % saccharose, in de tweede dezelfde met 2 % glucose, in de derde met 2 % pyrodruivenzure calcium; in deze drie kolven wordt nu toegevoegd een apart gesteriliseerde natrium-sulfietoplossing, zoodanig, dat de sulfietconcentratie 1 % bedraagt. De drie

¹⁾ Een deel dezer proeven werd verricht door den heer VAN SCHERMBEEK.

overige kolven werden op geheel dezelfde wijze behandeld, doch hier bedraagt de sulfietconcentratie 2 %.

De gisting der 1 % sulfietoplossingen komt spoediger op gang, dan die der 2 %; van de laatste gist de glucose geheel niet. Na drie weken worden de gistingsvloeistoffen onderzocht. De overmaat sulfiet wordt neergeslagen met Bariumchloride en de heldere vloeistof aan destillatie onderworpen, waarbij het destillaat opgevangen wordt in alcohol.

In het destillaat wordt nu gereageerd op acetaldehyde met nitroprussidnatrium en piperidine of met trimethylamine, zooals ook is uitgevoerd door LE FÈVRE; een donker blauwe kleuromslag toont de aanwezigheid van acetaldehyde, waarvoor deze reactie specifiek is.

Het resultaat van de proef is, dat de reactie overal positief uitvalt, behalve bij de glucosegisting met 2 % sulfiet, doch deze had ook niet gegist. De destillaten der gistingen met 1 % vertoonden een krachtiger reactie, dan die met twee percent, hetgeen waarschijnlijk een gevolg is van de in de laatste veel langzamer plaats gehad hebbende gisting.

Een tweede proef ingezet zonder- en met 1 % sulfiet leverde wederom een positieve reactie bij de sulfietgistingen, terwijl die der controles negatief was. Bij deze proef was er speciaal op gelet, dat de saccharose geheel was uitgegist, voordat de cultuurvloeistof met het pyrodruivenzure zout werd opgeschonken.

§ 10. Conclusies.

De voorgaande proeven toonden aan, dat zoowel bij de vergisting van suikers als van pyrodruivenzure calcium acetaldehyde door middel van natriumsulfiet is „weg te vangen”.

Wanneer wij in aansluiting met de algemeen geldende opvatting aannemen, dat dit produkt een tusschenprodukt vormt bij deze gistingen, dan is dus voor de vergisting van pyrodruiv-

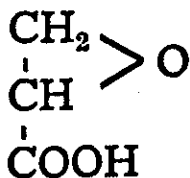
venzuur de eenvoudige splitsing in acetaldehyde en koolzuur de eenige mogelijkheid.

De proef heeft nu aangetoond, dat uit pyrodruivenzure calcium, formiaat en acetaat worden gevormd. Uit suikers daarentegen wordt in hoofdzaak butyraat gevormd, doch ook hier is door middel van de sulfietgisting acetaldehyde aan te toonen.

Wij komen dus op de moeielijkheid, dat dezelfde bacteriën bij de pyrodruivenzure gisting uit acetaldehyde andere produkten vormen dan bij de suikergistingen uit dit zelfde produkt.

Een dergelijke moeielijkheid deed zich voor bij de bestudeering van het chemisme der coli-thyphusgistingen door LE FÈVRE. Hij vond, dat uit pyrodruivenzuur barnsteenzuur werd gevormd, welk proces hij zich voorstelt als de koppeling van twee acetaldehydemoleculen. Bij de vergisting van glycerinezuur en van glycerine-aldehyde wordt echter geen barnsteenzuur gevormd, terwijl toch ook hier pyrodruivenzuur en acetaldehyde als tusschenprodukt moeten worden aangenomen.

LE FÈVRE meent dit te moeten verklaren door een structuurchemisch verschil aan te nemen tusschen het door hem te vergisten gegeven pyrodruivenzuur en het als tusschenprodukt gevormde, hetwelk hij zich dan voorstelt in den vorm:



Wanneer wij echter de sulfietgistingen als bewijs beschouwen voor het als tusschenprodukt optreden van acetaldehyde, dan kunnen wij voor deze stof geen verschillen in structuurchemische samenstelling meer aannemen.

De mogelijkheid blijft natuurlijk bestaan, dat een proces, voorafgaand aan het ontstaan van het tusschenprodukt, invloed

heeft op de omzetting van dit produkt zelf en dat daardoor dus het optreden van dergelijke verschillen zijn te verklaren. Daarnaast zal men toch goed doen, een open oog te hebben voor de vraag of de zgn. „Abfangverfahren” wel mogen worden beschouwd als een vaststaand bewijs, dat werkelijk acetaldehyde als tusschenprodukt ontstaat, iets wat tegenwoordig bijna algemeen wordt aangenomen.

Er is immers nog een tweede mogelijkheid, n.l. deze, dat men door toevoeging van een voor de organismen schadelijke stof met een groote affiniteit voor deze atoomgroepeerings, uit de labiel geworden koolstofverbindingen het gevonden complex afscheidt, zoodat dus niet de bacterie of gist, doch de experimentator de maker is van het acetaldehyde als tusschenprodukt.

Het spreekt van zelf, dat deze beschouwingen niets afdoen aan het baanbrekende werk door NEUBERG en medewerkers verricht, welke door het vinden van een methode, om het evenwicht in gistingprocessen te verstoren, de eerste stap hebben gedaan, voor de studie van het chemisme der biologische dissimilatie.

De thermophile gistingen hebben zich echter voor een verdere studie aangaande deze biochemische kwesties niet erg geschikt getoond, doordat zij zeer gevoelig bleken te zijn voor een protoplasmagift als natriumsulfiet en tevens, omdat voor de bestudeering van het chemisme noodzakelijk is, dat de betreffende bacterie een zeer groot aantal uiteenlopende verbindingen, liefst van eenvoudige samenstelling, vergist, een eigenschap, welke *Bac. thermobutyricus* niet vertoont. Hierbij komt nog, dat door de hoge temperatuur, waarbij gewerkt moet worden, caramellisatie en bij aanwezigheid van sulfiet verharsing optreedt, welke de proeven voor kwantitatieve bepalingen weinig geschikt maken.

HOOFDSTUK V

DISSIMILATIE VAN CELLULOSE DOOR THERMOPHIELE BACTERIËN

§ 1. Inleiding.

Van de geweldige massa door de hogere planten vastgelegde koolstof, een hoeveelheid, welke voor de geheele aarde volgens een berekening van SCHRÖDER op 35 biljoen kilogram organisch materiaal per jaar wordt geschat, bestaat een zeer groot gedeelte uit cellulose. Het zijn juist de ophooping van deze stoffen, waarin zelfverhitting tot stand komt en waar dissimilatieprocessen plaats vinden, veroorzaakt door thermophile bacteriën. Het is dan ook natuurlijk, dat de studie der dissimilatie van cellulose, welke, naar gebleken is, niet alleen bij zeer hoge, doch ook bij lagere temperatuur krachtig verloopt, reeds sedert vele jaren een bron van onderzoek is geweest; immers het zijn deze processen, welke in hoofdzaak den kringloop der koolstof in de natuur beheerschen.

Merkwaardig is wel, dat we, niettegenstaande al het verrichte werk, moeten constateeren, dat we omtrent de krachtigste biochemische afbraak, n.l. de vergisting van cellulose, zowel tot koolzuur en methaan als tot koolzuur en waterstof, nog zeer weinig weten.

Bij de bestudeering der uitgebreide literatuur over de mesophile cellulose-aantastende bacteriën, treft het ons, welk een

groot verschil er bestaat in de resultaten dezer onderzoekingen naar gelang zij betrekking hebben op de cellulosevergistende- of op de aerobe cellulose aantastende bacteriën. Omtrent de eerste heerscht nog onzekerheid omtrent hun bestaan, terwijl van de laatsten er vele bekend zijn en betrekkelijk gemakkelijk te isoleeren.

Voor de eerste maal werden cellulose aantastende aerobe bacteriën geïsoleerd door VAN ITERSON, welke daartoe gebruik maakte van papierschijven, waarop de aerobe ruwculturen, waarin cellulose in den vorm van filtreerpapier aanwezig was, werden uitgestreken. Op dergelijke papierschijven, welke met manganioxyde bruin zijn gekleurd, werd door SÖHNGEN aangetoond, dat bij de aerobe aantasting van cellulose oxyzuren worden gevormd.

Een groote vooruitgang inzake de isolatie van celluloseaantastende organismen was het werk van KELLERMAN en Mc. BETH, welke voor de eerste maal een buitengewoon geschikten voedingsbodem voor deze bacteriën samenstelden, door filtreerpapier in een ammoniakale kopersulfaatoplossing tot volledige oplossing te brengen en neer te slaan met zoutzuur, waardoor een celluloseagar verkregen kan worden, welke deze stof in zeer fijn verdeelden toestand bevat en waarop dus heel gemakkelijk oplossing is waar te nemen, omdat de bacteriën steeds met de uiterst fijne cellulosevezeltjes in aanraking zijn, iets wat op andere wijze in agar niet is te bereiken. De voedingsbodem bestond uit:

celluloseoplossing (verkregen door oplossen van 15 gram filtreerpapier en het fijne neerslag te brengen in 1,5 L. water)	500 cc.
agar	10 gram
voedingsoplossing	500 cc.

De gebruikte voedingsoplossing bestond uit:

sec. kaliumphosfaat	1 gram.
magnesiumsulfaat	1 gram.
natriumchloride	1 gram.
ammoniumsulfaat	2 gram.
calciumcarbonaat	2 gram.
leidingwater	1 liter.

Op dezen agar werden 11 aerobe celluloseaantastende bacteriestammen verkregen, waarvan één tot de thermophile bacteriën behoorde; een beschrijving werd echter alleen gegeven van vier verschillende mesophile soorten. Uit de cellulosegistingen, ingezet volgens OMMELIANSKI, verkregen zij geen enkele anaerobe, doch wel verscheidene aerobe cellulose aantastende bacteriën, uit de waterstofgisting isoleerden zij twee aerobe cellulosesplitsers en vijf andere, uit de methaangisting verkregen zij één celluloseaantastende en twee andere aerobe bacteriën.

Om deze redenen meenen KELLERMAN en Mc. BETH, dat deze gistingen veroorzaakt worden door andere bacteriën in samenwerking met de aerobe cellulosesplitsers, welke een vergistbaar product uit deze stof produceeren. Een dergelijke meening was ook reeds in 1896 uitgesproken door MACFAYDEN en BLAXALL.

Naderhand worden op deze zelfde wijze nog 13 soorten geïsoleerd door KELLERMAN, Mc. BETH, SCALES en SMITH, welke alle groeien van 20 tot 37,5° C.. Door MAC. BETH en SCALES worden 15 soorten beschreven; één thermophile, (waarschijnlijk dezelfde als van KELLERMAN) werd genoemd, doch van deze is geen beschrijving gegeven.

Ook door HUTCHINSON en CLAYTON is over de aerobe celluloseaantastende bacteriën in de gronden van Rothamsted gewerkt en eveneens gebruik gemaakt van dergelijke celluloseagar-

platen; de door hen geïsoleerde *Spirochaeta cytophaga* produceerde wel zuren, doch geen gas uit cellulose.

Wat de anaerobe cellulosevergistende bacteriën betreft, hier heeft het isoleren van de reincultuur altijd op de grootste moeilijkheden gestuit. Wel gelukte het aan OMMELIANSKI, om de twee verschillende processen, de methaan- en de waterstofgisting te scheiden door toepassing van herhaalde pasteurisatie bij de overenting, waarbij de laatste wordt overgehouden, doch, hoewel een groot aantal proeven zijn gedaan, om de bacteriën, welke deze gisting veroorzaken, in reincultuur te brengen, hebben zij niet tot bevredigende resultaten geleid. Wel zijn naderhand proeven gedaan over het chemisme dezer cellulosegisting, waarbij door PRINGSHEIM glucose en cellobiose als tusschenprodukt werden aangetoond en door NEUBERG en COHN door middel van de sulfiet- en de dimedonmethode ook acetaldehyde, doch men zal goed doen deze proeven, welke alle met ruwculturen zijn verricht met eenige scepsis te beschouwen.

Door Mad^{me}. KHOUVINE is getracht de bacterie der cellulose-waterstofgisting in reincultuur te brengen. Zij stuitte daarbij op de onmogelijkheid koloniegroei te verkrijgen op een vasten voedingsbodem, zoodat zij genoodzaakt was een totaal anderen weg in te slaan. In de overgeënte gistingen, waarin waterstof, koolzuur, azijnzuur, boterzuur en alcohol werd geproduceerd, trof zij steeds de bacteriën aan tusschen de vezels van het filtreerpapier, waarmede zij werkte. Deze vezels, welke geel van kleur werden, ging zij nu herhaalde malen uitwasschen met een steriele physiologische zoutoplossing, nadat zij de culturen door het herhaald pasteuriseeren bij het overenten reeds van een groot aantal ongewenschte organismen had bevrijd. Het bleek noodig te zijn voor het verder kweken van de uitgewasschen culturen, dat extract van faeces werd toege-

voegd. Ten slotte houdt zij nu in de papiervezels twee organismen over, een diplococce en een sporenvormende staafbacterie en door nog eenmaal pasteuriseeren blijft tenslotte slechts deze laatste over, welke dus blijkbaar alleen in staat is de cellulose te vergisten. De bacterie, welke giste van 35 tot 51° C. was een 2,5 μ lange staaf met eindstandige sporen. De aldus verkregen cultuur werd nu verder gebruikt voor het doen van gistingproeven.

Hoewel dit werk ons zeker een stap nader brengt tot het gewenschte doel, n.l. het doen van proeven met de reincultuur van deze gisting veroorzakende bacteriën, geheel overtuigen dat dit inderdaad bereikt is, kan de mededeeling van Madame KHOUVINE niet. Hier wordt slechts onder het microscoop de gistende papiervezels bekeken en uit dit onderzoek de conclusie getrokken, dat er maar één enkele bacteriesoort aanwezig was, waarbij echter zeer gemakkelijk meerdere soorten, waarvan de bacteriën overeenkomstige morphologische eigenschappen vertoonen, aan de aandacht kunnen ontsnappen.

Over de aantasting van cellulose door thermophile bacteriën is, zooals reeds in hoofdstuk I is besproken, door een groot aantal onderzoekers gewerkt. Hoofdzakelijk heeft men zich bezig gehouden met de bij 60° C. en hooger zeer krachtig verlopende gistingsprocessen; over de aerobe aantasting door thermophile bacteriën wordt slechts, zooals gezegd, in het kort gesproken door KELLERMAN en door Mc. BETH en SCALES.

Met de ruwculturen is gewerkt door MACFAYDEN en BLAXALL, door PRINGSHEIM en door KROULIK; als gistingsproducten werden gevonden koolzuur, waterstof, azijnzuur en mierenzuur; een methaangisting werd door deze onderzoekers niet waargenomen.

Naderhand verschenen over dit onderwerp een tweetal mededeelingen, resp. van LANGWELL en LYMN en van FRED,

PETERSON en VILJOEN, waarin de indruk gevestigd wordt, dat het dezen onderzoekers eindelijk gelukt is een cellulosevergistende bacterie in reincultuur te brengen. Zooals ik reeds in Hoofdstuk I zeide, bestaan er echter redenen, om aan de juistheid hunner conclusies te twijfelen.

LANGWELL en LYMN verkrijgen bij de uitzaaiing der overgeënte cellulosegistingen op een glucose-agarplaat sporenlooze, eenigszins kruipende en geel gekleurde sporenbevattende koloniën, welke op alle koolhydraatbevattende platen goeden groei vertoonen. Waarschijnlijk zijn beide kolonievormen afkomstig van dezelfde bacteriesoort en hangt slechts het uiterlijk af van de al of niet aanwezigheid van sporen. Van een enkele kolonie wordt nu een streepcultuur gemaakt op een peptonagarplaat en de daarop gegroeide bacteriën met steriel water gespoeld in een kolfje met een gesteriliseerde voedingsoplossing en filtreerpapier als vergistbaar materiaal. Er treedt nu gisting op; van 1,8 gram papier wordt 0,85 gram of 53 % vergist, als eindprodukt wordt 0,22 gram azijnzuur en 0,01 gram alcohol gevonden.

Het lijkt wel haast ongelooflijk, dat wat reeds op allerlei wijzen tevergeefs is geprobeerd, n.l. het verkrijgen van koloniën van cellulosevergistende bacteriën, zoo gemakkelijk met zulke eenvoudige hulpmiddelen is gelukt. Toch is het daarom zeker mogelijk, dat hier een tot heden over het hoofd geziene bacterie, zooals WINDISCH zich bij de bespreking van dit werk uitdrukt, is geïsoleerd.

Wanneer we echter de proeven, welke met deze cultuur zijn verricht, beschouwen, dan wordt het steeds moeilijker te gelooven, dat inderdaad een reincultuur is verkregen.

De vergisting van verschillend materiaal en de daaruit ontstane produkten zijn door LANGWELL en LYMN vereenigd in onderstaande tabel:

Gistingen	sulfietspulp				fil- treer- papier	cellu- lose uit suiker- riet	cellu- lose uit rijst- stroo	riet- suiker	xylose uit rijststroo	
azijnzuur	31,8	59,4	35,1	28,2	43,0	74,6	66,2	22,5	60,3	79,7
boterzuur	—	—	28,6	—	—	—	—	—	—	—
melkzuur	—	—	4,8	45,1	36,6	—	—	57,5	—	—
alcohol	27,6	—	2,2	12,9	8,3	—	0,5	7,5	15,5	1,6
koolzuur	42,4	49,5	—	—	—	27,8	47,5	—	—	28,1
waterstof	1,0	0,7	—	—	—	0,2	0,4	—	—	0,2
methaan	0,2	7,6	—	—	—	8,0	7,2	—	—	7,3
totaal	103,0	117,2	—	—	—	110,6	121,8	—	—	116,9

Uit deze tabel zien we, dat nu eens hoofdzakelijk methaan, dan weer waterstof wordt gevormd. Uit hetzelfde produkt wordt eenmaal 28,6 % boterzuur gevonden, de drie overige keeren geheel niets, alcohol wordt drie maal wel en één maal niet gevonden, terwijl van deze drie gistingen de hoeveelheid varieert van 2,2 tot 27,6 %. De hoeveelheid methaan varieert bij vergisting van hetzelfde product van 0,2 tot 7,6 %.

Het is moeilijk aan te nemen, dat deze groote verschillen in de eindproducten bij de vergisting van dezelfde stof, kunnen optreden, wanneer de proef gedaan wordt met de reïncultuur van één en dezelfde bacterie; ja zelfs zou dus het onderscheid tusschen de waterstof en de methaangisting onafhankelijk zijn van de bacterieflora. LANGWELL en LYMN deelen mede, dat zij deze verschillen door wijzigingen in de omstandigheden kunnen te voorschijn roepen, hoe dit echter gebeurt, wordt niet beschreven.

Wanneer ik nu deze buitengewoon eenvoudige wijze, om de reïncultuur der thermophile cellulosevergistende bacteriën te verkrijgen, vergelijk met de talloze proeven door mij gedaan, om, op welke voedingbodem dan ook, koloniën van deze bacteriën te isoleeren, proeven welke alle tot een negatief

resultaat hebben geleid, dan kan niet anders dan twijfel opkomen aan de steriliteit der van filtreerpapier voorziene gistingkolven, waarin de cultuur der geïsoleerde bacteriën werd geënt. Temeer twijfel ik hieraan, omdat mijne ondervinding bij het werk met alle thermophile bacteriën mij geleerd heeft, steeds zeer voorzichtig te zijn met de beoordeeling der steriliteit van in den autoclaaf verhitte cultuurkolven, vooral wanneer deze, zooals natuurlijk vaak voorkomt, al eerder voor dit werk zijn gebruikt. Het is steeds noodzakelijk, hooger of langer te verhitten, dan dat men dit bij het werk met mesophile organismen gewoon is en daarbij mag een op dezelfde wijze gesteriliseerde ongeënte kolf als contrôle nimmer ontbreken. Ik acht het dan ook waarschijnlijk, dat LANGWELL en LYMN, meenende met een reincultuur te werken, in werkelijkheid doorgewerkt hebben, met een gepasteuriseerde overgeënte ruwcultuur.

In een publicatie van FRED, PETERSON en VILJOEN wordt eveneens melding gemaakt van een isolatie der reincultuur dezer belangrijke organismen. Een cultuurvloeistof van de volgende samenstelling:

Na(NH ₄)HPO ₄ , 4 H ₂ O	2 gram.
KH ₂ PO ₄	1 „
CaCl ₂	0,3 „
Pepton	5 „
Cellulose	15 „
leidingwater	1000 „
CaCO ₃	overmaat. Reactie Ph = 7,4.

wordt geënt met mest. De 5e overenting levert geen zwavelwaterstof meer; de gisting begint nu na 18 uur. Gedurende twee jaar is de cultuur 200 × overgeënt en heeft vier maal een zeer hooge verhitting plaats gehad, n.l. 1 × 25 min. op 118° en 3 × 35 min. op 115°. De culturen worden nu uitgezaaid

op cellulose-agarplaten volgens KELLERMAN, echter zonder succes; op platen in een exicator bij een druk van 6 mm. kwik worden wel koloniën verkregen, doch gisting veroorzaken zij niet. Over oplossingsvelden in de cellulose-agar wordt niet gesproken. Zij maken nu gietcultures in cellulose-agarbuisen, waaruit de lucht door koken is verdreven, waarna snel op 45° wordt afgekoeld. Er heeft nu oplossing plaats in de 6 inch lange buizen tot op een afstand van een halve inch van de oppervlakte; er ontstaan tevens gasbellen in den agar, doch over koloniën spreken zij niet. Ze maken nu een zoo groote verdunning van de gistende cultuur in de cellulose-agarbuisen, dat daarin slechts één enkele gasbel optreedt en deze enten zij over in een gesteriliseerden kolf met bovengenoemde cultuurvloeistof. Het resultaat is, dat hierin gisting optreedt, welke zij nu beschouwen als te worden veroorzaakt door een reincultuur.

Het is echter zeer de vraag of op deze wijze werkelijk een reincultuur is verkregen, immers er is niet een aan den vorm herkenbare kolonie, doch een gasbel overgeënt. Het is duidelijk, dat, wanneer men de negatieve resultaten, welke door vele onderzoekers steeds verkregen zijn en ook ik bij mijn werk hierover ben tegengekomen, om cellulosegisting te verkrijgen in een steriele cultuurvloeistof geënt met een enkele kolonie, afkomstig van een vaste cellulosebevattende voedingsbodem, wil verklaren, door deze toe te schrijven aan het feit, dat de cellulosegisting niet veroorzaakt wordt door een enkele bacteriesoort, doch het resultaat is van de vereenigde werking van meer dan één organisme, de proeven van FRED, PETERSON en VILJOEN niets bewijzen; immers door het overenten eener gasbel brengen zij ongetwijfeld de gistende bacteriën in den gesteriliseerden kolf, doch of deze tot een enkele soort behooren, ja zelfs of er nog geen andere geheel aan de gisting vreemde organismen mee overgaan, blijft volkomen onzeker.

De conclusie, dat men een reïncultuur bezit, mag slechts worden getrokken, indien men zeker is, dat de gegroeide organismen afkomstig zijn van een enkele of van meerdere aan elkander gelijke cellen, hetgeen slechts kan worden bereikt, door het kweken van overgeënte koloniën op een vasten voedingsbodem of wel door onder het microscoop een enkele bacterie af te zonderen door middel van een micromanipulator.

§ 2. De gisting van filtreerpapier in ruwcultuur.

Eigen onderzoek.

Een aantal kolven van een halve Liter inhoud werden met 10 gram van te voren met water tot een papje gekookt filtreerpapier bedeed en 3 gram Calciumcarbonaat, 0,5 gram K_2HPO_4 en 0,3 gram $MgSO_4$ toegevoegd, terwijl de helft der kolven 0,5 gram asparagine en de andere helft 0,5 gram NH_4Cl als stikstofbron kregen.

Van beide groepen werd nu de helft geënt met grachtmodder en de andere met stalmest, van elk der vier groepen werd nu weder de helft 10 min. op 78 à $80^\circ C.$ gepasteuriseerd, de andere helft niet.

Alle kolven vertoonen na eenigen tijd in den thermostaat van $55^\circ C.$, gisting, waarbij die met asparagine eerder op gang komen, dan die met ammoniumchloride als stikstofbron.

Wanneer een krachtige gisting is opgetreden, worden deze met een stukje geel geworden papier overgeënt in gesteriliseerde kolven met een cultuurvloei-stof van gelijke samenstelling. De overentingen uit de gepasteuriseerde kolven worden steeds opnieuw gedurende 10 minuten op 78 a $80^\circ C.$ gepasteuriseerd. De gassen worden opgevangen boven een verzadigde keukenzoutoplossing en geanalyseerd. Zooals de reeds bij de bespreking der thermophile methaangistingen in hoofdstuk II gegeven gasanalyses (zie blz. 44) aangeven, waren bijna alle

gistingen methaangistingen, een onderscheid tusschen de gepasteuriseerde en de niet gepasteuriseerde overentingen werd niet gevonden.

Wel is mij gebleken, dat na herhaalde malen te zijn overgeënt de methaangistingen, onafhankelijk van het entmateriaal de stikstofbron of het al of niet gepasteuriseerd zijn, alle overgingen in waterstofgistingen, zooals blijkt uit de volgende gasanalyses, welke wederom voorbeelden zijn van een groot aantal verrichte waarnemingen.

	vol. van het gas	koolzuur	waterstof
4e overenting, ongepasteuriseerd, asp. als stikstofbron, mest als oorspronkelijk entmateriaal, vroeger een methaangisting (zie de analyse op blz. 44 onder cultuur II, ongepasteuriseerd).	35,4	24,2	10,6
4e overenting, gepasteuriseerd, asp. als stikstofbron, mest als oorspronkelijk entmateriaal, vroeger een methaangisting (zie de analyse op blz. 44 onder cultuur II, gepasteuriseerd).	37,5	25,6	11,2
4e overenting, gepasteuriseerd, NH_4Cl als stikstofbron, grachtmodder als oorspronkelijk entmateriaal, vroeger een waterstofgisting (zie de analyse op blz. 44 onder cultuur III, gepasteuriseerd).	41,0	26,6	13,8

De overige analyses leverden overeenkomstige resultaten, bij de derde overentingen werden nog eenige methaangistingen gevonden, bij de vierde waren het alle waterstofgistingen geworden.

Daar nu bekend is, volgens de onderzoeken van PRINGSHEIM en van KROULIK, van LANGWELL en LYMN en van FRED, PETERSON en VILJOEN, dat bij de cellulosewaterstofgisting, mierenzuur en azijnzuur worden gevormd, welke waarnemingen door mij met analyses der gisting in de overgeënte ruw-culturen konden worden bevestigd en ik tevens vond, zooals in Hoofdstuk II uitvoerig besproken is, dat de Calciumzouten dezer zuren zeer goed bij deze temperatuur tot methaan en koolzuur worden vergist, welk proces zich echter niet met een kleine hoeveelheid liet overenten, dan zien we hier een zeer duidelijke aanwijzing, dat de thermophile cellulose-methaangisting hoogstwaarschijnlijk als een nevenproces is te beschouwen en een gevolg is van de werking van organismen, welke koolzuur en methaan produceeren uit eenige der eind-producten der cellulosewaterstofgisting, zonder dat zij zelve in staat behoeven te zijn cellulose aan te tasten.

§ 3. De isolatie van een thermophile cellulose-aantastende bacterie. ¹⁾

De cellulose-waterstofgisting, welke wij na herhaalde overentingen hebben overgehouden, is een bij 55—60° C. vrij krachtig verloopend proces; merkwaardig is dat, wat ook door alle voorgaande onderzoekers is opgemerkt, ook bij ruim voldoende aanwezigheid van Calciumcarbonaat ter binding van de gevormde organische zuren, steeds een gedeelte van het filtreerpapier achterblijft en nog slechts uiterst langzaam gist. Dit geel geworden papier is vlokkig en week geworden, microscopisch bezien, blijkt het zeer vele sporenvormende staafbacteriën te bevatten.

Getracht wordt nu door uitzaaiing op verschillende voedings-

¹⁾ Een deel dezer proeven is uitgevoerd door den heer TEN DOESCHATE.

bodems, zoowel onder aerobe als onder anearobe omstandigheden, koloniën dezer bacteriën te verkrijgen. Voor de anaerobe platen werd weder gebruikt gemaakt van de op blz. 74 beschreven methode. Als voedingsbodem werd gebruikt vleeschagar, vleeschagar—1 % glucose, gistagar—1 % glucose, leidingwateragar met anorg. voedingszouten en 1 % glucose, idem met 1 % zetmeel en de twee laatsten met asparagine en met pepton als stikstofbron. Op vele platen werden koloniën van verschillenden vorm verkregen, op de anaerobe platen zeer weinig. Met al deze koloniën zijn entingen verricht in gesteriliseerde voedingsoplossingen met ammoniumchloride, asparagine of pepton als stikstofbron en filtreerpapier als vergistbaar materiaal; alle echter met een negatief resultaat.

Daarom werd nu overgegaan tot de bereiding van celluloseagar, zooals ook door KELLERMAN en medewerkers is gebruikt en welke bestaat uit agar met zeer fijn verdeelde cellulose, verkregen door oplossing van filtreerpapier in een daarvoor geschikt oplosmiddel en daarna wederom deze stof neer te slaan. Gevolgd werd het voorschrift, zooals dit gegeven is in ABDERHALDEN'S Handbuch der biochemische Arbeitsmethoden, blz. 123.

59 gram kopersulfaat worden opgelost in 3 Liter warm water., toegevoegd wordt ammoniak tot zich geen neerslag van $\text{Cu}(\text{OH})_2$ meer vormt. De verkregen brij wordt met warm water uitgewasschen tot alle sulfaat verdwenen is, het neerslag opgelost in sterke ammoniak en aangevuld tot een volume van 1 liter. Deze oplossing, het z.g. SCHWEIZER'S reagens, is in staat cellulose in oplossing te brengen. 20 gram fijngeknipt filtreerpapier wordt hieraan toegevoegd en geschud tot vrijwel alles in oplossing is gegaan, daarna wordt over asbest gefiltreerd en het filtraat tot 10 liter met leidingwater aangevuld. Nu wordt langzaam onder voortdurend omroeren sterk zoutzuur toegevoegd, totdat de blauwe kleur tot groen omslaat; de cellu-

lose is nu uiterst fijn neergeslagen; men laat ze bezinken en hevelt de bovenstaande vloeistof af, schenkt wederom met leidingwater bij, laat weer bezinken en herhaalt dit wasschen, totdat geen reactie op chloor meer optreedt. Van deze in water fijn verdeelde cellulose wordt nu agar gemaakt, waarbij men moet zorg dragen, dat het totaal volume van den agar niet meer dan twee Liter bedraagt, wanneer er dus te veel water overblijft, doordat niet verder zonder verlies van cellulose kan worden afgeheveld, doet men het best de hoeveelheid door voorzichtig indampen te verkleinen. Aan de helft van de op deze wijze verkregen agar wordt nu behalve 0,1 % K_2HPO_4 en 0,05 % $MgSO_4$, 0,1 % asparagine- en aan de andere helft 0,1 % NH_4Cl als stikstofbron toegevoegd.

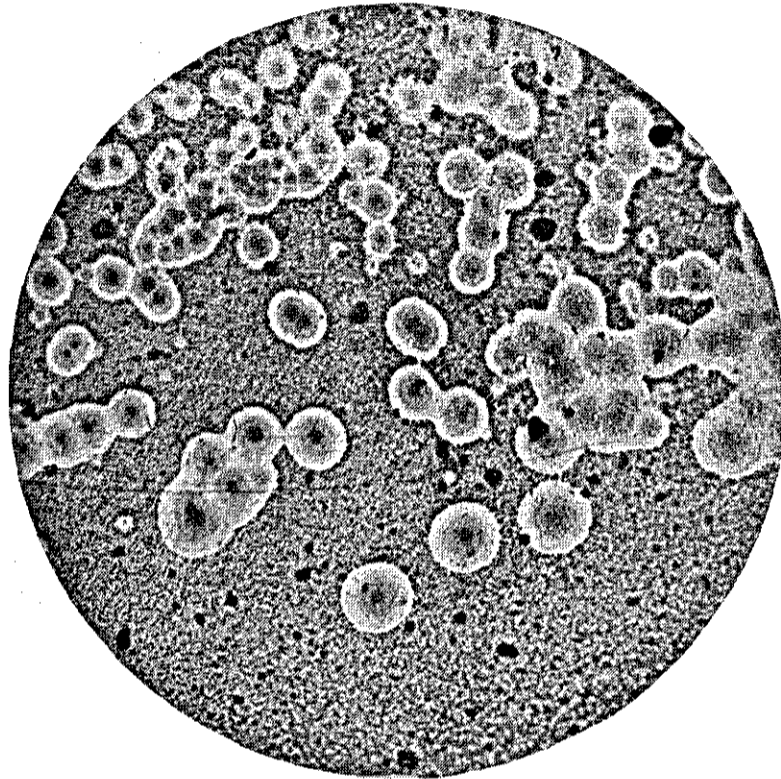
Er worden nu platen gegoten voor aerobe zoowel als voor anaerobe cultuur (d.w.z. met plasticine dichtgeplakte doozen, waaraan een kolfje met pyrogalluszure kali is verbonden, zooals dit beschreven op blz. 74), bestaande uit een onderste laag van leidingwateragar met dezelfde voedingszouten als voorkomen in een dunne bovenste laag, bestaande uit cellulose-agar. Een deel der platen bevat ammoniumchloride, de andere asparagine als stikstofbron.

Op de anaerobe platen wordt geen groei waargenomen, op de aerobe waren na vier of vijf dagen in den thermostaat van $55^\circ C$. vele koloniën te zien met duidelijke oplossingsvelden in de troebele cellulose-agarlaag.

Doordat de platen onder een klok vochtig gehouden moesten worden en zich onder in het deksel veel water verzamelde, werd tamelijk veel last ondervonden van infecties van over de plaat kruipende bacteriën. Op de platen met asparagine als stikstofbron was dit erger dan op die met ammoniumchloride, doch op de laatsten groeien de celluloseoplossende bacteriën aanmerkelijk langzamer.

Deze oplossende koloniën worden nu overgeënt op platen

PHOTO VII



Koloniën van *Bac. Thermo-cellulolyticus* n.sp.
op cellulose agar. volgens KELLERMAN, 5 dagen bij
55° C. Ongekleurd
vergrooting $\pm 15 \times$

van gelijke samenstelling, de overgeënte koloniën vertoonen geheel hetzelfde beeld, zoodat we dus hiermede een rein-cultuur verkregen hebben van een thermophile cellulose-oplossende bacterie (zie photo VII).

§ 4. Beschrijving van de aerobe thermophile cellulose-aantastende bacterie.

a. Morphologische eigenschappen:

vorm	dunne staafbacteriën.
grootte van den sporenloozen staaf	lengte 4—6 μ , dikte 0,3 μ .
grootte van den sporenbevattenden staaf	lengte 3,5—4 μ , dikte 0,3 μ .
plaats van de spore	excentrisch.
grootte van de spore	lengte 1,5 μ , dikte 0,8 μ .
beweeglijkheid	negatief.
met jodium kleurende reservestof	geen.
gramkleuring	positief.

b. Uiterlijke kenmerken van den groei op platen of in vitro:

koloniebeschrijving op:

cellulose-agar 5 d. 55° C. asp.

0,5—1 mm. doorsnede, rond met gegolfde randen, het oplossingsveld ongeveer een kwart mm. buiten de kolonie uitstekend. De kolonie droog en dun, in het midden gekorrelt door de aanwezigheid van sporen.

vleeschagar 1 % saccharose
5 d. 55° C.

iets kleinere, zeer doorschijnende koloniën, vochtig en glinsterend, weinig sporen.

2 % zetmeelagar

koloniën als op cellulose-agar, doch met iets grootere oplossingsvelden.

vleeschagar 1 % glucose, CaCO₃
in het oppervlak

geen oplossingsvelden.

steekcultuur in vleeschagar-glucose

alleen zwakke oppervlaktegroei.

groei op aardappel

geen kleuring.

groei in bouillon

zwak, geen huidvorming, geen sediment.

groei in melk

geen groei.

c. *Physiologische eigenschappen:*

zetmeelhydrolyse	positief.
eiwitsplitsing	geen.
nitraatreductie	geen.
indolvorming	geen.
zuurvorming uit koolhydraten	geen.
gasvorming uit koolhydraten	geen.
katalase	geen.
max. temperatuur	60—65° C.
optimumtemperatuur	50—55° C.
minimumtemperatuur	35—37° C.

Hieruit blijkt, dat deze bacterie streng aerob is, eenige groei heeft onder anaerobe omstandigheden niet plaats, gisting of zuurvorming heeft nimmer plaats, merkwaardig is het wederom ontbreken van katalase.

De bacterie, welke evenals dat met een aantal mesophile soorten van KELLERMAN en MC.BETH het geval was, werd geïsoleerd uit de herhaaldelijk overgeënte anaerobe cellulosegistingen en daarom werd nog éénmaal een aantal proeven ingezet over een mogelijk vergistingsproces met deze rein-cultuur. Als aanduiding dezer bacterie wordt den naam gekozen: *Bac. thermo-cellulolyticus*.

§ 5. Pogingen om vergisting te verkrijgen met de beschreven reincultuur.

Conclusies.

Zoowel met versnipperd filtreerpapier als met de fijn verdeelde cellulose, verkregen door oplossing van filtreerpapier in het SCHWEIZER's reagens, worden nu talloze proeven gedaan, om in steriele cultuurvloestoffen van verschillende samenstelling gisting met deze reincultuur te verkrijgen, omdat, daar zij als een cellulose-aantastende bacterie afkomstig uit de opgehoopte gistende ruwculturen, niet maar direct kon

worden aangenomen, dat zij niets met deze gisting had uit te staan.

Geprobeerd werd de enting dezer koloniën in cultuurvloeistoffen, waaraan behalve cellulose, altijd Calciumcarbonaat was toegevoegd voor de binding van eventueel gevormde zuren. Zij bestaan uit: bouillon, leidingwater met anorganische voedingszouten, idem met pepton als stikstofbron, idem met asparagine als stikstofbron, bouillon met zetmeel in plaats van cellulose en tenslotte leidingwater met anorganische voedingszouten, resp. met pepton en met asparagine als stikstofbron met zetmeel in plaats van cellulose.

Alles met volkomen negatief resultaat.

Daarnaast werd in een dunne laag in erlemeyers dezelfde cultuurvloeistoffen met cellulose geënt met de reincultuur, om te zien of onder deze aerobe omstandigheden in vitro een snelle oplossing plaats had en of daaruit zuren werden gevormd. Het bleek, dat de groei der bacteriën nu zeer langzaam plaats had en de oplossing van de cellulose pas na eenige weken was aan te toonen. Deze slechte groei in vitro is oorzaak, dat de bepaling der physiologische eigenschappen zeer wordt bemoeilijkt.

Daar echter de oplossing op de agarplaten zeer goed verloopt, wordt nog getracht door aan de cellulose in de anaerobe en in aerobe culturen kleine hoeveelheden agar toe te voegen, op deze wijze een aantasting in vitro te verkrijgen, uitgaande van de veronderstelling, dat een dergelijke stof als agar wellicht bevorderlijk is voor het tot stand komen van den eersten groei dezer bacteriën. Ook deze proeven hadden een negatief resultaat.

Wij komen dus tot de conclusie, dat de geïsoleerde bacteriën slechts in staat zijn de cellulose aan de lucht te „verbranden”; toch is het merkwaardig, dat deze bacteriën verkregen worden door uitzaaiing der meermalen overgeënte cellulosegistingen,

ja dikwijls levert het uitstrijken van een geel geworden stukje papier uit een goed gistende kolf vrijwel niets anders dan de koloniën dezer bacteriën in grooten getale op de cellulose-agarplaten.

Hebben we hier wellicht met eenzelfde verschijnsel te doen, als bij de suikergistingen werd waargenomen en moeten we dus aanemen, dat deze bacteriën door hun aerobe groei het vermogen tot vergisten, d.w.z. tot anaerobe energiewinning verloren hebben? Het antwoord op deze vraag moet ik schuldig blijven. Zeker is, dat ook de enting met een direct op de eerste plaat verkregen kolonie, welke dus niet van plaat op plaat is overgeënt, evenmin resultaat heeft; zeker is ook, dat door mij op anaerobe platen geen groei kon worden verkregen; deze beide feiten zijn dus in tegenstelling met het in de gegeven veronderstelling analoog geachte geval met de thermophile suikergistingen.

Is het ook mogelijk, dat de gisting veroorzaakt wordt door een symbiontische samenwerking van meer dan één bacteriesoort? Deze veronderstelling werd, zooals reeds gezegd, naar aanleiding van hetzelfde verschijnsel bij de mesophile cellulose-aantasting, geopperd door KELLERMAN en Mc.BETH, die uit de overgeënte gistingen van OMMELIANSKI slechts aerobe cellulose-aantastende bacteriën konden isoleeren.

Doch welke zijn dan die samenwerkende anaerobe bacteriën? Gevonden zijn deze tot nu toe nimmer, ook niet bij de mesophile gistingen. Het ligt voor de hand, dat dit bacteriën zouden moeten zijn, welke een afbraakproduct der cellulose *wel*, doch deze zelve *niet* kunnen vergisten.

Ongelukkigerwijze kon een afbraakproduct van cellulose met de reincultuur der verkregen bacteriën niet worden aangetoond, omdat het proces in vitro slechts uiterst langzaam plaats had; het was echter mogelijk, dat toch een gemakkelijker aantastbaar koolhydraat daarbij ontstaat en daarom zijn nog een

aantal proeven gedaan om cellulosegisting te verkrijgen met de reïnculturen van *Bac. thermobutyricus* en *Bac. thermocellulolyticus* tesamen, in de veronderstelling, dat door de eerste een suikerachtig lichaam zal worden vergist, dat door de tweede uit cellulose wordt afgesplitst. Ook deze proeven hadden een negatief resultaat.

Geconstateerd moet dus worden dat het probleem der cellulosegisting bij hoge temperatuur, evenals dat het geval is met de mesophile gisting, onopgelost blijft, maar dat het wel gelukt is uit de overgeënte ruwculturen der gisting een thermophile aerobe cellulose-aantastende bacterie in reïncultuur te verkrijgen.

HOOFDSTUK VI

DE MOGELIJKHEID VAN TOEPASSING DER THERMOPHIELE GISTINGEN

§ 1. Inleiding.

Bij een beoordeeling, of het mogelijk is, met succes in de praktijk gebruik te maken van deze thermophile dissimilatieprocessen, is natuurlijk de vraag der rentabiliteit van het allergrootste belang. Deze vraag was dan ook onderwerp van eene discussie in de vergadering van „The Institute of Brewing”, waarvan het verslag gepubliceerd is in het orgaan der vereeniging, jaargang 1923. Besproken wordt eene methode ter vergisting van afgewerkte hop door thermophile bacteriën. De inleiders LANGWELL en LLOYD HIND deelen mede, dat de vergisting van cellulose, behalve in het werk van FOWLER en JOSHI, welke voor een practische toepassing hemicellulose als bruikbaar materiaal beschouwen dan de cellulose, dit onderzoek steeds tot laboratoriumwerkzaamheden is beperkt gebleven. Eerstgenoemden deden in het groot gistingsproeven met gebruikte hop uit de brouwerij, welke h.i. tot belangrijke resultaten hebben geleid.

Zij verwonderen zich er over, dat de vorming der verschillende gistingsprodukten zoo uitermate wisselend is; zoo vonden zij bij eene vergisting van 90 h.l. in den aanvang der gisting veel alcohol gevormd en slechts weinig azijnzuur, in het midden van het proces werd geen alcohol meer, doch azijnzuur en methaan gevormd, terwijl zij enkele uren daarna

wederom alcohol vinden en waterstof. LANGWELL en LLOYD HIND vestigen den indruk met eene reïncultuur te werken, doch het is wel verwonderlijk, dat zij, gezien de uitkomsten hunner proeven, er niet aan zijn gaan twijfelen, of deze meening geen herziening behoeft.

Voor een practische toepassing der cellulosegisting is echter geen reïncultuur noodig, ja zelfs zou de noodzakelijkheid om voor een goede gisting over een reïncultuur te moeten beschikken, een groot bezwaar opleveren.

De inleiders meenen nu, dat de produkten, ontstaan bij de vergisting van dit materiaal, belangrijk genoeg zijn, om de rentabiliteit van het proces te waarborgen. Zij deelen echter zeer weinig positieve gegevens hierover mede, hetgeen ook door de aanwezigen wordt opgemerkt, doch LANGWELL antwoordt hierop, dat hij meerdere gegevens niet kan mededeelen, omdat het hier een in ontwikkeling zijnde commerciële onderneming geldt. Nadien is deze kwestie blijkbaar niet meer ter sprake gekomen.

§ 2. Ondervindingen bij de vergisting van gebruikte hop.

Eigen onderzoek.

Proeven, ingezet met 100 gram gebruikte hop als vergistbaar materiaal en geënt met grachtmodder en met stalmest, toonden aan, dat dit materiaal zoowel bij hooge (60° C.) als bij lagere temperatuur (37° en 26° C.) slechts zeer langzaam wordt vergist. Wellicht is dit een gevolg, zooals door LANGWELL en LLOYD HIND werd opgemerkt, van de aanwezigheid van koper. Zij zeggen dit bezwaar te hebben overwonnen door middel van zwavelwaterstof, waardoor de koperverbindingen in onopgelosten vorm geraken en dan niet meer schadelijk zouden zijn voor de betreffende organismen. Bij mijne proeven hierover heeft dit echter niet tot een resultaat geleid. Uitwasschen met water

bleek nog het beste middel te zijn, om eene hoggisting op gang te krijgen, toch bleef de gistingssnelheid zeer gering, zoodat ik de proeven niet verder heb voortgezet.

Het lijkt mij echter zeer wel mogelijk, dat in de toekomst zal blijken, dat dit materiaal best tot een snelle vergisting is te brengen, doch de kans op eene rentabiliteit van de door LANGWELL en LLOYD HIND bedoeld proces, de cellulose-waterstofgisting, acht ik zeer gering, omdat het winnen van de betrekkelijk kleine hoeveelheden alcohol en azijnzuur wel niet de moeite waard zal wezen. Geheel anders wordt het, wanneer het gelukt uit dergelijk materiaal een snelle volkomen dissimilatie tot koolzuur en methaan te verkrijgen, omdat het laatste produkt van hooge verbrandingswaarde in groote hoeveelheid zal ontstaan en uiterst gemakkelijk is te winnen.

§ 3. Methaangisting uit koolafval bij verschillende temperatuur. ¹⁾

Het zijn dus, zooals gezegd, de methaangistingen, welke de meeste kans bieden op een rendabele praktische toepassing, waarbij men als enig produkt slechts de gassen opvangt. Indien daarvan meer dan de helft uit methaangas bestaat, is het mengsel aan de lucht brandbaar, zonder dat eenige verdere bewerking noodig is.

Over een reïncultuur der cellulose-methaangisting beschikken we niet, doch gebleken is, dat deze gisting steeds met mest als entmateriaal optreedt, hetgeen dus door zijn eenvoud een groot voordeel is.

Of het winnen van methaan door deze processen uit waarde-looze afvalprodukten economisch rendabel is, valt moeielijk te beoordeelen en zal voor elk geval afzonderlijk moeten worden uitgemaakt. Het is echter ook mogelijk, dat, afgezien van eene

¹⁾ Een deel dezer proeven is uitgevoerd door den heer VAN STEEN.

rentabiliteit, praktische toepassing dezer dissimilatieprocessen van beteekenis kan zijn, waar het van belang is, snel groote hoeveelheden organische afvalstoffen op te ruimen; ik denk hierbij aan stadsvuil, dat voor een belangrijk gedeelte uit papier en etensresten bestaat, of ook aan de afvalprodukten van groentenveilingen e.d., welke stoffen tegenwoordig nog dikwijls in de openbare wateren terecht komen tot schade van den vischstand en hinder voor de onwonenden.

Om deze reden zijn een aantal proeven verricht over de methaanproductie uit afval van kool, waarbij beantwoording van de vraag, bij welke temperatuur de gisting het snelst plaats had en waar de opbrengst aan methaan het grootst was, als doel werd beschouwd.

De proef wordt op de volgende wijze ingericht:

Erlemeyers van 1 Liter inhoud worden onderste-boven in een driepootstatief gehangen; de hals is afgesloten met een doorboorde stop, waardoor een buis rijkt tot dicht aan den bodem. Zij zijn alle gevuld met een cultuurvloeistof bestaande uit:

leidingwater	1000	cc.
NH ₄ Cl	1	gr.
K ₂ HPO ₄	1	„
MgSO ₄	0,5	„
CaCO ₃	10	„
afval van spruitkool	100	„

De gistingsgassen, welke zich verzamelen boven de vloeistofspiegel dicht onder den bodem van de omgekeerde Erlemeyer worden door de genoemde buis, welke tweemaal is omgebogen, buiten den themostaat geleid, waar deze buis door middel van lak aan een volgende is verbonden, die de gassen leidt in een met een verzadigde keukenzoutoplossing gevulde buret. Deze methode was noodzakelijk gebleken, omdat bij

gebruik van een erlemeyer of kolf als gistingsvat, terwijl deze op de gewone wijze op hunnen bodem rustend in den thermostaat staan, de gistende stukken koolblad, met de gassen omhoog komend, blijven hangen aan de wanden van het steeds nauwer wordende vat en zich dus door uitdroging aan de gisting onttrekken.

De proeven werden nu gedaan bij 60°, 37° en bij 26° C., terwijl bij elke temperatuur één erlemeyer met grachtmodder en één met stalmest werd geënt. De met modder geënte bij 60° kwam ditmaal niet goed op gang (bij de orienteerende proeven was dit zonder bezwaar geschied), zoodat we bij deze temperatuur alleen de met mest geënte overhouden.

De gistingssnelheden zijn nu voortdurend bepaald en van tijd tot tijd zijn gasanalyses verricht. Onderstaande tabellen geven een aantal der waargenomen snelheden en de uitkomsten der gasanalyses.

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 60° C., geënt met mest.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyse hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
18-2	4 uur	4,0			
19-2	11 uur v.m.	10,0			
19-2	4 uur	6,0	83,85	8,22	0,0
23-2	8 uur n.m.	4,0			
25-2	3 uur 45	4,0	66,22	0,0	31,86
3-3	5 uur	8,8			
4-3	10 uur v.m.	9,6			
4-3	4 uur 30	11,2	36,85	0,0	50,86
6-3	7 uur	20,0			
7-3	2 uur	23,1	35,65	0,0	60,72
10-3	5 uur	20,1			
13-3	7 uur 30 n.m.	16,9			
19-3	10 uur 45 v.m.	9,7			
24-3	9 uur 30 v.m.	5,7			

Hieruit zien we, dat eerst een snelle gisting plaats heeft, welke echter een waterstofgisting blijkt te zijn, doch spoedig verandert deze in een methaangisting. Op 24 Maart is de snelheid weer tot 5 cc. per uur gedaald en is ongeveer 8700 cc. gas geproduceerd. Er wordt nu wederom 100 gram koolblad (drogestofgehalte 19,7 %) toegevoegd.

De gistingssnelheden en gasanalyses zijn voor een deel in onderstaande tabel gegeven.

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 60° C.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyse hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
25-3	1 uur 55	28,2			
25-3	5 uur 20	50,2	62,3	1,0	31,0
26-3	10 uur 45 v.m.	33,6			
27-3	2 uur 35	27,5	63,8	0,0	34,0
29-3	2 uur 45	39,3	50,8	0,0	46,0
30-3	10 uur n.m.	39,0	38,9	0,0	57,1
1-4	7 uur 15 n.m.	27,8	36,9	0,0	61,0
5-4	3 uur 45	12,3	36,6	0,0	61,0
11-4	4 uur	10,0	37,3	0,0	61,3
13-4	—	—	36,8	0,0	61,7

De gistingssnelheid is nu tot op ongeveer 10 cc. gas gedaald, er is totaal ruim 9,5 Liter gas geproduceerd. Opnieuw wordt nu 100 gram koolblad toegevoegd, wat tot gevolg heeft een weder dalen van het gehalte methaan en een verder stijgen van de gistingssnelheid. Er wordt nu echter ook in den aanvang geen waterstof meer gevormd en na vier dagen is de hoeveelheid methaan weder tot 62,7 % gestegen.

Een overeenkomstige proef bij 37° C. leverde de volgende cijfers. Vergist wordt 100 gram blad van spruitkool met een drogestofgehalte van 02.35 %.

Gisting van 100 gram koolafval bij 37° C., geënt met mest.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyse hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
16-2	5 uur	0,0			
18-2	4 uur	10,4			
19-2	11 uur v.m.	13,7			
19-2	3 uur	9,0	85	15	0,0
25-2	3 uur	5,0	77,8	0,0	17,0
9-3	8 uur n.m.	1,3			

De gisting blijkt dus gedurende verscheidene dagen een waterstofgisting te zijn, naderhand treedt een zwakke methaan-gisting op.

Op 5 Maart is de snelheid zeer gering geworden; er is nu totaal ongeveer 2300 cc. gas geproduceerd. Nu wordt de rest van het nog slechts uiterst langzaam gistend koolblad uit de vloeistof gehaald en opnieuw 100 gram koolblad toegevoegd (drogestofgehalte 19,7 %).

Eenige der waargenomen gistingssnelheden en de uitkomsten der gasanalyses zijn neergelegd in onderstaande tabel.

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 37° C., geënt met mest.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyses hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
5-4	12 uur 15 n.m.	0,0			
5-4	7 uur n.m.	25,1			
5-4	11 uur 30 n.m.	92,9			
6-4	7 uur 50 n.m.	10,6	56,9	38,8	0,0
8-4	2 uur	9,4	84,8	0,0	12,5
11-4	5 uur 15	3,4	77,9	0,0	20,0
14-4	12 uur 30 n.m.	4,0	65,7	0,0	27,5
17-4	7 uur 15 n.m.	3,2	63,5	0,0	31,3
21-4	—	—	60,1	0,0	35,0
25-2	—	—	58,7	0,0	37,5

De tweede gisting vangt dus aan met een zeer hoge gistingssnelheid, deze gisting blijkt echter een waterstofgisting te zijn. De hierop volgende methaangisting verloopt zeer langzaam, het percentage methaan stijgt niet vlug.

Een overeenkomstige proef bij 37° C. met modder als ent-materiaal leverde in de tweede gisting van 100 gram koolblad (droge stof 19,2 %) de volgende uitkomsten der gistingssnelheden en der verrichte gasanalyses:

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 37° C., geënt met modder.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyses, hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
24-3	7 uur n.m.	12,1			
24-3	10 uur 30 n.m.	90,0			
25-3	9 uur 45 v.m.	71,1			
25-3	1 uur 55	14,6	61,2	34,4	0,0
27-3	3 uur	7,1	77,9	0,0	10,1
30-3	7 uur	5,3	68,3	11,3	16,7
1-4	7 uur 15 n.m.	1,3	71,4	0,0	21,7
3-4	—	—	73,8	0,0	22,5
9-4	4 uur 45	1,6	69,8	0,0	27,5
13-4	—	—	66,5	0,0	29,5

Het resultaat stemt dus geheel overeen met de met mest geente gisting bij 37°. Eerst treedt een zeer snelle waterstofgisting op, welke spoedig plaats maakt voor een langzame methaangisting.

Dezelfde proeven werden gedaan bij 26° C.. 100 gram koolblad (droge stof 20,4 %) werd in dezelfde cultuurvloeistof met mest als ent-materiaal vergist. De uitkomsten der snelheidswaarnemingen en die der verrichte gasanalyses zijn verenigd in onderstaande tabel.

De vergisting van 100 gram koolafval bij 26° C., geënt met mest.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyses, hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
19-2	11 uur v.m.	6,3	58,2	31,2	0,0
24-2	5 uur	4,0			
25-2	4 uur	2,8	92,6	—	—
4-3	10 uur v.m.	1,0			
24-3	9 uur 30 v.m.	5,8			
27-3	3 uur 15	8,0	40,6	0,0	49,2
30-3	3 uur 50	15,1	32,7	0,0	60,5
4-4	2 uur	11,6	21,3	0,0	74,0

De gistingssnelheid begint nu weer te dalen, daarom is de nog onvergiste hoeveelheid blad er uit gehaald en opnieuw 100 gram verwelkt spruitkoolblad (droge stof 19,7 %) toegevoegd, teneinde de gistingssnelheid weder op te voeren. De resultaten van deze gisting zijn neergelegd in onderstaande tabel.

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 26° C., geënt met mest.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyses, hoeveelheid in %		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
5-4	7 uur 15 n.m.	36,9			
5-4	11 uur 30 n.m.	60,7			
6-4	9 uur 30 v.m.	50,0			
6-4	11 uur v.m.	38,7	77,0	5,0	12,7
7-4	2 uur	28,2	73,9	0,0	22,5
8-4	7 uur 30 n.m.	16,6	59,4	0,0	34,9
10-4	7 uur 25 n.m.	12,6	48,2	0,0	48,8
14-4	7 uur 25 n.m.	11,4	33,6	0,0	59,4
18-4	3 uur 30	3,7	32,7	0,0	62,7
23-4	—	—	33,6	0,0	62,8
25-4	—	—	33,5	0,0	62,6

Het resultaat is dus weder een zeer snelle gisting in den aanvang, wanneer er nog maar zeer weinig methaan wordt gevormd en daarna een vrij langzame gisting waarbij echter de hoeveelheid methaan veel grooter wordt en waarvan het percentage overeenkomt met de gisting bij 60°.

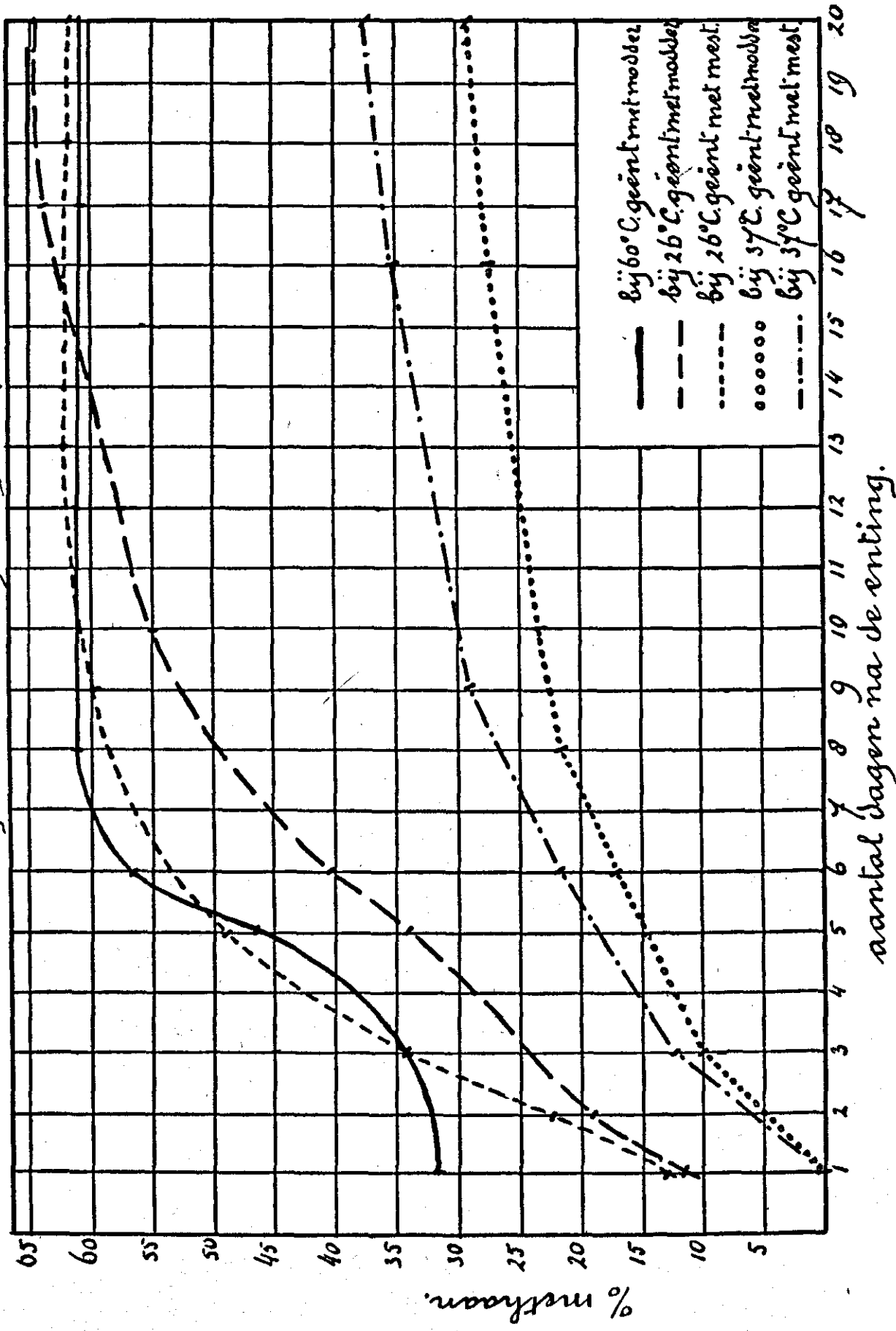
Eenzelfde gisting is uitgevoerd met 100 gram verwelkt koolblad na enting met modder. De eerste gisting werd weder gebruikt voor het ophoopen der bacteriën, en wanneer de snelheid van deze gaat dalen, wordt het overblijvend blad vervangen door nieuw en de waargenomen gistingssnelheden, zoomede de uitkomsten der gasanalyses genoteerd. De gegevens zijn verzameld in onderstaande tabel. Het drogestofgehalte van het blad bedraagt ditmaal 19,2 %.

Tweede gisting van 100 gram koolafval bij 26° C., geënt met modder.

datum	tijd van opname	gistingssnelheid cc. gas per uur	gasanalyses, hoeveelheid in %.		
			CO ₂	H ₂	CH ₄
24-3	10 uur 30 n.m.	27,6			
25-3	9 uur 30 v.m.	45,4			
25-3	7 uur 30 n.m.	43,5	68,2	6,8	10,4
26-3	11 uur v.m.	37,3	77,7	0,0	19,3
28-3	9 uur 35 v.m.	22,3			
29-3	3 uur 25	18,3	64,8	0,0	34,6
30-3	2 uur 50	18,0	53,1	0,0	40,3
1-4	7 uur 15 n.m.	10,7	49,8	0,0	50,2
3-4	4 uur 30	10,2	42,2	0,0	56,6
5-4	4 uur 30	7,0	—	0,0	57,5
7-4	7 uur 15 n.m.	10,0	37,5	0,0	59,8
11-4	4 uur 15	9,6	30,0	0,0	64,0
13-4	—	—	30,2	0,0	64,1

De resultaten van deze gisting komen dus zeer overeen met de met mest geënte gisting van hetzelfde spruitkoolblad bij 26° C.

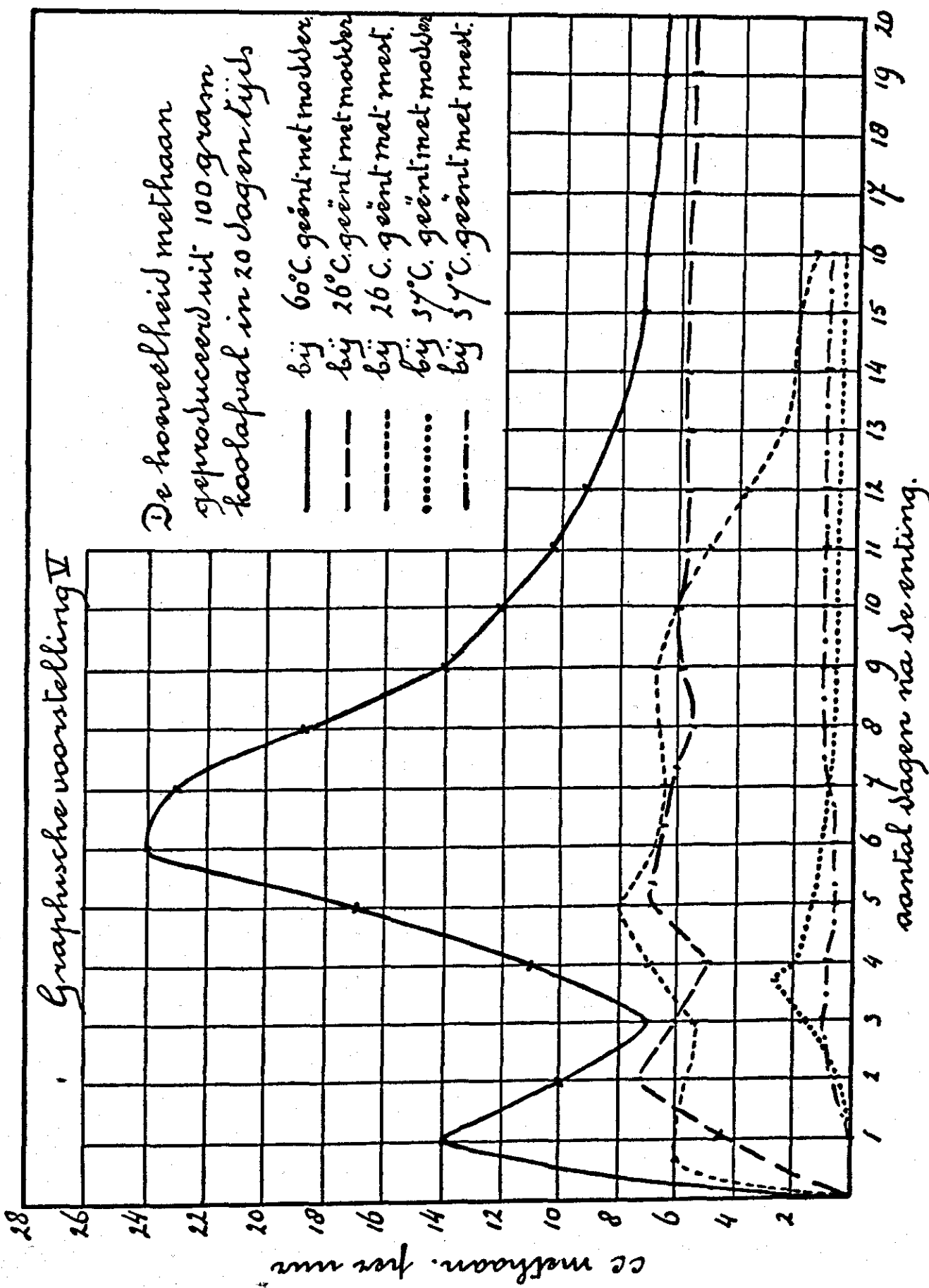
Graphische voorstelling IV
 Het percentage methaan in de gistingsgassen van koolafval,
 bij verschillende gistingstemperaturen.



Graphische voorstelling VI

De hoeveelheid methaan
geproduceerd uit 100 gram
koolafval in 20 dagen tijds

- bij 60°C. geënt met modder.
- - - bij 26°C. geënt met modder.
- · · · bij 26°C. geënt met mest.
- · · · · bij 37°C. geënt met modder.
- - - bij 37°C. geënt met mest.



aantal dagen na de enting.

Wanneer wij de uitkomsten van dit onderzoek naar de gistingssnelheden en de methaanproductie vergelijken, dan is reeds dadelijk te zien, dat de snelheid der thermophile gisting veel grooter is, dan die der mesophile gistingen, terwijl van deze laatsten die bij 26° het nog verre wint van die bij 37°, indien wij de zeer snelle waterstofgistingen, welke aan de methaangistingen vooraf gaan, buiten beschouwing laten. Deze waterstofgistingen worden ongetwijfeld veroorzaakt door de boterzuurgisting van de in het blad aanwezige zetmeel, vandaar, dat de duur van dit proces maar zeer kort is.

De eerste gistingen, ingezet met het entmateriaal zijn gebruikt ter ophooping van de bacteriën, de tweede gistingen met deze ophoopingsculturen dienen ter vergelijking. In graphische voorstelling IV is aangegeven de percentages methaan, in de gassen dezer tweede gistingen; in graphische voorstelling V is uitgezet de hoeveelheid methaan geproduceerd uit 100 gram van dit koolblad gedurende de eerste 20 dagen derzelfde gistingen bij deze verschillende temperaturen.

De hoeveelheid methaan wordt gevonden door berekening uit de waargenomen gistingssnelheden en de uitkomsten der gasanalyses.

Hieruit zien we duidelijk het groote voordeel der thermophile gisting, welke na 20 dagen een veel grootere hoeveelheid methaan produceerde, dan de gistingen bij 28°, terwijl die bij 37° uiterst weinig hebben opgeleverd. Dit verschijnsel is in overeenstemming met het bij de bestudeering der methaangisting gevondene. Zooals in Hoofdstuk II is beschreven, bleek bij de bepaling der optimum, minimum- en maximumtemperatuur van de methaangistingen uit acetaat, dat er twee van elkander duidelijk te onderscheiden processen bestaan, een mesophile met een optimumtemperatuur van ongeveer 30° en een thermophile met een optimumtemperatuur van 60°, tusschen deze twee optimale gistingen ligt een temperatuur-

gebied waar vrijwel geen methaangisting plaats vindt.

Een eventueele toepassing der methaangistingen in de praktijk ter opruiming van groote hoeveelheden organisch materiaal en ter winning van gassen van een hooge verbrandingswaarde, zal dus het beste plaats kunnen vinden door middel van de thermophile bacteriën, omdat de gistingsnelheid bij lagere temperatuur te gering is. Het spreekt vanzelf, dat hier de toevoer van warmte aan het geïsoleerde gistingsvat een belangrijke post kan zijn op de creditzijde der rentabiliteit; alleen daar waar men toch de beschikking heeft over stoomleidingen voor andere doeleinden, zal dit van geen overwegend bezwaar zijn.

Een laboratoriumarbeid kan uit den aard der zaak echter slechts aangeven, waar de grootste kansen van slagen liggen, of werkelijke toepassing mogelijk is, zal, voor elk geval afzonderlijk, alleen in de praktijk zelve kunnen worden uitgemaakt.

SAMENVATTING

Voorop gesteld werd, dat de aanwezigheid van vele thermophile bacteriën in aan zelfverhitting onderhevige ophooping van organisch materiaal het vermoeden wettigde, dat deze organismen zeer waarschijnlijk een belangrijk aandeel zouden hebben in de dissimilatie dezer stoffen.

Het literatuuronderzoek bracht, behalve wat betreft de vergisting van cellulose door thermophile bacteriën, geen uitgebreide kennis omtrent deze processen.

Een kritische beschouwing der in de literatuur voorkomende reïncultuurbeschrijvingen der cellulosevergistende thermophile bacteriën deed twijfel ontstaan aan de reinheid der betreffende culturen.

Het experimenteel gedeelte bestond in het onderzoek naar de dissimilatie van vetzuren, zouten, zetmeel, suikers en cellulose bij temperaturen boven 55° C.

Gevonden werd, dat het calciumacetaat en calciumformiaat kwantitatief tot koolzuur en methaan werden vergist; een gisting, welke veroorzaakt werd door andere bacteriën, dan die bij lagere temperatuur, wat behalve uit het microscopisch onderzoek ook hieruit bleek, dat tusschen de optimumtemperatuur der mesophiele en die der thermophiele gistende bacteriën een temperatuurgebied lag, waarbij niet- of zeer slecht methaan-gisting uit vetzuren, zouten was te verkrijgen. Deze thermophile methaan-produceerende bacteriën konden door met groote hoeveelheden over te enten, gemakkelijk worden opgehoopt, waardoor de culturen belangrijk werden gezuiverd.

Evenals dit het geval is met de mesophile soorten, deed zich echter ook hier de moeilijkheid voor, dat geen overenting met een enkelen droppel tot hernieuwde gisting leidde en dat geen voedingsbodem kon worden gevonden, waarop koloniën werden gevormd. Het merkwaardige feit blijft dus bestaan dat, hoeveel werk hierover ook is verricht, zoowel door talrijke andere onderzoekers als door mijzelf, het nog nimmer gelukt is, een methaanproduceerende bacterie in reïncultuur te brengen.

Deze methaangistingen uit vetzuren zijn van belang, omdat gebleken was uit vroegere onderzoekingen, dat deze stoffen als eindprodukt gevormd worden bij de thermophile cellulosegisting, terwijl mijn eigen proeven hebben aangetoond, dat hetzelfde geschiedt bij de thermophile vergisting van suikers en van zetmeel.

Betreffende de cellulosegisting is uit het eigen onderzoek gebleken, dat, zulks in overeenstemming met enkele mededelingen in de literatuur, deze stof in ruwcultuur bij 60° C. zoowel tot koolzuur, waterstof en vetzuren, als tot koolzuur en methaan kan worden vergist.

De directe thermophile methaangisting van cellulose ging echter na herhaalde overentingen met een enkel stukje van het geel geworden gistende filtreerpapier over in de eerstgenoemde gisting, waarbij koolzuur en waterstof als gasvormige produkten optreden.

In verband hiermede werd het dan ook waarschijnlijk geacht, dat de thermophile cellulose-methaangisting veroorzaakt wordt door dezelfde bacteriën, als welke vetzuren bij hoge temperatuur vergisten, nadat deze produkten door de werking van andere, cellulose aantastende thermophile bacteriën, zijn ontstaan.

Ondanks een groot aantal proeven gelukte het niet deze cellulose tot vetzuren, koolzuur en waterstof ver-

gistende bacteriën te isoleeren. Wel was het mogelijk een thermophile cellulose-aantastende bacterie in reïncultuur te brengen, evenals dit door KELLERMAN en Mc.BETH is gedaan bij de bij lagere temperatuur verlopende Ommeliënski-gistingen. Ook hier treffen we hetzelfde merkwaardige verschijnsel aan, dat de aerobe niet gistende cellulose aantastende thermophile bacterie in grooten getale in de herhaaldelijk overgeënte anaerobe gistingen voorkomt.

De geïsoleerde bacterie is een sporenvormenden, streng aeroben staaf, welke op cellulose-agarplaten duidelijke oplossingsvelden doet zien en een optimumtemperatuur bezit van 55° C. Een beschrijving werd gegeven onder den naam van *Bac. thermo-cellulolyticus*, n.sp.

De veronderstelling werd uitgesproken, dat dit organisme wellicht, in samenwerking met andere, anaerobe, bacteriën de cellulose vergist. Eenige voorloopige proeven over een mogelijke symbiontische aantasting leidden echter niet tot positieve resultaten. Het is echter duidelijk, dat men hier een uiterst moeilijk terrein betreedt, dat in verband met dezelfde verschijnselen, die zich bij de cellulosegisting bij lagere temperatuur voordoen, een onderwerp kan zijn voor een op zich zelf staande uitgebreide studie.

Wat betreft de vergisting van zetmeel en suikers bij hooge temperatuur werd het volgende gevonden:

Uit de herhaaldelijk overgeënte gisting van zetmeel werd een aerobe thermophile bacterie geïsoleerd, welke zeer snel zetmeel tot oplossing bracht, doch niet giste. Het was een sporenvormenden staaf met een optimumtemperatuur van 55° C., welke niet kon worden geïdentificeerd met reeds in de literatuur beschreven thermophile diastasebevattende soorten.

De bacterie vormde eigenaardige koloniën op 2 % zetmeel-agarplaten, waarbij zij in de zetmeelkorrels doordrong. Na

24 uur bij 55° C. is een drie percentige stijfsel reeds voor het grootste gedeelte opgelost en na verloop van 9 dagen is ruim 80 % tot suikers omgezet; zuren worden slechts in uiterst geringe hoeveelheid gevormd. Een beschrijving werd gegeven onder den naam van *Bac. thermo-amylolyticus, n.sp.*

Uit de gistingen van suikers bij hooge temperatuur werd een krachtig gistende thermophile bacterie geïsoleerd, welk resultaat eerst na overwinning van bijzondere moeielijkheden, die uitvoerig in hoofdstuk IV zijn beschreven, kon worden verkregen.

De reincultuur vertoonde een krachtige gisting van suikers en zetmeel, welke processen kwalitatief en kwantitatief werden uitgewerkt. Dit onderzoek toonde aan, dat gevormd werd koolzuur, waterstof en een mengsel van organische zuren, voor het grootste gedeelte bestaande uit boterzuur en verder uit azijnzuur, melkzuur en een geringe hoeveelheid propionzuur. De bacterie was een facultatief-anaerobe sporenvormenden staaf en werd beschreven onder den naam *Bac. thermo-butyricus n.sp.* Zijn optimumtemperatuur lag bij 60° C.

Een vergelijkend onderzoek over de vergisting van saccharose, glucose, laevulose, gelijke deelen glucose en laevulose, maltose en zetmeel toonde aan, dat de verhouding der gevormde produkten, met name de hoeveelheid melkzuur en koolzuur, voor de saccharose- en zetmeelgistingen sterk afweek van die voor de vergisting der overige suikers, waaruit geconcludeerd werd, dat de vergisting dezer beide koolhydraten niet door een eenvoudige inversie wordt ingeleid.

Uit een onderzoek naar de vergisting van pyrodruivenzure calcium bleek, dat dit zout bij vergisting geen waterstof opleverde, zooals ook was te verwachten. Er werd echter tegen verwachting geen boterzuur gevormd, doch wel mierenzuur en azijnzuur, waaruit de conclusie werd getrokken, dat het onwaarschijnlijk moet worden geacht, dat pyrodruivenzuur,

zooals wellicht bij de alcoholische gisting en ook bij eenige bacteriële gistingen, als tusschenprodukt optreedt.

Daar het zoowel uit de suikergistingen als uit die van pyrodruivenzure calcium gelukte acetaldehyde door middel van de z.g. sulfietmethode van NEUBERG en REINFURTH aan te toonen, deed zich de moeielijkheid voor, hoe het was te verklaren, dat dezelfde bacterie in het eene geval uit acetaldehyde boterzuur en in het andere geval mierenzuur en azijnzuur produceerde. Naar aanleiding hiervan meende ik te moeten waarschuwen tegen de opvatting, dat het aantoonen van acetaldehyde door middel van z.g. „Abfangverfahren” als een vaststaand bewijs moet worden opgevat, dat deze stof werkelijk bij het gistingsproces als tusschenprodukt wordt gevormd.

Ten slotte werd de mogelijkheid van praktische toepassing der methaangistingen aan een korte bespreking onderworpen. Eenige proeven ingezet over de mogelijkheid, om door middel van deze gistingen een snelle opruiming van koolafval te verkrijgen tot koolzuur en methaan, toonden aan, dat de thermophile gisting veel sneller verliep dan de mesophile en dat bij een temperatuur van 37° C., d.w.z. tusschen die van de twee eerstgenoemde gistingen in, slechts zeer geringe methaanproductie plaats vond. Deze waarneming was in overeenstemming met het bij de methaangisting uit vetzure zouten reeds gevondene.

Het is niet onmogelijk, dat de thermophile methaangistingen, waar het geldt spoedig groote hoeveelheden organisch materiaal op te ruimen, van praktische beteekenis kunnen worden, daar zij tevens het voordeel hebben een enorme hoeveelheid gas van hooge verbrandingswaarde te produceeren.

ALPHABETISCH REGISTER DER GERAADPLEEGDE LITERATUUR

	zie in proefschr. bladz.
BERGEY, <i>Journal of Bacteriology</i> , vol. IX, 1919, p. 1.....	16
——— <i>Manual of determinative Bacteriology</i> , Williams & Wilkins Comp. Baltimore, 1923.....	63
BLAU, <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. XV, 1906, p. 117....	15
BOEKHOUT en DE VRIES, <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. XII	12
——— <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. 18,, 1907, p. 27....	12
——— <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. 21, 1908, p. 398... 12	12
——— <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. 23, 1909, p. 106... 12	12
——— <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. 44, 1915, p. 290... 12	12
——— <i>Verslagen van landbouwk. onderz. der rijkslandbouwproefstations</i> , No. XX, 1917, p. 79	85
CATTARINA, <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. XII, 1904... 14	14
CERTES en CARRIGOU, <i>Compt. rend. de l'Ac. des Sciences</i> , 1886, II, p. 703	4
COHN, <i>Beitr. zur Biologie der Pflanzen</i> , Bd. II, p. 271.....	11
DAMMON en FEIRER, <i>Journ. of Bact.</i> vol. X, 1925, p. 37.....	17
DONKER, <i>Bijdrage tot de kennis der boterzuur, bytylalcohol en acetongistingen</i> , proefschr. Delft, 1926.....	83
DUCLAUX, <i>Ann. de l'Institut. Pasteur</i> , 1895, p. 265	85
ELION, <i>Centralbl. f. Bakteriologie</i> , Abt. II, Bd. 63, 1924, p. 58... 6	6
ERMENGEM, VAN, <i>Traité de microbiol.</i> , 1887, p. 22.....	3
FÈVRE, LE, <i>Bijdrage tot de kennis der bacterieele gistingen</i> . Proefschrift Utrecht 1924	100,101
FOWLER en JOSHI, <i>Journ. of the Indian Institute of Science</i> , vol. 3, 1920, ref. in <i>Wochenschrift f. Brauerei</i> , Jahrg. XI, 1923, p. 170	122

FRED, PETERSON en VILJOEN, Abstr. of Bact. vol. 8, 1924.....	20,43,110
—— Journal of agricult. Science, vol 16, 1926, part I, p. I	
.....	20,43,110
GILBERT, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XLVII, 1904, p. 383.....	10
GLOBIG, Zeitschrift f. Hygiene, Bd. III, 1888, p. 294.....	7,8
GOLIKOWA, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 69, 1926,	
p. 178	9
HUTCHINSON en CLAYTON, Journ. of Agricultural Science, vol. IX,	
1918—1919, p. 143	105
HILDEBRANDT, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 71, 1927,	
p. 440.....	12
ITERSON, VAN, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. II, 1904,	
p. 689.....	104
KARLINSKI, Hygienische Rundsch., Jahrg. 5, 1895, p. 685.....	5
KELLERMAN en MC.BETH, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 34,	
1912, p. 485	104,115,120
KELLERMAN, MC.BETH, SCALES en SMITH, Centralbl. f. Bakteriolo-	
gie, Abt. II, Bd. 39, 1914, p. 502.....	105
KHOUVINE, MADAME, Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 37, 1923, p.	
741	20,43,106
KROULIK, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 36, 1913, p. 339	19
KRUYFF, DE, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 26, 1910,	
p. 65	8
—— Bull. du Dép. de l'Agricult. aux Indes Néerland. IV, No.	
XXX	49
LANGWELL en LLOYD HIND, Journal of the Instit. of Brewing, vol.	
29, 1923, p. 302, ref. in Wochenschr. f. Brauerei, Jahrg. XI,	
1923, p. 123	122
LANGWELL en LYMN, Journ. of the Soc. of Chem. Industr., T. 42,	
1923, No. 26	20,43,108
LAUPPER, Landwirtsch. Jahrb. der Schweiz, Jahrg. 33, 1919 en	
34, 1920.....	12
LAXA, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. IV, 1898, p. 362....	13
MC.BETH en SCALES, U. S. dep. of Agricult. bureau of plant industr.	
bull. No. 266, 1913	105
MACFAYDEN en BLAXALL, Transact. of Jenner Inst. of prevent.	
Medic. serie 2, 1899, ref. in Wochenschr. f. Brauerei, Jahrg. XI,	
1923, p. 170	19,105
—— British Medic. Journ., vol. II, 1894, p. 664.....	11

MACFAYDEN en BLAXALL, Journ. of Path. and Bact., vol. 3, 1896, p. 87	19,105
MICHAELIS, Archiv f. Hygiene, Bd. 36, 1899, p. 285.....	14
MIEHE, Arb. der deutsch botan. Gesellsch., 1893, p. 66.....	11
—— Die selbsterhitzung des Heues, G. Fisscher, Jena, 1907...	11
—— Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 22, 1909, p. 462...	11
—— Arb. der deutsch landwirtsch. Gesellsch. 196, 1911.....	11
—— Naturwissensch. Wochenschr. N. F. Bd. 18, 1919.....	11
—— Ill. landwirtsch. Zeit. Bd. 42, 1922.....	11
MIQUEL, Bull. de la statistique municip. de Paris, No. de Déc., autoref. in Ann. de Montsouris, 1881, p. 464.....	3
MIQUEL en VAN TIEGHEM, Ann. de micrographie, t. I, 1888—'89, p. 4	4
MISCHUSTIN, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 71, 1927, p. 416	12
MOLISCH, Im Lande der Aufgehenden Sonne, J. Springer, Wien, 1927	6
MORRISON en TANNER, Journ. of Bacteriology, vol. XII, 1922, p. 343	16
MYOSHI, Journ. of the coll. of Science, Tokyo, vol. X, pt. 2, 1897..	5
NOACK, Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. 51, 1912, p. 593.....	12
NEUBERG en COHN, Bioch. Zeitschr., Bd. 139, 1923, p. 527	106
NEUBERG en REINFURTH, Bioch. Zeitschr., Bd. 89, 1918, p. 389....	97
—— Bioch. Zeitschr., Bd. 106, 1920, p. 281.....	98
OMMELIANSKI: Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 8, 1902, p. 193. 225, 257, 289, 321, 353, 385 en 605, Bd. 11, 1904, p. 369 en 703	105,106
OPRESCU, Archiv f. Hygiene, Bd. 33, 1898, p. 164.....	14
PRINGSHEIM, H. S. Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 78, 1912, p. 266	106
—— Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 38, 1915, p. 513..	20
RABINOWITSCH, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 20, p. 154	13
SAMES, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 33, 1900, p. 313.....	15,18,64,93
SCHARDINGER, Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- und Genuss- mittel, Jahrg. 6, 1903, p. 865	16,64,95
—— Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 22, 1908, p. 98..	59
—— Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 29, 1911, p. 188..	59
SCHILLINGER, Hygienische Rundschau, Jahrg. 8, 1898, p. 568..	18,64,95
SCHOORL, Organische analyse, Amsterdam, 1920.....	80,85
SCHROEDER, Die Naturwissensch., Jahrg. 7, 1909, p. 27.....	103
SÖHNGEN, Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder den invloed van het organisch leven, proefschrift, Delft, 1906	29

SÖHNGEN, Centralbl. f. Bakteriologie, Abt. II, Bd. 40, 1914, p. 445..	104
TANNER en HARDING, Journ. of Bacteriology, vol. XI, 1926, p. 96	17
TANNER en WALLACE, Journ. of Bacteriology, vol. X, 1925, p. 421	10
TEICH, Hygienische Rundschau, Jahrg. 6, 1898, p. 1094.....	5
TSIKLINKY, Ann. de l'Institut. Pasteur, T. XIII, 1899, p. 500.....	6
——— Ann. de l'Institut. Pasteur, T. XVII, 1903, p. 217	9
WEINZIRL, Journ. of Medic. Research, vol. XXXIX, 1919, p. 349	16