

~~1926~~
UNO 201, 23

WAARNEMINGEN OMTRENT DEN BACTERIOPHAAG BIJ BAC. DANICUS EN B. RADICICOLA

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE LANDBOUWKUNDE AAN DE LANDBOUW-
HOOGESCHOOL TE WAGENINGEN, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS IR. B. VAN DER BURG,
HOOGLEERAAR IN DE ZUIVELBEREIDING EN DE
MELKKUNDE, VOOR EENE, — OVEREENKOMSTIG
ART. 46, LID 4 VAN DE WET VAN 15 DECEMBER 1917
TOT REGELING VAN HET HOGER LANDBOUW-
EN HOGER VEEARTSENIJKUNDIG ONDERWIJS
(STAATSBLAD No. 700), ZOALS DIE LAATSTELIJK
IS GEWIJZIGD BIJ DE WET VAN 29 JUNI 1925
(STAATSBLAD No. 283), — DAARTOE BENOEMDE
COMMISSIE UIT DEN SENAAT, TE VERDEDIGEN
OP VRIJDAG, DEN 9^{EN} JULI 1926,
DES NAMIDDAGS TE DRIE UUR, DOOR

ARNOLDUS GRIJNS
GEBOREN TE UTRECHT



Bibliotheek
der
Landbouw Hogeschool
WAGENINGEN

H. VEENMAN & ZONEN — WAGENINGEN

1926

STELLINGEN

I

De methode van COMBER ter bepaling van den zuurgraad van den grond kan in handen van den ervaren onderzoeker slechts ter oriëntering dienen; leeken kunnen er meer schade dan nut mede doen.

II

Het is noodig bacterie-tellingen in grond, rivierwater, enz. gepaard te doen gaan met bepaling van het aantal protozoën.

III

De bij het onderzoek van zaden gangbare term „gebruikswaarde” is misleidend.

IV

De landbouwwetenschap brenge haar naam niet in discredit door onderzoekingsmethoden, waarvan de waarde nog niet voldoende vaststaat, onder practici te propageeren.

V

De afwatering van de provincie Utrecht via de Vecht is van dien aard, dat afsluiting der Zuiderzee urgent is.

VI

De staat is moreel verplicht de polderbesturen tegemoet te komen in de kosten van het wegonderhoud, voor zoover het doorgaand verkeer schuld heeft aan de vernieling der wegen.

VII

Het dient in 't algemeen, doch in 't bijzonder op zuivelbedrijven, slachterijen, enz. verboden te zijn ongedierte te verdelgen door het verwekken van infectieziekten (paratyphus B, e.d.).

VIII

De overheid verzette zich met kracht tegen het streven om de vaccinatiedwang af te schaffen en voorkome misbruik van de bestaande uitzonderingsbepalingen.

IX

Het is gewenscht het projecteeren van de wegen en watergangen der Zuiderzeepolders niet alleen op utiliteitsdoch ook op aesthetische gronden te baseeren.

X

De proeven met betrekking tot „electro-cultuur” hebben niet aan de gestelde verwachting voldaan.

Het is niet slechts ter wille van de traditie, doch ook uit groote waardeering, dat ik U, Hoogleraren der Landbouwhoogeschool, die tot mijn vorming hebt bijgedragen, dankzeg voor het genoten onderwijs.

Inzonderheid U, Hooggeleerde SÖHNGEN, ben ik zeer veel dank verschuldigd niet alleen voor de gelegenheid, die Gij, Hooggeachte Promotor, mij boodt om in Uw laboratorium mijn proefschrift te bewerken, maar ook voor Uw steun en belangstelling bij den arbeid ondervonden. Het doet mij leed eerlang den vriendschappelijken omgang met U te moeten missen.

Hooggeleerde GILTAY, met dankbaarheid gedenk ik Uwe fundamenteele colleges, die in al hun eenvoud zoo aantrekkelijk en instructief waren.

U, Hooggeleerde OLIVIER, hebt er door Uw helder betoog eveneens veel toe bij gedragen het begin mijner studie aantrekkelijk te maken, terwijl ik onder Uw gewaardeerde leiding, Hooggeleerde ABERSON, de eerste wankele schreden op het pad der experimenteele wetenschap mocht zetten.

Ook richt ik een woord van dank tot U, Hooggeleerde MAYER GMELIN en Hooggeleerde VISSER, voor de welwillendheid, die U mij in de laatste studie-periode betoonde.

Tenslotte gedenk ik Uw door mij zoo gewaardeerde vriendschap, waarde WIERINGA en COOLHAAS, Gij, die door menige raadgeving aan het tot stand komen van dit proefschrift hebt bijgedragen, en betuig mijn dank aan de amanuenses van het Laboratorium voor Microbiologie, die steeds mijn buitensporigen agar-honger wisten te stillen.

INHOUD

	Bladz.
Inleiding	9

EERSTE DEEL

Hoofdstuk 1. Het wezen van den bacteriophage.....	14
„ 2. Afstervingsproeven uit de litteratuur.....	19
„ 3. Onderzoekingsmateriaal.....	34
„ 4. Afstervingsproeven met den bacteriophage	42
„ 5. Bespreking van de resultaten der afstervingsproeven	62

TWEEDE DEEL

Eenige waarnemingen omtrent lysis in dichte bacterie-suspensies	75
---	----

DERDE DEEL

Steriel gekweekte klaverplanten produceeren geen bacteriophage	92
--	----

INLEIDING

Het is thans meer dan tien jaar geleden, dat TWORT ¹⁾ voor 't eerst het verschijnsel der bacteriophagie nauwkeurig beschreef. Ongetwijfeld hebben reeds lang voor dien tijd verscheidene onderzoekers met een bacteriophagaag kennis gemaakt, zonder dat deze evenwel hun aandacht vermocht te trekken; van HANKIN, HAFFKINE en ELIAVA ²⁾ staat dit vrijwel vast.

Bij zijn proeven over het kweeken van een filtreerbaar virus steriliseerde TWORT een vaccin van een kalf met glycerine en streek dit mengsel uit op agar, even voordat volkomen steriliteit werd bereikt. De micrococccen-koloniën, welke na verblijf in de broedstoof opkwamen, vertoonden doorzichtige plekjes (watery areas), die door infectie op normale koloniën waren over te brengen, doch bij overenting op agar geen groei te voorschijn riepen. De stof, die dit verschijnsel teweegbracht, bleek bij hooge concentratie den bacterie-groei op agar volkomen te kunnen verhinderen, terwijl bij sterke verdunning (1 : 1.000.000) de cultuur-laag slechts hier en daar doorzichtig werd. Toevoeging aan een jonge bacterie-cultuur in bouillon veroorzaakte binnen korten tijd het weder helder worden van de vloeistof. Het agens werd door filtratie met een kaars van CHAMBERLAND zonder moeite van de bacteriën gescheiden en kon door steeds opnieuw in jonge bouillon-culturen over te enten eindeloos worden vermenigvuldigd. Vermeer-

¹⁾ Lancet 189. II. 1241 (1915).

²⁾ D'HÉRELLE, le Bactériophage, son rôle dans l'immunité, pag. 5—8.

dering ten koste van doode bacteriën of organische stoffen had echter niet plaats. Een temperatuur van 60° maakte de stof binnen één uur onwerkzaam. Naverwante organismen werden, hoewel zwakker, eveneens beïnvloed, verder afstaande in het geheel niet.

TWORT opperde reeds verschillende hypothesen, ten einde een verklaring voor de gevonden feiten te geven. De mogelijkheid bestond, dat door de bacteriën een enzym werd afgescheiden, dat het vermogen had de bacteriën zelf uiteen te doen vallen; een soort autolyse dus. Of wel, de bacteriën gaan over in een tot nu toe onbekenden vorm, welke andere bacteriën prikkelt datzelfde te doen; in dezen toestand passeeren zij de filterkaars en zijn op geen enkele bekende wijze te cultiveeren. TWORT heeft ook nog aan een ultra-virus gedacht, maar daar infectieproeven bij dieren niets opleverden, heeft hij dit idee laten varen. Zijn conclusie is, dat men het verschijnsel beschouwen moet als een acute besmettelijke ziekte (acute infectious disease) onder de bacteriën of, zoo men wil, als een autolyse, die van de eene bacterie op de andere wordt overgebracht.

Het werk van TWORT vond niet de belangstelling, die het verdiende, en was spoedig vergeten.

In 1917 verschenen de eerste artikelen van D'HÉRELLE over een dergelijk verschijnsel, als TWORT beschreven had. Bij een lijder aan dysenterie, veroorzaakt door Shiga-bacillen, werd tegelijk met het intreden van het herstel een stof in de faeces aangetroffen, welke het vermogen had den groei van Shiga-bacillen in bouillon te verhinderen en een suspensie ervan binnen weinige uren te doen verdwijnen (lysis). Een druppel van een opgeloste cultuur bij een nieuwe suspensie gebracht was voldoende om deze hetzelfde lot te doen ondergaan. Een suspensie gemengd met een weinig verdund lysaat op agar uitgestreken vertoonde na verblijf in de broedstoof open plekjes (plages) in de cultuurlaag, zooals ook TWORT ze beschreef.

Het aantal plages bleek omgekeerd evenredig aan de verdunning van het lysaat en derhalve een maat voor de concentratie van de bacterie-oplossende stof te zijn. Tijdens het oplossen van een suspensie liep deze concentratie zeer snel omhoog.

Op grond van zijn uitgebreide en scherpzinnige onderzoekingen kwam D'HÉRELLE al spoedig tot de overtuiging, dat hij hier te doen had met de werking van een ultramicrobe, welke slechts als parasiet ten koste van jonge bacteriën leven kan. Aangezien deze microbe naar zijn meening een normale darmbewoonster is en daar als parasiet van *B. coli* leeft, noemde hij haar „Bacteriophagum intestinale”. Door aanpassing zou de bacteriophagaag in staat zijn andere bacteriën op te lossen en daardoor het dierlijk lichaam in den strijd tegen pathogene indringers kunnen steunen.

Het zal niemand verwonderen, dat D'HÉRELLE als medicus de praktische waarde van zijn ontdekking dadelijk in therapeutische en prophylactische richting zocht. Het moet erkend worden, dat op dit gebied door hem reeds spoedig goede resultaten bereikt zijn. Bij verscheidene lijdens aan dysenterie werd na toediening van een bacteriophagaag, welke virulent was ten opzichte van Shiga-Kruse-bacillen, binnen korten tijd een aanmerkelijke verbetering waargenomen; met het verschijnen van den bacteriophagaag in de faeces begon de genezing.

BECKERICH en HAUDUROY constateerden denzelfden gunstigen invloed bij gevallen van typhus en paratyphus. Gaven zij den juisten bacteriophagaag, dan trad reeds na 2 of 3 uur een sterke reactie op in den vorm van temperatuursverhooging en zweetafscheiding, terwijl na 24 uur de genezing begon. Gunstige resultaten werden ook bij coli-infecties, furunculose en miltvuur verkregen ¹⁾.

¹⁾ Drie voordrachten over het verschijnsel der Bacteriophagie door F. D'HÉRELLE. Vertaling Dr. W. STORM VAN LEEUWEN, pag. 48.

Bij door typhus aangetaste kippen kon door D'HÉRELLE bij injectie van een voor *B. gallinarum* virulenten bacteriophage de mortaliteit van 95 tot 5 % worden teruggebracht. Het meeste succes werd echter in Cochinchina behaald met de daar zeer gevreesde buffelziekte, de Barbone, veroorzaakt door de *Pasteurella*. Ieder aangetast dier was tot nu toe ten doode opgeschreven. Door injectie van een passenden bacteriophage werd na korten tijd een blijvende immuniteit verkregen, zoodat van 5000 ingespoten buffels geen enkele meer het leven behoefde te laten.

Het zal aan weinig buitenstaanders bekend zijn, dat ook reeds eenige onzer vaderlandsche landbouwers in belangrijke mate van het werk van D'HÉRELLE hebben geprofiteerd.

KRAMER ¹⁾ heeft n.l. in ons land de werking nagegaan van bacteriophage-injecties bij kippen, welke lijden aan Kleinsche ziekte. Deze ziekte brengt groote schade teweeg en komt geregeld voor in streken met intensieve kippenhouderij; meestal begint zij acuut met de sterfte van 3 à 4 per dag in één koppel om later chronisch te verlopen. Bij een aantal gevallen in de practijk werd de ziekte met succes door middel van Kleinsche ziekte-bacteriophage bestreden. Het volgend geval is wel zeer overtuigend: van een koppel van 377 kippen stierven in drie weken tijds 60 kippen. De overgebleven 317 exemplaren, waarvan een groot deel reeds suf en zwaar ziek was, werden met 0,1 cc. bacteriophage ingespoten. Na dien is er geen enkele kip meer gestorven. In 20 gevallen, zooals uit zijn dissertatie blijkt, werd deze methode met succes toegepast.

D'HÉRELLE is door zijn ervaringen met den bacteriophage op het gebied der immuniteit tot geheel nieuwe denkbeelden gekomen. Er is tot nu toe nooit een plausibele verklaring ge-

¹⁾ Y. M. KRAMER, Bijdrage tot de kennis van de rol van den Bacteriophage bij infectie en immuniteit. — Diss. Veeartsenijk. Hoogeschool, Utrecht, 1925.

geven voor het feit, dat een epidemie of epizoötie zich aanvankelijk sterk uitbreidt en daarna plotseling tot stilstand komt, hoewel de virulentie der betreffende bacterie door de steeds herhaalde mensch- of dierpassage eerder moest stijgen dan afnemen. D'HÉRELLE meent de oplossing gevonden te hebben in het optreden van een virulenten bacteriophage, die eerst slechts hier en daar aanwezig is, spoedig echter door infectie zich onder menschen of dieren verspreidt en tenslotte aan de ziekte een halt toeroept. De immuniteit is dus evenzeer besmettelijk als de ziekte zelf. Dierproeven maakten dit standpunt aannemelijk.

Daar nu de ontdekking van den bacteriophage op dit bijzondere gebied zulke ongedachte nieuwe perspectieven opent, is het a priori niet uitgesloten, dat dit ook op het terrein der bodembacteriologie het geval is, al kan men zich dat niet dadelijk indenken.

Zeker is, dat de kans om in dit opzicht iets te bereiken, toeneemt met de kennis, die wij van het wezen van den bacteriophage hebben. Dat is dan ook de reden, dat dit onderzoek zich meer speciaal heeft bezig gehouden met de vraag, of het niet mogelijk zou zijn het wezen van den bacteriophage dichter dan tot nu toe te benaderen.

EERSTE DEEL

EERSTE HOOFDSTUK

HET WEZEN VAN DEN BACTERIOPHAAG

De opvatting van D'HÉRELLE en vele andere onderzoekers, die den bacteriophagaag als levend wezen beschouwen, wordt in hoofdzaak op de volgende punten gebaseerd:

1e. Het is gelukt den bacteriophagaag zich te doen aanpassen aan de schadelijke werking van antiseptica door hem achter-eenvolgens over te enten in bacteriën-suspensies met stijgende hoeveelheden van deze stoffen. D'HÉRELLE constateerde dit voor glycerine, PRAUSNITZ ¹⁾ voor phenol en SCHURMAN ²⁾ voor chinosol. De laatste beschreef een overeenkomstig effect bij een te hoogen zuurgraad van het milieu.

2e. Elke bacteriophagaag heeft het vermogen bepaalde bacteriën tot oplossing te brengen, bijvoorbeeld: *B. coli* en dysenteriae, *Bac. typhosus* en paratyphosus of combinaties van verder uitéén staande soorten als staphylo-coccen en coli-bacillen, *B. pestis* en coli, etc. Deze zoogenaamde „plurivalentie” blijft met geringe wijzigingen in de zwakkere valenties, welke kunnen uitdooven of er nieuw bijkomen, bestaan bij langdurige overenting via verschillende hoofdvalenties.

3e. De bacteriophagaag heeft een wisselende virulentie. Van een pas geïsoleerden bacteriophagaag kan men haar sterk verhoogen door eenige malen over te enten op een gevoeligen

¹⁾ Centralbl. f. Bakt., 93, 148.

²⁾ Diss. Leiden 1925, pag. 87.

bacteriestam. SCHUURMAN (1.c.) toonde aan, dat men een bacteriophage, die oorspronkelijk weinig actief is voor een bepaalden bacteriestam, duidelijk in virulentie voor dien stam kan doen stijgen, door hem eerst over te enten op minder resistente bacteriën, waaruit sommige koloniën van dien stam blijken te zijn opgebouwd.

4e. De bacteriophage vermeerdert zich, zoodat men hem eindeloos van suspensie op suspensie overenten kan. Had er geen vermeerdering plaats, dan moest de lysis na een aantal overentingen door te groote verdunning van het oorspronkelijke filtraat tenslotte niet meer kunnen optreden.

5e. Daar slechts het steriele filtraat bij overenting toegevoegd wordt aan de bacterie-suspensie, is elk direct contact tusschen de bacteriën van de oude en de nieuwe suspensie uitgesloten. De lysis is dus geen erfelijke eigenschap van de bacteriën of zooals D'HÉRELLE het uitdrukt: „il ne peut s'agir d'une hérédité à la lyse de la part de la bactérie, puisqu'on établit une barrière entre l'ascendant et le descendant.” Intusschen is het ook niet duidelijk, hoe men zich met het oog op de eigenaardige wijze van vermenigvuldiging der bacteriën een dergelijke overerving zou moeten voorstellen.

6e. Aangezien het aantal plages, dat opkomt na het uitstrijken van een hoeveelheid bacteriophage-houdende vloeistof op een met bacteriën bedekte plaat, evenredig is aan de concentratie van het filtraat, heeft de bacteriophage een corpusculaire natuur. Een enzym is niet in staat bij groote verdunning zijn werking op bepaalde plaatsen te concentreren. Neemt men aan, dat slechts hier en daar een bacterie gelegen is, die het vermogen heeft het enzym te regenereren om zodoende tot oplossingscentrum te worden, dan kan men niet verklaren, dat het aantal plages binnen zekere grenzen onafhankelijk is van het aantal opgebrachte bacteriën.

De vraag, waartoe men onwillekeurig komt, is, of er behalve

de genoemde zes argumenten niet meer feiten te vinden zijn, die voor de levende natuur van den bacteriophage pleiten. Overbodig zou dat zeker niet zijn; immers, nog altijd wordt de theorie van D'HÉRELLE bestreden door onderzoekers, die de oorzaak der bacteriophagie in de bacterie zelf zoeken. Zoo bleek SEIFFERT ¹⁾ niet lang geleden nog steeds op het standpunt te staan, dat de lysis een zuiver bacterieel proces is, veroorzaakt door de tryptische enzymen in de cel, een soort autolyse dus. Zij volgt na een overmatige activeering der normale enzymatische processen in de cel, waarbij door gebrek aan voedingseiwit zelfs het lichaamseiwit wordt aangetast. Het is dus slechts een quantitatieve verandering in normale functies. De overmatige activeering berust op een ophooping van activeerende stofwisselingsproducten van de eiwitontleding, die nu niet, zoals in het normale geval gebeurt, worden afgebroken of geparalyseerd. De ophooping komt endogeen tot stand, maar de lysis kan ook van buiten af op gang gebracht worden door toevoeging van deze activeerende stoffen aan de bacteriecultuur.

Ieder, die zonder vooroordeel een dergelijke theorie beschouwt naast die van D'HÉRELLE, zal moeten toegeven, dat de laatste een ongedwongener verklaring geeft van de gevonden feiten dan de hypothese van SEIFFERT. Bovendien schiet zij hier en daar tekort. Bijvoorbeeld, hoe zou men volgens haar de aanpassing van den bacteriophage aan bepaalde phenolconcentraties moeten verklaren? Immers door de steeds herhaalde filtratie wordt het contact tusschen de opéénvolgende bacteriënsuspensies vermeden; de aanpassing verloopt dus buiten de bacteriën om en speelt zich af tusschen de phenol en de genoemde activeerende stoffen. Hoe moet men zich iets dergelijks voorstellen?

¹⁾ Deutsche Mediz. Wochenschrift, 51, 351.

Naast de theorie van SEIFFERT zijn er nog verscheidene andere, die hier slechts even worden genoemd.

BORDET staat in opvatting dicht naast SEIFFERT. Hij houdt den bacteriophag voor een stof, die oorspronkelijk van de leucocyten afkomstig is en bij de bacteriën een hereditaire voedingsstoornis te weeg brengt.

DÖRR voelt zich eveneens tot deze zienswijze aangetrokken. De stofwisseling van de bacterie zou door den bacteriophag zoodanig worden aangezet, dat zelfs de celwand verteerd werd. Deze stofwisselingsziekte wordt door een virus op een andere bacterie overgebracht: de levende natuur van dit virus staat voor hem niet vast.

Volgens BAIL kunnen bacteriën in hun normalen maar ook in een ultramicroscopischen vorm voorkomen. In het laatste geval zijn het zoogenaamde „Splitter”. Komt een bacterie met een Splitter in aanraking, dan gaat ook zij in den Splittervorm over en passeert de filterkaars.

OTTO, DA COSTA-CRUZ en WEINBERG zoeken de oorzaak der lysis in de autolysinen, welke in elke normale bacterie voorkomen. De autolytische enzymen, die na de oplossing van een bacterie vrijkomen, werken weder op nieuwe bacteriën in; dit proces gaat eindeloos door.

Voor een uitvoerige beschrijving van deze theoriën en hun weerlegging kan gevoeglijk verwezen worden naar de voortreffelijke litteratuur-overzichten, die er in den loop der laatste jaren over het vraagstuk der bacteriophagie verschenen zijn, zooals bijvoorbeeld dat van DAVISON ¹⁾ in 1922, KUTTNER ²⁾ in 1923, VAN DER WALLE ³⁾ in 1923 en SCHUURMAN ⁴⁾ in 1925.

Ondanks de uitgebreide onderzoekingen, die allerwegen

¹⁾ Abst. Bacteriol., 6, 159.

²⁾ Journ. of Bacteriol. 8, 49.

³⁾ Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 67, II, 589.

⁴⁾ Diss. Leiden 1925.

over den bacteriophage zijn gedaan, zijn er eenige punten, die slechts weinig aandacht getrokken hebben, n.l. het gedrag van den bacteriophage bij een schadelijke temperatuur (of scherper uitgedrukt: den vorm van de afstervingskromme van den bacteriophage) en diens stofwisseling.

In verband met de proeven, die op dit punt met hogere en lagere organismen en enzymen zijn uitgevoerd en waarvan een kort overzicht in het volgende hoofdstuk een plaats moge vinden, scheen het geen ondankbare taak ook den bacteriophage hierop te onderzoeken.

TWEEDE HOOFDSTUK

AFSTERVINGSPROEVEN UIT DE LITTERATUUR

A. Bacteriën.

Na KOCH ¹⁾ in 1881 hebben PAUL en KRÖNIG ²⁾ in 1897 zich met onderzoekingen bezig gehouden over de wijze van afsterving van bacteriën. Zij gingen de desinfecteerende werking na van verschillende kwikzouten op Anthrax-sporen, waarbij bleek, dat het Hg-ion de bacteriën doodde, daar bij gelijke concentratie het zout met de grootste electrolytische dissociatie ook den meesten invloed had. Hetzelfde gold voor de OH-ionen der bases en de H-ionen der zuren. Bovendien onderzochten zij, hoe de afsterving der Anthrax-sporen bij een concentratie van 0,11 % HgCl₂ en 18° C. verliep in verband met den tijd. Zij constateerden slechts, dat de afstervingslijn een vloeiend verloop had.

IKEDA heeft hun gegevens mathematisch bewerkt en getracht de formule te vinden, waaraan de afstervingskromme beantwoordde. Hij meende haar gevonden te hebben in de uitdrukking $N^{\frac{1}{2}} \cdot t = k$, d.w.z., het aantal overlevende cellen is omgekeerd evenredig aan het kwadraat van den inwerkingstijd. De overeenstemming tusschen de resultaten van PAUL en KRÖNIG en deze formule liet veel te wenschen over.

¹⁾ Mitt. a. d. kais. Gesundh. 1, 1.

²⁾ Zeitschr. f. Hyg. und Inf.-Krkh. 25, 1.

Het is de verdienste van MADSEN en NIJMAN ¹⁾ (1907) geweest, dat zij bij de bewerking van bovengenoemde gegevens het verband hebben gezien met de formule der monomoleculaire reactie

$$K = \frac{1}{0.434 \times t} \log \frac{a}{a-x}$$

waarin a voorstelt het aantal bacteriën, dat bij den aanvang aanwezig was en x het aantal reeds gedooide kiemen op het tijdstip t . Zet men dus de tijden uit als abscissen en de logaritmen van de aantallen nog levende bacteriën als ordinaten, dan is de afstervingslijn recht. Deze formule bleek veel beter te voldoen dan de bovengenoemde van IKEDA. Zij vonden dit nader bevestigd bij onderzoekingen over de afsterving van Anthraxsporen in warm water.

Een groot aantal onderzoekingen op dit gebied heeft HARIETTE CHICK (1908—1910) uitgevoerd; in de eerste plaats met vloeibare desinfectie-middelen ²⁾. Anthraxsporen, bij 33,3° C. met 5 % phenol behandeld, gaven een zuiver logaritmische afsterving te zien, evenals *B. typhosus* en *B. coli commune* bij 20° C. met 0,6 % phenol. Daarentegen vertoonde *Staphylococcus pyogenes aureus* onder laatst genoemde omstandigheden een afstervingslijn, welke aanvankelijk bijna horizontaal liep, daarna omhoog en verder normaal logaritmisch bleef voortgaan. Er was dus een abnormale vertraging aan het begin van het afstervingsproces. Bij *B. paratyphosus* (HgCl_2 1 : 500.000 bij 20° C.) nam de reactie-constante K voortdurend tijdens het proces af, n.l. van 0,074 tot 0,012. Hier dus een abnormale vertraging over de geheele linie.

In warm water ³⁾ verliep de afsterving van *B. typhosus*, *coli* en *pestis* geheel volgens de formule der monomoleculaire

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg. und Inf.-Krkh. 57, 388.

²⁾ Journ. of Hygiene, 8, 92.

³⁾ Idem, 10, 237.

reactie, terwijl ook hier weer *Staphylococcus pyogenes aureus* en *B. paratyphosus* onregelmatigheden aan het begin vertoonden. Zelfs de inwerking van konijnen-serum op *B. coli* bleek zich logaritmisch te gedragen ¹⁾.

CHICK ging ook de gegevens na van CLARK en GAGE ²⁾ (1903) die de afsterving van *B. coli* onder invloed van het zonlicht bestudeerden; de uitkomsten beantwoorden eveneens aan de formule. Hetzelfde geldt voor de proeven van PAUL en PRALL ³⁾ (1907), die staphylococcen bij verschillende temperaturen lieten drogen, en de onderzoeken van PAUL, BIRSTEIN en REUSZ ⁴⁾, waarbij aan granaten gedroogde staphylococcen door vloeibare en gasvormige desinfectie-middelen tot afsterven werden gebracht.

De verklaring van het feit, dat bacteriën en bacterie-sporen afsterven volgens de formule der monomoleculaire reactie, is bijzonder moeilijk. Men kan zich slecht indenken, hoe dat mogelijk is. Daarom behoeft het ook niet te verwonderen, dat de meeningen op dit punt ver uiteen loopen.

HARIETTE CHICK trachtte de wijze van afsterving op overeenkomstige manier te verklaren, als dat gedaan is voor het verloop eener monomoleculaire reactie. Bij de inversie van riet-suiker bijvoorbeeld neemt men aan, dat door tijdelijke veranderingen in de inwendige energie slechts een deel der suikermoleculen op een gegeven moment tot omzetting in staat is; deze fractie blijft tijdens het verloop der reactie constant. Of wel, het zijn de moleculen met de hoogste temperatuur, welke reageren en ook deze fractie blijft dezelfde. Zoo is het volgens CHICK ook met de bacteriën gesteld, wanneer zij hetzij door verwarming hetzij door toevoeging van een desinfectiemiddel

¹⁾ Commun. 8e Internat. Congress. Appl. Chem., 26, 180.

²⁾ 34e Ann. Report, State Board of Health. Massachusetts. 1903.

³⁾ Arb. a. d. kaiserl. Gesundh.-Amte 26, 424.

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift 18, 1; 25, 367; 29, 201.

tot afsterven worden gebracht. Door fluctueerende veranderingen in de stoffen, welke de bacterie samenstellen, is op een bepaald oogenblik slechts een deel der bacteriën aantastbaar. Dit aantal staat gedurende de afsterving in constante verhouding tot het totaal aantal nog in leven zijnde bacteriën, zoodat het proces beantwoordt aan een logarithmische kromme.

Naast deze opvatting staat een meer vitalistische verklaring van het probleem. Reeds PAUL en KRÖNIG (l.c.) zochten, hoewel zij het verband tusschen de formule der monomoleculaire reactie en hun waarnemingen niet opmerkten, de oorzaak van het afnemen der afstervingsnelheid in een verschil in resistentie van de bacteriën. Ook BELLEI ¹⁾ en REICHEL ²⁾ stelden zich op dit standpunt. HEWLETT ³⁾ eveneens; hij meende, dat de exponentieele afstervingskromme ook de waarschijnlijkste kromme was voor alle levende individuën of cellen, die in resistentie verschillen. Om dit aannemelijk te maken wees hij er op, dat van een groot aantal menschen op middelbaren leeftijd steeds een constante fractie per jaar sterft. Later is er van andere zijde op attent gemaakt, dat dit zijn oorzaak niet vindt in de resistentie-verschillen tusschen de menschen onderling maar in de kans, die zij hebben om met de schadelijke of doodelijke factoren in aanraking te komen en deze kans is evenredig aan het aantal nog levende menschen.

Deze opvatting werd minder aannemelijk, doordat EIJKMAN ⁴⁾ er op gewezen heeft, dat men geen logarithmische afstervingskromme verwachten kan, wanneer er verschillen in resistentie tusschen de bacteriën onderling bestaan. Stelt men het aantal bacteriën in verband met hun resistentie grafisch voor,

¹⁾ Munch. med. Wochenschrift. 7, (1904).

²⁾ Biochem. Zeitschrift, 22, 149.

³⁾ Lancet 13 Maart 1909.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr., 11, 12.

Folia Microbiologica 1, 359.

dan zal er een individueele variatie kromme voor den dag moeten komen. De afsterving moet dus langzaam beginnen, omdat er slechts een gering aantal zeer gevoelige bacteriën zijn, in het midden sneller verlopen om tenslotte weder trager te eindigen. Experimenteel gelukte het EIJKMAN dan ook aan te toonen, dat *B. coli* bij verhitting een afsterving vertoont, die aan de gestelde voorwaarden voldoet. Vaak was de lijn niet symmetrisch, doordat de aanvangsperiode korter duurde dan te verwachten was; blijkbaar had men hier dus met een scheeve individueele variatie-kromme te doen. Proeven met sporen, van diverse bacillen afkomstig, gaven echter steeds een zuiver logarithmische afstervingskromme. De uitspraak van PHELPS¹⁾: „The rate of dying, whether under the influence of heat, cold or chemical poison, is unfailingly found to follow the logarithmic curve of the velocity law, if the temperature be constant”, werd dus door het werk van EIJKMAN onhoudbaar.

REICHENBACH²⁾ bestreed eveneens de opvatting van Miss CHICK, dat men de logarithmische afsterving der bacteriën kan verklaren naar analogie van de monomoleculaire reactie en wel op grond hiervan, dat er een zeer groot verschil in afmeting bestaat tusschen de bacteriën en de Hg-ionen, die de eerste dooden en in overmaat aanwezig zijn, zoodat men zich moeilijk in kan denken, dat niet alle bacteriën evenveel kans hebben om te worden aangetast. Verder mag men zeker de bacteriën niet eenvoudig als moleculen beschouwen, zooals CHICK deed. Wel zullen de eiwit-moleculen, die een bacterie opbouwen, beurtelings meer of minder gemakkelijk aangetast worden door het desinfectans, maar dat geldt niet voor de bacterie in haar geheel. Men zou de bacteriën dus kunnen beschouwen als reageerbuizen, waarin zich eenzelfde reactie afspeelt onder

¹⁾ Journ. of Inf. Dis., 8, 27.

²⁾ Zeitschr. f. Hygiene, 69, 171.

volkomen gelijke omstandigheden, waaruit men dus verwachten zou, dat alle bacteriën op hetzelfde moment gedood worden. Wat de afsterving voor verwarming betreft kan men evenmin aannemen, dat telkens slechts de bacteriën met de hoogste temperatuur zouden sneuvelen, daar een verschil in temperatuur bij zulke relatief groote lichamen in één vloeistof niet denkbaar is.

Daar men dus de overeenkomst met de formule der monomoleculaire reactie niet verklaren kan door aan te nemen, dat alle bacteriën gelijkwaardig zijn, zoekt REICHENBACH de oorzaak ervan juist in resistentie-verschillen. Hij wijst daartoe op de eigenaardige samenstelling van een bacterie-cultuur. Bij elke deeling blijven er bacteriën achter, die zich niet verder vermenigvuldigen. In een 24-uur oude cultuur treft men daarom een aantal groepen bacteriën aan, die in ouderdom verschillen. Wanneer men nu aanneemt, dat de resistentie der bacteriën evenredig toeneemt met den ouderdom en de fractie, die zich telkens niet meer deelt, constant is, dan kan men mathematisch plausibel maken, dat een bacterie-cultuur zuiver logaritmisch af kan sterven.

Zeer terecht heeft EIJKMAN later de opmerking gemaakt, dat REICHENBACH wel aantoonde, hoe de zaak kan zijn, maar niet waarom het ook onder wisselende uitwendige omstandigheden altijd zoo zijn moet; bovendien, hoe verklaart men dan een afstervingskromme, die duidelijk met de individueele variatiekromme samenhangt, zooals EIJKMAN voor *B. coli* vond?

Ook in latere jaren is er een diepgaand verschil van meening gebleven, zoowel over den vorm der afstervingskromme, die aan de werkelijkheid beantwoordt, als over de verklaring, die men er van geven kan.

ARRHENIUS ¹⁾ schaaft zich na een kritisch overzicht van de

¹⁾ Quantitative laws in biological Chemistry, Bell & Son, London 1915.

litteratuur aan de zijde van Miss CHICK. Hij meent dan ook, dat de afsterving van levende cellen een zuiver chemisch proces is, waarbij men dus altijd een logaritmische afstervingskromme vinden moet, hoewel hij onvoorwaardelijk toegeeft, dat er verschillen in resistentie tusschen de bacteriën onderling bestaan. Bij roode bloedlichaampjes lukte het hem zelfs aan te toonen, dat deze, naar resistentie tegen vibriolysine en aantal gerangschikt, een individueele variatie-kromme te zien gaven. Deze resistentie-verschillen zijn echter niet in staat de snelheid der afsterving gedurende het geheele proces te beïnvloeden en slechts de zoogenaamde incubatie-tijd schrijft hij aan hen toe: „During this time the cells with the weakest membranes are attacked” (l.c., pag. 80) zoo meent hij, en voegt er elders aan toe (64) „this phenomenon is very common in life-processes”. Er zijn dus blijkbaar twee stadia bij de afsterving van levende cellen door chemische stoffen: de diffusie van het gif in de cellen en de eigenlijke afsterving. Nu is echter gevonden, dat niet alle bacteriën een incubatie-tijd vertoonen, naar aanleiding waarvan ARRHENIUS opmerkt: „Different bacteria may possess membranes, which are rather different in regard to their permeability for the poison and it may also be different for different poisons. It is probably for this cause that the time of incubation is insensible in many experiments.” Bij sommige bacteriën zou dus de diffusie zoo gemakkelijk gaan, dat resistentie-verschillen volkomen worden weggenomen.

Ook LEE en GILBERT ¹⁾ namen het voor Miss CHICK op; de logaritmische afstervingslijn is de normale curve, slechts bijkomstige factoren wijzigen haar.

In de oppositie treft men in de eerste plaats aan LOEB en NORTHROP ²⁾, welke afstervingsproeven deden met de „fruit

¹⁾ Journ. Phys. Chem. 22, 348 (1918).

²⁾ Journ. Biolog. Chem. 32, 103 (1917).

fly" *Drosophila* bij 39,5° waarbij zij een fraaie hoewel eenigszins scheeve variatie-kromme vonden. Naar hun meening moet men ook bij bacteriën datzelfde resultaat krijgen, wanneer men hen niet al te sterk aanpakt, zooals Miss CHICK deed. „The agencies used by her for killing the bacteria were so powerful, that the ascending branch (van de individueele variatie-kromme) became almost a vertical line, thus escaping detection. Hence she noticed usually only the less steep descending branch, which could be interpreted as a monomolecular curve for the reason, that her experiments lasted only a short time.” Dit moge waar zijn voor de onderzoeken van CHICK, doch dit geldt niet voor alle onderzoeken op dit gebied; vaak werd ook bij voorzichtige afsterving een logarithmische lijn gevonden.

LOEB en NORTHROP houden het dus daarvoor, dat de afsterving slechts in schijn beantwoordt aan de formule der monomoleculaire reactie en men bij zorgvuldige bestudeering van het probleem toch tot de overtuiging zal komen, dat resistentieverschillen haar verloop beheerschen.

Bij deze opvatting hebben zich later BROOKS ¹⁾ en PETERS ²⁾ aangesloten. BROOKS, die bij haemolyse een s-vormige kromme vond, is van meening, dat in 't algemeen de afsterving beïnvloed wordt door de individueele resistentieverschillen en door de „fundamental reaction” d.w.z. de physico-chemische processen in het protoplasma. Dit laatste kan een eenvoudige reactie zijn maar ook een complex van veranderingen, waarvan de snelheid door de langzaamst verloopende wordt beheerscht. Men moet wel zeer onnatuurlijke voorwaarden stellen om dit samenstel van reacties te doen verlopen als een monomoleculaire reactie. Deze veronderstelling wordt door de feiten ook niet voldoende bewaarheid. Volgens hem zal men alleen dan

¹⁾ Journ. Gen. Physiol., 1, 61 (1918).

²⁾ Journ. Physiol., 54, 260 (1920).

een beter inzicht in de afsterving krijgen, wanneer men onafhankelijk van elkander het verloop der fundamental reaction en van de individueele variatie-kromme zou kunnen bepalen.

HENDERSON SMITH ¹⁾ ging de afsterving na van sporen van *Botrytis cinerea* door middel van phenol; de afstervingskromme was een s-vormige lijn, welke na transformatie in een distributie-curve zeer goed aan het bekende schema beantwoordde. Nu was het opvallend, dat, wanneer men de proef niet met 30—maar met 7—9 dagen oude sporen deed, een logaritmische lijn voor den dag bleek te komen. Nam men nu de phenol-concentratie geringer, dan kwam de s-vorm weer terug. De vorm van de curve hangt meer van de phenol-concentratie af dan van den ouderdom der sporen. Zeer terecht heeft deze onderzoeker er in navolging van BROOKS op gewezen, dat men niet zonder meer uit een gegeven afstervingscurve een frequentie-kromme mag afleiden, welke het verband tusschen de resistentie en aantal aangeeft. Immers, dat hangt af van $\frac{R}{T}$ d.w.z. de verhouding tusschen de resistentie R en den tijd T, noodig om de bacteriën te dooden. Wanneer bijv. de resistentie zou afhangen van de dikte van de celmembraan, dan is het nog niet dadelijk zeker, dat bij een tweemaal grootere resistentie de phenol ook tweemaal zooveel tijd noodig heeft om door de celmembraan van dubbele dikte te komen. Mocht $\frac{R}{T} = K$ zijn en dus bij een 2, 3, 4. . . . n maal grootere resistentie ook een 2, 3, 4. . . . n maal langere doordringingstijd behooren, dan mag men uit de afstervingskromme een frequentie-curve afleiden. Wanneer echter dit verband $\frac{R}{\log T} = K$ is, dan zou men uit een logaritmische afstervingskromme een eenigszins scheeve individueele variatie-kromme kunnen construeeren. Daarom zal een logaritmische afstervingslijn niet als bewijs kunnen dienen, dat er geen indivi-

¹⁾ Annals Appl. Biology 8, 27 (1921).

dueele verschillen zijn tusschen de betreffende bacteriën.

Zoo zouden dus slechts in schijn de bacteriën, die volgens een logarithmische kromme afsterven, geen verschillen in resistentie vertoonen, terwijl zij wel degelijk aanwezig zijn.

Tenslotte zij hier een onderzoek vermeld van COHEN ¹⁾, dat — voor zoover mij bekend — het jongste is op dit gebied. Daar bij vroegere onderzoekingen de bacteriën steeds aan relatief zeer hoge temperaturen of desinfectans-concentraties werden blootgesteld, meende COHEN bij minder ongunstige omstandigheden (sub-lethal conditions) betrouwbaarder resultaten te zullen verkrijgen. Daartoe suspendeerde hij de bacteriën in bufferoplossingen van CLARK, omdat gebleken was, dat kleine veranderingen in de waterstofionenconcentratie de afstervings-snelheid sterk beïnvloeden, en bracht hen daarna bij temperaturen van 0°—30° en neutrale reactie tot afsterving. Bijgevolg werd de duur der afstervingsproef uitgerekte tot 25 à 60 dagen; dit is dus geen afsterving meer in den gewonen zin van het woord, maar een uithongering (starvation) van de bacteriën, al ligt het onderscheid dan ook alleen in den tijdsduur. Niet-tegenstaande dat kon worden aangetoond, dat de logarithmen der overlevingsgetallen met de waarnemingstijden graphisch voorgesteld een rechte lijn vormden, echter met duidelijke afwijkingen aan het begin en aan het einde. Zoo werd bijvoorbeeld voor *B. coli* bij $P_H = 7,1$ en 30° C. een incubatietijd (period of induction) gevonden van 16 dagen; door de wijze van proefneming is deze sterk vergroot. COHEN zegt hiervan: „we find in these experiments striking examples of that preliminary period in the disinfection process which we have referred to as the period of induction.”

De onderzoeker kiest naar aanleiding van zijn resultaten partij voor Miss CHICK met deze woorden: „There may occur

¹⁾ Journ. of Bacteriology, 7, 183 (1922).

deflections from the true logarithmic rate at the beginning and the end of the reaction so that instead of a straight line plot of the results, we get a somewhat s-shaped curve. If conditions are properly selected, the deflections may be reduced considerably, as a matter of experimental fact, they have never yet been completely eliminated. These considerations are not held to affect the validity of the monomolecular law. They led us rather to investigate the disturbing influences which, when discovered and eliminated, furnish further support to the law."

B. Hooger georganiseerde wezens.

HARVEY ¹⁾ bepaalde de afstervingsnelheid van *Chlamydomonas* in water, dat 0.009 % HCl bevatte door het aantal monaden te tellen, dat bleef rond zwemmen. De lijn $\log(a-x)$ was zuiver recht.

Miss DARWIN en BLACKMAN ²⁾ doodden gerstzaden met warm water en giften; dit proces verliep logaritmisch.

HEWLETT ³⁾ daarentegen vond bij proeven over het afsterven van mosterdzaden met HgCl_2 waarden, die later door REICHENBACH ⁴⁾ grafisch uitgezet een duidelijke individueele afstervingskromme gaven.

BOYCOTT ⁵⁾ verkreeg bij dooding van kikkerlarven met warm water een fraaie s-vormige afstervingskromme, evenals LLOYD ⁶⁾ voor de afsterving van de larven van de tomaatmot met lood-arsenaat.

LOEB en NORTHROP ⁷⁾ onderzochten, zooals reeds vermeld

¹⁾ *Annals of Botany*, 23, 181 (1909).

²⁾ *British Association Dublin meeting* (1909).

³⁾ *Lancet*, 13 Maart 1909.

⁴⁾ *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Krkh.* 69, 195.

⁵⁾ *Journ. of Path. and Bact.*, 23, 2, 237.

⁶⁾ *Ann. Appl. Biol.* 7, 1, 66.

⁷⁾ *Journ Biol. Chemistry*, 32, 103 (1917).

werd, de afsterving van de „fruit fly” *Drosophila*; de afsterfingslijn bleek met een eenigszins scheeve individueele variatiekromme in overeenstemming te zijn.

C. Enzymen.

TAMMAN ¹⁾ heeft het eerst de inactivering van een enzym door hoge temperaturen systematisch onderzocht. Voor *emulsine* vond hij bij een temperatuur van 60° een vrijwel gelijkblijvende reactie-constante der formule van de monomoleculaire reactie, terwijl deze bij 40° en 50° gedurende het proces sterk afnam.

SENDER ²⁾ constateerde bij de *katalase* eveneens een sterke afname van de reactie-constante bij inactiveringstemperaturen van 45°, 55° en 65°.

MADSEN en WALBUM ³⁾ onderzochten de inactivering van *lebferment*, *pepsine* en *trypsine*. Bij 47.5° bleek het *lebferment* volgens de formule der monomoleculaire reactie geïnactiveerd te worden evenals *pepsine* bij 66.8°. Ook *trypsine* gedroeg zich bij 64° op overeenkomstige wijze. Daarbij bleek tevens, dat de concentratie van de *trypsine* (2—10 %) niet van invloed was op de snelheid van de inactivering; de reactie-constante bleef bij 67.15° steeds $k_c = 0.0073$.

VAN ECK ⁴⁾ bevond de vernietiging van *peroxydase* bij 68.9° C. geheel in overeenstemming met de genoemde formule; tot hetzelfde resultaat kwam ZILVA ⁵⁾ bij 70° C.

Intusschen werden, behalve de door TAMMAN (l.c.) voor *emulsine* bij 40° en 50° en door SENTER (l.c.) bij de *katalase* gevonden afnemende reactie-constanten, ook door andere

¹⁾ Zeitschr. physik. Chemie 18, 426 (1895).

²⁾ Zeitschr. physik. Chemie 44, 257 (1903).

³⁾ ARRHENIUS, Immunochemie, Leipzig 1907 S, 57—59.

⁴⁾ Zeitschr. f. Unters. der Nahr- und Genussm., 22, 393 (1917).

⁵⁾ Biochem. Journ. 8 (1914).

onderzoekers afwijkingen opgemerkt bij de enzym-inactivering.

SHAKLEE ¹⁾ kreeg met *pepsine* bij 37° een inactivering, welke aan de formule der bimoleculaire reactie beantwoordde.

EULER en LAURIN ²⁾ zagen bij de inactivering van *saccharase* bij 59° een voortdurende afname van de reactie-constante.

SÖHNGEN en SMITH ³⁾ deden gelijke ervaring op met *katalase* in de gistcel bij 56°, waarbij echter waarschijnlijk twee verschillende katalases in het spel waren, daar de afstervingskromme een knik vertoonde.

Wanneer men de in deze drie rubrieken verzamelde gegevens over de afsterving van hogere en lagere organismen en de inactivering van enzymen overziet, dan wordt men getroffen door de groote tegenstrijdigheid zoowel in de experimenteele gegevens als ook in de daarop gebaseerde meeningen en verklaringen. De één vindt bij bacteriën een logaritmische afsterving, de ander een individueele variatie-kromme; hier is een duidelijke incubatie- of inductie periode waargenomen, daar in 't geheel geen; gerstzaden sterven monomoleculair, mosterdzaden individueel af; dit enzym vertoont een logaritmische inactiveringscurve, het andere gedraagt zich naar de formule der bimoleculaire reactie; deze beschouwt bacteriën als moleculen of reageerbuizen, gene als individuën; de ééne onderzoeker acht een logaritmische afsterving de eenvoudigste zaak van de wereld, de andere wringt zich in mathematische bochten om er een verklaring voor te geven, etc.

Het is niet recht duidelijk, waarom zoo menige onderzoeker zich met alle energie verzet heeft tegen de mogelijkheid, dat

¹⁾ Centralbl. f. Physiol., 23, 4 (1909).

²⁾ Hoppe Seyler 108, 64 (1919).

³⁾ Tijdschr. Vergel. Geneesk. 10, 2—3, 1 (1923).

bacteriën individueele verschillen zouden vertoonen in resistentie, te meer daar dit verschijnsel onder hoogere planten en dieren zoo algemeen voorkomt. Waarschijnlijk zal daaraan het streven niet vreemd zijn om de laagste levensvormen zooveel mogelijk van chemisch standpunt te bezien; een meer chemisch-geschoold onderzoeker zal een afsterving, die volgens de formule der monomoleculaire reactie verloopt, aantrekkelijker vinden dan een afsterving, die verband houdt met de individueele variatie-kromme.

Nu is echter de vraag, of de mogelijkheid, dat die verschillen tot uiting komen, niet sterk afneemt met de afmetingen van de levende organismen. EIJKMAN ¹⁾ beantwoordt deze vraag in positieven zin en wel op grond van de volgende overweging. Men kan zich voorstellen, dat de afsterving bij verwarming plaats vindt, doordat de gesuspenderde bacteriën worden getroffen door die moleculen, wier warmtebeweging het heftigst is. De overige moleculen kan men als indifferent beschouwen. De bacteriën bevinden zich dus in een kogelregen en wanneer deze niet al te dicht is, zullen zij afsterven volgens de formule der monomoleculaire reactie. Naarmate nu de afmetingen van de aan dien kogelregen blootgestelde wezens grooter zijn, zullen de treffers gelijkmatiger verdeeld zijn over de individuen, waardoor de verschillen in resistentie eerder aan den dag zullen komen.

Men zou het ook zoo kunnen opvatten, dat bij teere individuen van geringe afmetingen reeds één botsing met een dergelijk in heftige beweging zijnd molecuul vernietigend werkt, zoodat resistentieverschillen van geen beteekenis zijn, terwijl bij groo-tere organismen van een dergelijke overmacht geen sprake is.

Deze redeneering werd in zooverre niet door het experiment gesteund, dat bijvoorbeeld gistcellen niet duidelijker het beeld

¹⁾ Folia Microbiologica 1, 368.

van de individueele variatie-kromme vertoonen dan colibacillen.

Uit de medegedeelde resultaten van een groot aantal afstervingsproeven op allerlei objecten blijkt, dat de vorm van de afstervings-kromme zeker niet altijd als criterium kan gelden van de al of niet levende natuur van het onderzochte materiaal. Vindt men echter een lijn, die duidelijk verband houdt met de individueele variatie-kromme, dan zal men met groote mate van zekerheid kunnen besluiten met een levend organisme te maken te hebben. Bij enzymen is nooit iets van dien aard waargenomen.

Dit geldt in mindere mate van de incubatie-periode. In de eerste plaats is, zooals *ARRHENIUS*¹⁾ opgeeft, dit verschijnsel door *BUNSEN* en *ROSCOE* ook geconstateerd bij de inwerking van licht op een mengsel van waterstof en chloor (chlorine) en in de tweede plaats is het gevaar groot, dat men door een fout in de proefneming voor een incubatie-tijd aanziet, wat dit in 't geheel niet is. Dit kan het geval zijn, wanneer men bij afsterving door ultraviolette stralen verzuimt de kwartslamp tot volle intensiteit te doen komen vóór de proef begint of wanneer de bacterie-suspensie in het waterbad niet snel genoeg de gewenschte temperatuur aanneemt.

Op grond van het bovenstaande leek het a priori zeer goed mogelijk door middel van afstervingsproeven nader tot de natuur van den bacteriophage te komen, dan dit tot nu toe het geval is.

¹⁾ l.c., pag. 64.

DERDE HOOFDSTUK

ONDERZOEKINGS-MATERIAAL

Bij het zoeken naar een geschikten bacteriophag voor het beoogde doel gelukte het bacteriophagen te isoleeren van eenige bacteriën, welke te voren, voor zoover althans bekend, in dat opzicht niet in de litteratuur waren vermeld.

De techniek was de volgende: aan een 18-uur oude reïncultuur in bouillon van de bacterie, waarvan men een bacteriophag wenscht te isoleeren, wordt 10 gram grond, faeces of grachtwater toegevoegd. Na 24 uur bij 26° te hebben gestaan wordt het mengsel over infusoriënaarde en daarna door een steriele kaars van CHAMBERLAND gefiltreerd. Het filtraat onderzoekt men daarna op de aanwezigheid van een bacteriophag door 1 cc. in een licht troebele bacterie-suspensie (in bouillon met PH = 7.—) te brengen en den volgenden dag de troebeling te vergelijken met een contrôle-suspensie zonder filtraat. Een blanco proef bewijst de steriliteit van het filtraat.

Op deze wijze werd van *B. prodigiosum* een goede bacteriophag uit grachtwater gekweekt. Het viel daarbij op, dat de secundaire koloniën, die zich na verloop van eenigen tijd op een vleesch-agarplaat met 1% glucose ontwikkelden, een veel intensere roode kleur vertoonden, dan de normale cultuur.

Dezelfde waarneming werd door Prof. SÖHNGEN gedaan bij secundaire culturen van licht-bacteriën; deze lichtten sterker dan de gewone cultuur. Hierbij werd zoowel de bacteriophag als de bacterie geïsoleerd van een zeevisch. Of men hier met een selectie te maken heeft, zoodat het vermogen om meer

kleurstof of licht te produceeren in verband staat met resistentie tegen de bacteriolyse, is nog niet zeker.

Ook *B. Herbicola* leverde een uit grachtwater geïsoleerden bacteriophage op. De voor *B. radicola* herhaalde malen gevonden bacteriophage in de wortelknolletjes der leguminosen is reeds vroeger in de litteratuur ¹⁾ beschreven.

Tenslotte viel de keus op een uit den grond gekweekten bacteriophage van *Bacillus danicus*. Van beiden moge hier een nadere beschrijving volgen.

A. De bacterie.

Bij de isoleering van *B. radicola* door uitstrijking van de vooraf met 1 % alcoholische sublimaat-oplossing van buiten gesteriliseerde en daarna fijngewreven wortelknolletjes der leguminosen op een klaverextract-gelatine plaat met 2 % saccharose treft men *Bac. danicus* geregeld naast *B. radicola* aan. Hij is dadelijk te onderscheiden door zijn vermogen om gelatine te doen vervloeien in tegenstelling met *B. radicola*. Dat deze bacil niet in de wortelknolletjes voorkomt, wordt aangetoond door het feit, dat het aantal koloniën op de plaat niet kleiner wordt, wanneer men de knolletjes slechts over het agaroppervlak heenrolt in plaats van hen eerst fijn te wrijven en daarna uit te strijken. Blijkbaar onttrekken zich dus hier en daar enkele aan de buitenzijde der knolletjes vastgehechte sporen aan de sterilisatie.

Ook nu werd *Bacillus danicus* langs dezen weg geïsoleerd. LÖHNIS en WESTERMANN ²⁾ beschreven dezen bacil het eerst in een artikel over stikstof-assimileerende bacteriën.

In een brief aan Prof. SÖHNGEN gaf Prof. BEYERINCK als zijn meening te kennen, dat deze bacil één der vele varië-

¹⁾ Centr.bl. f. Bakteriologie, II., 60, 311.

²⁾ Centr.bl. f. Bakteriologie, II., 22, 251.

teiten van den algemeensten der grondbacillen *Bac. megatherium* DE BARY is, waartoe ook behooren de Theemsbacil van MARSHALL WARD, de *Bac. carotarum* van A. KOCH en de *Bac. luteus* van A. MEYER en BREDEMANN.

Zulks is zeer wel mogelijk, waartegen de gevonden matige stikstofbinding en het feit, dat de bacteriophage van *Bac. danicus* volgens onderzoek een aantal geïsoleerde sporenvormende grondbacteriën niet vermocht op te lossen, (omdat niet bekend is, hoever bij deze bacteriesoorten de specificiteit van den bacteriophage gaat) geenszins pleiten.

In bouillon gekweekt doet *Bac. danicus* zich voor als opvallend groote dubbel-staven, ongeveer 2μ breed en 8μ lang. Later in cultuur in grootte teruggaand. Kort na het isoleeren sterk slijm vormend, later minder. Juist met het oog op optische waarnemingen over de oplossing van bacteriën door een bacteriophage was deze bacil van groote afmetingen een aanlokkelijk object voor onderzoek.

Intusschen is echter de vorm en grootte zeer variabel. Op vleeschagar gegroeide bacillen hebben naast korte, dikke coccen, in kettingen gerangschikt, vaak den vorm van lange draden of staven, die niet zelden aan één kant zijn toegespitst. Vooral de dikwijls voorkomende „Rübenformen” zijn karakteristiek. Granulatie is in materiaal van vleesch-agar en bouillon zeer duidelijk waar te nemen. Beweeglijke individuen kwamen niet voor, hoewel LÖHNIS vermeldt, dat bacillen van vleeschagar geen, doch van manniet-agar een langzaam draaiende beweging vertoonden. In eenige dagen oude culturen ontwikkelen zich een groot aantal ronde of ovale sporen.

De vorm der koloniën op vleesch-agar (1 % glucose) is bol-rond met gladden rand, glanzend, niet of weinig doorzichtig, wit tot lichtgeel van kleur. De groei bij 26° , aanvankelijk traag, werd, nadat de bacterie eenigen tijd in cultuur was gehouden, bepaald welig; op mout-, gist-, en vischagar niet minder. In

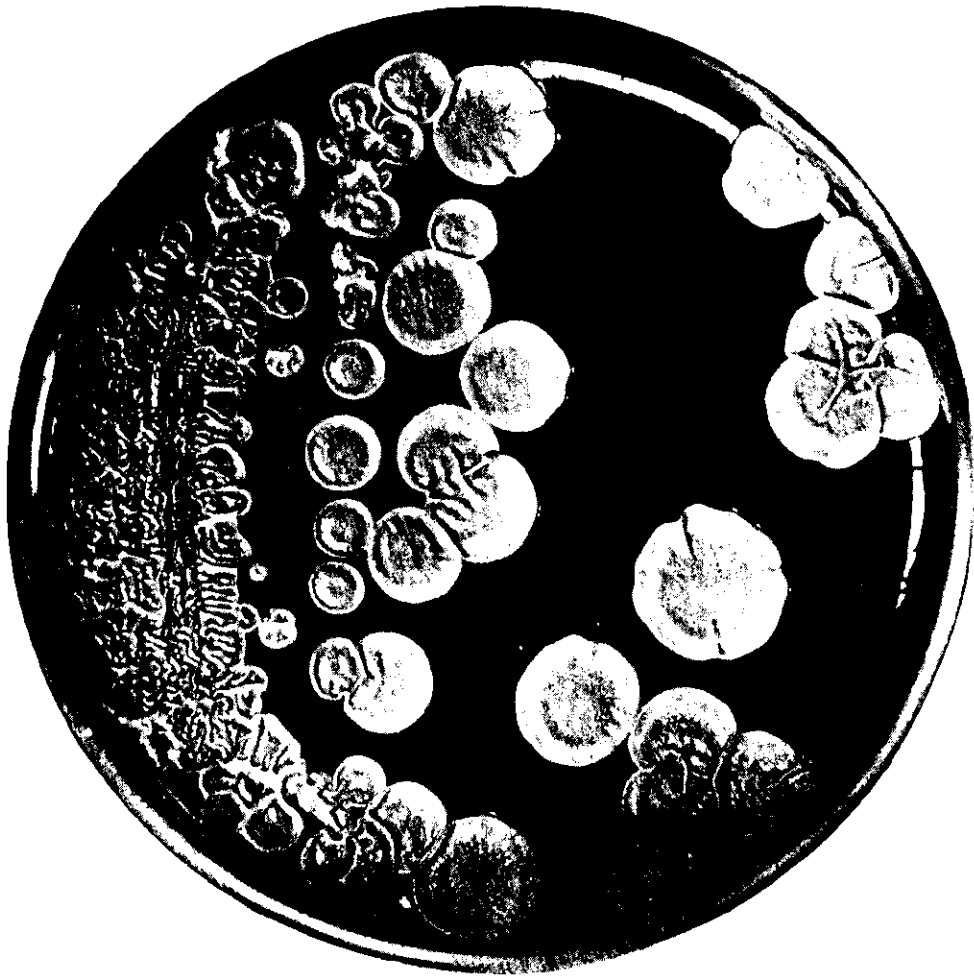


Photo A. (Vergrooting $0.8 \times$).

Vijf dagen oude cultuur van *Bac. danicus* op moutagar.

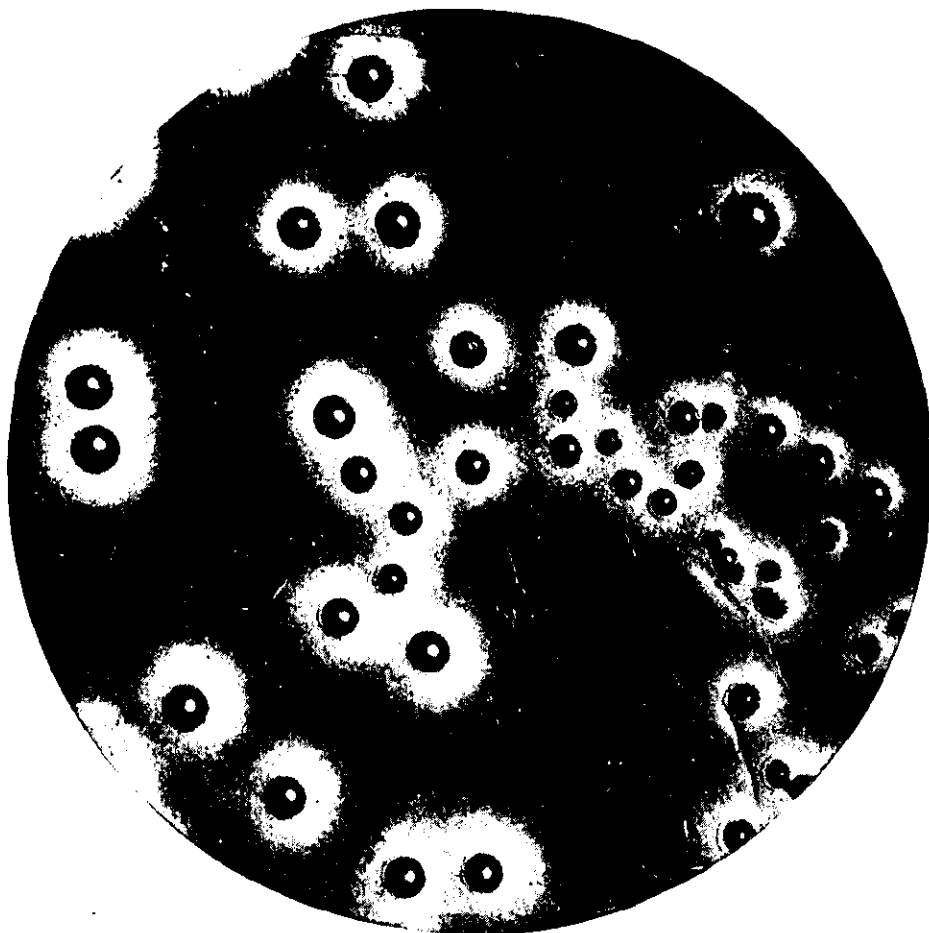


Photo B. (Vergrooting $2 \times$).

Laevulan-ringen om de koloniën van *Bac. danicus* op een cultuurplaat met 5% saccharose.

tegenstelling met de opgave van LÖHNIS groeit dit organisme goed, met gelijkmatige troebeling, in bouillon; na verloop van tijd vormt zich een bezinksel op den bodem, dat niet slijmig en gemakkelijk door schudden weer te suspendeeren is. In mout-extract wordt wel slijm gevormd. Op een cultuurplaat met 5 % saccharose ziet men na enkele dagen om de koloniën breede laevulan-ringen ontstaan. (Zie photo A en B).

Op stikstofvrije azotobacterplaten is duidelijk groei te constateeren. De stikstofbinding bleek in grondextract-glucose-oplossing met toevoeging van eenige zouten per gram verbruikte glucose gemiddeld 0,85 mgr. N₂ te bedragen; LÖHNIS vond hiervoor in manniet-grondextract ruim 1 mgr en in glucose-humaat oplossing 0,4 mgr.

Suikers worden door *Bac. danicus* niet vergist, terwijl op de lakmoesplaat geen zuurvorming uit suikers is aan te toonen. Hij bevat geen lipase, wel katalase, vervloeit gelatine en splitst ureum. Hij is obligaat aëroob.

B. De bacteriophag.

Deze werd uit den grond op de beschreven wijze geïsoleerd en vertoonde reeds dadelijk de kenmerken van een zeer virulenten bacteriophag. Noch in de vloeistof, noch op de plaat ontwikkelde zich een secundaire cultuur; kolfjes met lysaat van meer dan een jaar oud bleven volkomen helder. Behalve bacteriën van 18 uur oud, bleken ook dagen oude culturen gemakkelijk tot oplossing te worden gebracht.

De plages, welke na 4 à 5 uur bij 26° reeds duidelijk zichtbaar worden op de vleeschagar-glucose plaat, breiden zich nog dagen lang uit; in sommige gevallen bleek dit zoover te gaan, dat op enkele smalle strookjes na de geheele cultuur-laag verdween. De centra der voormalige plages bleven gemarkeerd door een wit, droog, korrelig beslag, omgeven door een groot aantal concentrische ringen. Het beslag vormt zich alléén, wanneer

de plaat glucose bevat; de ringen blijven altijd meer of minder duidelijk zichtbaar. De laatsten schijnen vaak alleen te bestaan uit ringvormige verhevenheden in het agaroppervlak, terwijl er somtijds neerslagen in worden waargenomen. Gezien de geringe hoeveelheden stof, is het niet gelukt dit nader te identificeren (Zie photo C en D).

Mogelijk bestaat er verband tusschen de vorming van concentrische ringen en de waarneming van MEULI ¹⁾, dat bij een lagen aanvangstiter van den bacteriophag in een bacterie-suspensie de vermeerdering van het aantal bacteriën en bacteriophagen aanvankelijk in hetzelfde tempo plaats heeft, maar dat het uitéén vallen der bacteriën eerst recht begint, wanneer de bacteriophag-concentratie haar maximum heeft bereikt. Men zou zich de vorming van ringvormige zône's zoo kunnen indenken — naar analogie van de Liesegangsche ringen, — dat bij de diffusie van de bacteriophagen van het centrum der plage de bacteriën eerst kunnen worden opgelost, als er een bepaalde bacteriophag-concentratie is bereikt; bovendien draagt daartoe bij het bekende verschijnsel, dat de bacteriëngroei dicht rondom een plage aanmerkelijk weliger is, dan op groteren afstand, hetgeen toe te schrijven kan zijn aan een prikkelwerking der bacteriophagen of aan een groteren voorraad voedingsstoffen daar ter plaatse. Intusschen geeft deze verklaring evenzeer begripsmoeilijkheden als die der Liesegangsche ringen zelf.

De titer van den bacteriophag bleek te wisselen van 13—340 $\times 10^7$. Dit gaf moeilijkheden bij de verderop beschreven proeven, omdat het er daarbij op aankwam met een bepaalden aanvangstiter te beginnen, welke men niet vooraf bepalen kan in een lysaat van onbekende sterkte. Gelukkig echter heeft mijn ervaring geleerd, dat bij den bacteriophag van *Bac. danicus*

¹⁾ Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krkh., 99, 46.

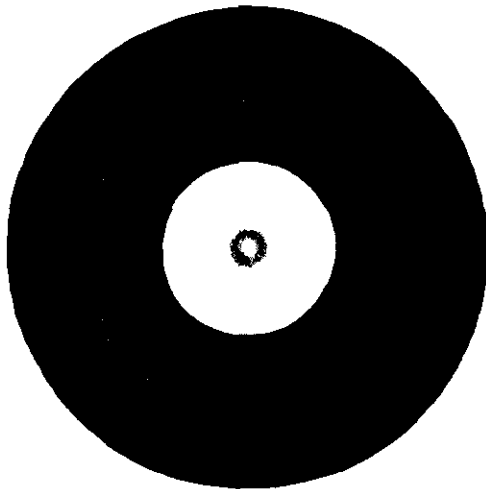


Photo C.
Vergrooting $2\times$; doorvallend licht.

4 dagen oude plage. In het heldere middelveld zijn alle bacteriën opgelost; in het centrum is een beslag ontstaan, dat niet uit levend materiaal bestaat. In de half-doorzichtige, ringvormige zône zijn de bacteriën slechts voor een deel opgelost.



Photo D.
Vergrooting $2.2\times$; doorvallend licht.

12 dagen oude plage met ringvormige verhevenheden in het agaroppervlak, welke somtijds voorzien zijn van neerslagen. In het centrum weder het beslag, dat niet bestaat uit een secundairen groei van de bacterie. De halfdoorzichtige zône is nog zichtbaar, maar komt minder duidelijk uit tegen de bacteriënlaag, die zelf dunner en doorzichtiger begint te worden.

de titer van het lysaat vrijwel beheerscht wordt door het aantal bacteriën, waarmede men ent. Ent men met veel materiaal dan is het lysaat den volgenden dag wel helder, maar opalesceerend en van hoogen titer; ent men spaarzaam, dan verkrijgt men een volkomen helder lysaat met lage bacteriophag-concentratie. In zooverre heeft men dus de sterkte van den titer eenigzins in de hand.

Deze waarneming is in strijd met de resultaten van MEULI ¹⁾. Hij vond, dat bij een bepaalde bacterie de bacteriophag steeds denzelfden eindtiter bereikt, tot zekere hoogte onafhankelijk van het aantal bacteriën, waarmede men ent en in 't geheel niet afhankelijk van den aanvangstiter van den bacteriophag. Gewoonlijk wordt n.l. de bouillon eerst geheel troebel, waarna de bacteriën snel tot oplossing komen en de bacteriophag zijn eindtiter bereikt.

Nu kan men zich best voorstellen, dat bij een zoodanig virulenten bacteriophag als dien van *Bac. danicus* de bacteriën uiterst snel worden opgelost, zoodat van een aanvankelijke vermeerdering van het aantal bacteriën hier geen sprake is. Zoo zou dus werkelijk het aantal bacteriën, waarmede men ent, den eindtiter van den bacteriophag kunnen beheerschen.

Daar *Bac. danicus* door zijn betrekkelijk groote afmetingen er zich buitengewoon goed voor leent, werden door mij, al lag dat niet in de lijn van dit onderzoek, toch eenige optische waarnemingen gedaan met betrekking tot het oplossen der bacteriën onder invloed van den bacteriophag.

Daartoe werden een aantal bacillen in bouillon gesuspendeerd; van deze suspensie werd een druppel op een objectglas gebracht, vermengd met een kleine hoeveelheid bacteriophag-filtraat en daarna onder een dekglas met paraffine ingesmolten. Door middel van een, in een thermostaat geplaatste,

¹⁾ Ztschr. f. Hyg. u. Inf. Krkh., 99, 46.

microscopisch was het mogelijk dit preparaat bij een nagenoeg constante temperatuur van 36° te bekijken. De waarneming leerde, dat na 1 of 1½ uur de eerste bacteriën werden aangetast. Het geheele proces der oplossing gaat bij dezen bacteriophage van *Bac. danicus* zóó snel in zijn werk, dat het moment, waarop men eenige verandering in een bacil waarneemt, vrijwel samenvalt met de oplossing of verdwijning zelf. Het verdwijnen der bacteriën geschiedt steeds bij verrassing.

D'HÉRELLE ¹⁾ daarentegen nam waar, dat de oplossing van *B. dysenteriae* Shiga werd voorafgegaan door een opzwellen van de bacteriën, waarna deze na verloop van korter of langer tijd uitéén spatten. Naast het ontstaan van een groot aantal fijne korreltjes binnen de bacterielichamen bracht dit feit hem tot de overtuiging, dat de bacteriën door krachten, die van binnen uit de cel werken, tot oplossing worden gebracht. Verkort in zijn eigen woorden aldus weergegeven „Au début l'aspect des bacilles est normal; après 45 à 60 minutes on voit de fins granules dans l'intérieur des bacilles. De 1 h. 30 après le début, on commence à voir des bacilles ventrus et des corps sphériques, contenant un nombre variable de granules, de 15 à 20 en moyenne. Si l'on suit avec attention un de ces corps sphériques, on assiste après un temps variable, pouvant aller jusqu'à une dizaine de minutes, à un véritable éclatement s'effectuant en l'espace d'une fraction de seconde. Aussitôt après, il reste à la place du corps sphérique un léger flocon nuageux qui se dissout peu à peu, libérant ainsi les fins granules. Ces corps sphériques sont surtout abondants au moment où la lyse est la plus active. Il ne peut y avoir aucun doute au sujet de leur nature: ce sont des bacilles, qui sous l'effet d'une force qui ne peut être qu'interne, prennent d'abord une forme globuleuse puis éclatent; ce qui le prouve, c'est qu'on assiste

¹⁾ D'HÉRELLE, *Le bactériophage, etc.*, 1921, pag. 47.

parfois à l'éclatement de bacilles renflés avant même d' avoir pris la forme sphérique."

D'HÉRELLE acht dit den normalen gang van zaken; wel kan de tijdsduur der verschillende oplossingsfasen verschillen, doch zij verlopen in dezelfde volgorde.

Bij de lysis van *Bac. danicus* is dat geheel anders. In de eerste plaats ziet men daar geen „corps sphériques" of „bacilles ventrus", terwijl men evenmin van een „éclatement" spreken kan. Bij het verdwijnen van een bacil krijgt men meer den indruk van een vochtblaas, die bij matige spanning wordt gepuncteerd en vervolgens in één schrompelt, dan van een bom, die met kracht uitéenspat. Tevens lijkt het slachtoffer bij het verdwijnen uit het veld weg te zakken, zoodat men automatisch op een lager niveau instelt, hoewel ook daar niets meer te zien is.

Het is echter zeer goed mogelijk, dat het geheele proces zich hier zoo snel afspeelt, dat men de door D'HÉRELLE beschreven fasen niet waarnemen kan. Slechts door een in zeer versneld tempo opgenomen microscopische film zou men hieromtrent iets te weten kunnen komen. Langs gewonen fotografischen weg bleek het niet mogelijk iets van de lysis op de gevoelige plaat vast te leggen.

VIERDE HOOFDSTUK

AFSTERVINGSPROEVEN MET DEN BACTERIOPHAAG

A. Telmethoden voor den bacteriophagaag.

Wil men bij deze proeven behoorlijke resultaten verkrijgen, dan is een eerste vereischte, dat men over een betrouwbare telmethode beschikt om het aantal bacteriophagen te kunnen bepalen bij alle mogelijke concentraties. Daartoe staan ons twee methoden ten dienste, n.l.:

De plaatmethode. Vrijwel van den aanvang zijner onderzoekingen af heeft D'HÉRELLE van deze eenvoudige methode gebruik gemaakt. Ze komt hier op neer, dat men de vloeistof, waarin het aantal bacteriophagen bepaald moet worden, eventueel na verdunning, uitstrijkt op een goed gedroogde agarplaat, die van te voren bedekt is met een uiterst dun laagje van voor den bacteriophagaag gevoelige bacteriën. Nadat de vloeistof in de plaat getrokken is, waarbij het plaatsen in een kastje met Calciumchloride de droging sterk bevordert, wordt de plaat gedurende ongeveer 18 uur in de broedstoof bij 26° geplaatst. Hierna telt men de opgekomen plages in de cultuurlaag, houdt rekening met de gebruikte verdunning en benadert op deze wijze met voldoende nauwkeurigheid het aantal bacteriophagen, dat in de oorspronkelijke vloeistof aanwezig was.

De verdunningsmethode. Men maakt een verdunningsreeks van de te onderzoeken vloeistof, zóódanig, dat de opéévolgende bouillon-buisjes een bacteriophagaag-titer hebben van 10^{-1} ,

10^{-2} , 10^{-3} , enz. Nu ent men alle buisjes met gevoelige bacteriën en controleert den volgenden dag in welk buisje nog juist oplossing van de bacteriën plaats heeft. Het rangnummer van dit buisje geeft de waarde van den zoogenaamden lysis-exponent aan.

Het is duidelijk, dat deze laatste methode niet zeer nauwkeurig zijn kan. Gewoonlijk wordt de verdunningsreeks gemaakt met reageerbuizen, die 9 cc. bouillon bevatten. Men brengt 1 cc. van de te onderzoeken vloeistof in een dergelijke buis, mengt goed dooréén en pipetteert 1 cc. in een volgende buis over, enz. Stel dat de oorspronkelijke vloeistof 415.000 bacteriophagen per cc. telt, dan zal de buis met titer 10^{-5} er mogelijk 4 bevatten. Nu pipetteert men uit deze buis 1 cc. over in de volgende (10^{-6}). Het is uitsluitend van het toeval afhankelijk of er en hoeveel bacteriophagen mee over zullen gaan; dat aantal kan bijvoorbeeld 0, 1 of 2 zijn, tengevolge waarvan de mogelijkheid niet uitgesloten is, dat er zelfs in het buisje met titer 10^{-7} nog 1 bacteriophagaag terecht komt. Zou men dus deze bepaling uitvoeren, dan zou de lysis-exponent 5, 6 of 7 kunnen zijn, corresponderende met 100.000, 1.000.000 en 10.000.000 als begin-concentraties. Elke waarneming kan dus 100 maal te hoog of te laag uitvallen.

Nu ware aan dit bezwaar tegemoet te komen door de verdunningstrappen kleiner te nemen, dan worden echter de verdunningsfouten te groot en maakt men de laatste verdunningen in duplo of triplo, dan wordt de methode te bewerkelijk voor een groot aantal waarnemingen.

Zoo is dus de plaatmethode voor nauwkeurige bepalingen aangewezen. Ook deze heeft echter haar nadeelen, zooals door verschillende onderzoekers is aangetoond.

DÖRR en GRÜNINGER¹⁾ noemden bij een vergelijkend

¹⁾ Ztschr. f. Hyg. u. Inf. Krkh., 97, 209.

onderzoek van de beide aangegeven telmethoden als bezwaren tegen de plaatmethode, dat het aantal plages op een telplaat wordt beïnvloed door de verschillende dichtheid der opgebrachte bacteriën-suspensies, het meer of minder gelijkmatig uitstrijken van het mengsel van bacteriën en bacteriophag, de verschillen in vochtigheidsgraad van het agar-oppervlak en den aard van de gebruikte agar.

D'HÉRELLE vond het aantal plages vrijwel onafhankelijk van de dichtheid der bacteriën-suspensie, terwijl GRATIA tot een andere conclusie kwam, n.l. dat het aantal plages bij het dichter worden der suspensie tot zekere grens toeneemt om daarna weer te gaan dalen.

ELIAVA en POZERSKI namen waar, dat op drogere plaatsen van de agar-plaat de bacteriën tegen de inwerking van den bacteriophag werden beschermd.

BECKERICH en HAUDUROY ¹⁾ vergeleken eveneens de beide telmethoden, wat hun tot de overtuiging bracht, dat voor sterk virulente bacteriophagen de plaatmethode en voor zwakke bacteriophagen de verdunningsmethode te verkiezen was en dat voor middelmatig-werkende bacteriophagen beiden geschikt waren.

DÖRR en ZDANSKY ²⁾ deden de proeven van BECKERICH en HAUDUROY over en gaven als hun meening te kennen, dat de verdunningsmethode nog een positief resultaat geeft bij een 100—1000 maal grooteren verdunningsgraad dan de plaatmethode en wel 100 maal, wanneer eerst de bacteriën en dan de bacteriophagen en 1000 maal, wanneer eerst de bacteriophagen en daarna de bacteriën op de telplaat werden gebracht. Dit gold zoowel voor sterke als voor middelmatige en zwakke bacteriophagen.

¹⁾ C. R. de la Soc. de Biol. 86, 165.

²⁾ Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krkh. 100, 78.

Op grond van de uiteenzetting over de onbruikbaarheid der verdunningsmethode voor zeer nauwkeurige waarnemingen zal het wel duidelijk zijn, hoe het mogelijk is, dat deze methode bij een 100—1000 maal grootere verdunning dan bij de plaatmethode is gebruikt, nog een positief resultaat geeft. De waarnemingen van DÖRR en ZDANSKY bevestigen deze redeneering dus volkomen. Niet minder begrijpelijk is het feit, dat de verdunningsmethode nog bij een 1000 maal hogere verdunning positief resultaat geeft, wanneer eerst de bacteriophagen en dan de bacteriën op de plaat worden gebracht, tegen 100 maal in het omgekeerde geval. Uit eigen waarneming is gebleken, dat, wanneer de bacteriophagaag-houdende vloeistof vóór de bacteriën op de agarplaat wordt gebracht, de bacteriophagen zóó snel in de plaat worden binnengezogen of adsorptief gebonden, dat reeds na korten tijd een deel niet meer in staat is plages in de later opgebrachte bacteriën-laag te voorschijn te roepen.

Al heeft ook de plaatmethode blijkens bovengenoemde onderzoeken in sommige gevallen bezwaren, wanneer men de bij deze proeven verkregen betrouwbare resultaten vergelijkt met die, welke bij gewone bacteriën-tellingen bereikt zijn, dan heeft men geen klagen. Althans wanneer het gaat om een dergelijken sterk-virulenten bacteriophagaag als dien van *Bac. danicus*.

Wanneer men een afstervingsproef door verwarming doet met een bacterie en dus op gezette tijden het aantal nog levende individuen bepaalt door telling van het aantal koloniën op de telplaten, dan doet zich deze moeilijkheid voor, dat men niet weet, na hoeveel dagen men het definitieve resultaat vast zal stellen, want nog steeds komen er koloniën bij, die den eersten tijd onzichtbaar waren. Zoo geeft EIJKMAN ¹⁾ voor een afstervingsproef met *B. coli* bij 52° op, dat bij telling na drie dagen een verwarming gedurende 5 minuten voldoende bleek om alle

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, 11, 20.

coli-bacillen te doden, terwijl de telling na 15 dagen een tijdsduur van 35 minuten als zoodanig aangaf. In de 12 tusschenliggende dagen hadden zich op de aanvankelijk steriel gebleven platen nog een zeer groot aantal koloniën ontwikkeld.

Iets dergelijks doet zich bij de bacteriophag-tellingen tijdens de afstervingsproeven niet voor; wel zijn er gewoonlijk op elke plaats na 18 uur behalve de plages van normale afmetingen een aantal zeer kleine zichtbaar, die den volgenden dag tot behoorlijke grootte zijn uitgedijd, doch voor een geoefend oog is het aantal, dat zich bij de definitieve telling aan de waarneming onttrekt, practisch van geen invloed op het eind-resultaat van de proef.

B. Inrichting der afstervingsproef door verwarming.

De eigenlijke afsterving — ter vereenvoudiging van de wijze van beschrijving beschouwen we den bacteriophag nu maar als normaal levend wezen, spreken dus van dood, levend, afsterving, vermenigvuldiging, enz. — had plaats in een breede, platte, zeer dunwandige glazen flesch, met smallen hals, welke aan een schudapparaat bevestigd is, dat de flesch ongeveer 70 maal per minuut over een breedte van 90° heen en weder slingert. Het water van een groot waterbad, dat door reguleurs tot op 0.1° nauwkeurig constant wordt gehouden en van een automatischen roerder voorzien is, reikt tot aan den hals van de flesch. Daar het niveau van de vloeistof ad 100 cc. in de flesch slechts tot op één derde van de totale hoogte reikt en de schudsnelheid zoo is gekozen, dat het juist niet opspat, is de kans op fouten in het resultaat door druppeltjes, die zich hooger op in de flesch verzamelen en ontkomen aan de verwarming, uitgesloten. De flesch is van een wattenprop voorzien.

De vloeistof in de flesch bestaat uit 0.6 % NaCl-oplossing, waaraan 1 % bouillon is toegevoegd, aangezien een zuivere

physiologische zoutoplossing volgens de ervaring van FICKER ¹⁾ voor bacteriën niet absoluut onschadelijk is.

Wanneer het waterbad de gewenschte temperatuur bereikt heeft en voldoende constant blijft, wordt de vooraf gesteriliseerde schudflesch met 99 cc. van genoemde oplossing in het waterbad bevestigd en de schud- en roerinrichting in beweging gebracht. Wanneer ook de inhoud der flesch op temperatuur is, wordt 1 cc. van een eventueel verdund lysaat met een steriele uitloop-pipet in de flesch gebracht, waarbij dus een verdunning van 1 : 100 plaats had. Door nu 1 cc. van hetzelfde lysaat, buiten de schudflesch om, eveneens van 1 : 100 te verdunnen, kan men gemakkelijk het nulpunt der proef bepalen d.w.z. het aantal bacteriophagen, dat per cc. in de schudflesch aanwezig is, vóórdat de afsterving begint. Bij snelverlopende afstervingen is dat onmisbaar, omdat de verdeling der bacteriophagen in de schudflesch niet dadelijk gelijkmatig is en de afsterving direct begint.

Als regel werd bij iedere waarneming tijdens het verloop der afsterving 0,5 cc. met een steriele pipet (voorzien van begin- en eindstreep) uit de rustig-doorschuddende flesch genomen en direct overgebracht in een kolfje met 49.5 cc. van dezelfde vloeistof als in de schudflesch aanwezig is, zoodat een verdunning van 1 : 100 werd verkregen. Verdunningen van 1 : 10 werden bereikt door 5 aan 45 cc. toe te voegen.

Bij de bepaling van den lysis-exponent van den bacteriophagaag maakt men bij voorkeur gebruik van reageerbuizen met 9 cc. vloeistof, waaraan men dan 1 cc. toevoegt om tot een verdunning van 1 : 10 te komen. De vloeistof behoorlijk doorschudden om te mengen kan men niet; om schuimvorming te voorkomen moet men met snel ronddraaien tusschen de handen volstaan. Met het oog daarop en tevens om sneller de gewenschte ver-

¹⁾ Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krk., 92.

dunning te bereiken werd aan fleschjes met grooter inhoud en meer vloeistof de voorkeur gegeven.

Een eigenaardige moeilijkheid bij den bacteriophag is, zooals reeds eerder werd opgemerkt, dat men niet van te voren bepalen kan, hoe groot het aantal bacteriophagen per cc. in een gegeven lysaat is. Bij bacteriën kan men de dichtheid der te gebruiken suspensie naar verkiezing wijzigen door meer of minder bacteriën te gebruiken en, wat het voornaamste is, bij benadering bepalen door eenige tellingen in het telraam onder het microscoop uit te voeren. Bij den bacteriophag niets van dit alles; men moet op goed geluk af werken. Aanvankelijk is dan ook menige afstervingsproef alleen reeds hier door mislukt. Bij den bacteriophag van *Bac. danicus* bleek echter later, zooals gezegd, een verband te bestaan tusschen het aantal bacteriën, waarmede men ent, en den titer van het lysaat, terwijl ook in de fijne schakeeringen in helderheid van het lysaat een middel werd gevonden om zich voor al te groote misschattingen te vrijwaren.

De eindverdunningen der genomen monsters werden nu zoo gekozen, dat 0.1, 0.2, 0.3 of 0.5 cc. een behoorlijk aantal plages per telplaat gaf, d.w.z. van 50—500 ongeveer. Afgezien van den tijd, dien het kost, kan men tot ver over de 1000 plages per plaat met voldoende nauwkeurigheid tellen. Dit geschiedde altijd met de „telpijp” — een apparaatje, dat bij het neerdrukken elke getelde plage op de achterzijde van de glasdoos met inkt merkt en automatisch telt — en bij doorvallend licht.

De gebruikte cultuurplaten van 12 cM diameter bestonden uit 1.5% vleeschagar met 1% glucose; ze werden zoo sterk mogelijk gedroogd en daarna kort voor den aanvang der proef bestreken met een dunne bacteriën-laag. Na het opbrengen der verdunde bacteriophagvloeistof werden ze snel boven Ca Cl_2 gedroogd en 18 uur bij 26° bebroed; daarna werd het aantal plages per plaat geteld. (Zie photo E, pag. 80).

Alvorens een volledige afstervingsproef kon worden gedaan, moest eerst worden nagegaan, of de bacteriophag bij kamertemperatuur (16°) niet reeds schade leed bij verblijf in de schudflesch met physiologische zoutoplossing, waaraan 1 % bouillon was toegevoegd. Daartoe werd evenals bij een normale afsterving in de vloeistof der heen en weder slingerende flesch 1 cc. lysaat gebracht van zoodanige sterkte, dat $\frac{1}{2}$ cc. uit de flesch genomen na verdunning van 1 : 50.000 ongeveer 200 plages per telplaat gaf; na bepaalde tijden werden monsters genomen en steeds evenveel verdund. Het eenigste onderscheid van een gewone proef was dus, dat het waterbad niet verwarmd werd. De volgende waarden werden daarbij verkregen :

TABEL 1.

Temperatuur	Tijd	Plages per plaat	Verdunning
16°	0'	226	50.000
	1'	225	„
	15'	193	„
	30'	224	„
	60'	223	„
	120'	238	„
	180'	221	„

Binnen 3 uur sterven er onder deze omstandigheden blijkbaar geen bacteriophagen af. Tevens geven de vermelde aantallen plages eenig inzicht in de nauwkeurigheid der telmethode; vergeleken met bacterie-tellingen maken deze uitkomsten geen slecht figuur. Routine en nauwgezet werken zijn echter eerste vereischten, terwijl desondanks soms groote afwijkingen van het gemiddelde gevonden worden. (Tabel 1, 15' bijv.)

Nu kwam het er verder op aan door eenige oriënteerende waarnemingen te bepalen bij welke temperatuur de afsterving een zoodanig verloop heeft, dat het aantal levende bacteriophag-

gen binnen $1\frac{1}{2}$ à 2 uur van 100 tot 1% daalt. Daar men toch nog onbekend is met de afstervingsnelheid bij verschillende temperaturen, is het verreweg 't eenvoudigste om de verdunning der proefmonsters constant te houden en niet te trachten de verdunningen met de afstervingsnelheid in overeenstemming te brengen.

Bij 38.5° was er binnen 3 uur evenmin van beschadiging van den bacteriophag sprake :

TABEL 2.

Tempera- tuur	Tijd	Plages per plaat	Verdunning
38.5°	0'	85	100.000
	1'	86	„
	15'	88	„
	30'	96	„
	60'	95	„
	120'	84	„
	180'	94	„

Bij 41.5° is het na 3 uur twijfelachtig, of de afsterving reeds aanvangt :

TABEL 3.

Tempera- tuur	Tijd	Plages per plaat	Verdunning
41.5°	0'	80	100.000
	2'	94	„
	15'	88	„
	30'	97	„
	60'	90	„
	120'	94	„
	180'	66	„

Bij 45° is er na 1 uur verwarmen reeds 25% der bacteriophagen afgestorven, zooals uit de volgende cijfers blijkt:

TABEL 4.

Temp.	Tijd	Pl. p. pl.	Verdunning	Totaal-aantal in 10 ⁶	Levend %
45°	0'	598	50.000	299	100
	1'	590	"	295	98.3
	15'	533	"	266.5	89
	30'	473	"	236.5	79
	45'	462	"	231	77
	60'	455	"	227.5	75.7
	75'	442	"	221	73.3

Bij een temperatuur van 60° bleek de afstervingsnelheid zeer groot te zijn; met 't oog daarop zijn de laatste verdunningen zeer klein genomen:

TABEL 5.

Temp.	Tijd	Plages per plaat	Verdunning	Totaal
60°	0'	220	50.000	11 × 10 ⁶
	5'	529	5	2645
	10'	103	5	515
	15'	51	5	255
	25'	29	5	145

Tenslotte voldeed bij 50° het verloop der afsterving aan den gestelden eisch van snelheid.

Het doel was dus nu om na te gaan of de afsterving der bacteriophagen voldoet aan de formule der monomoleculaire reactie

$$K = \frac{1}{0.434 \times t} \log \frac{a}{a-x}$$

dan wel een afstervingskromme vertoont, die in verband staat met de individueele variatiekromme. Zooals vroeger reeds besproken is, zal in het laatste geval vooral het begin van de kromme karakteristiek zijn, omdat dan de afsterving zeer langzaam op gang komt, in het midden tamelijk snel verloopt en wederlangzaam eindigt, in tegenstelling met den logaritmischen vorm der kromme in het eerste geval. Om deze reden was het noodig de waarnemingspunten bij den aanvang van het proces zeer dicht opeen te plaatsen, terwijl verderop met grootere intervallen kon worden volstaan.

In tabel 6 zijn de gevonden getallen vereenigd. Het aantal plages per plaat vermenigvuldigd met de verdunningsfactor geeft 't aantal bacteriophagen per cc. in de schudflesch; de concentratie in het lysaat van uitgang is dus nog $100 \times$ hoger. Teneinde de gegevens ook aan de formule der monomoleculaire reactie te kunnen toetsen, zijn in de beide laatste kolommen de waarden van $\log(a-x)$ en de reactie-constante K opgenomen. Zet men graphisch $\log \frac{a}{a-x}$ (waarin a het aantal levende bacteriophagen aan het begin der proef voorstelt en x het aantal reeds gedooide op het tijdstip t) en den tijd t uit, dan moet bij het opgaan der formule een rechte lijn gevonden worden. Daarom is het voor dit doel ook onverschillig, of men $\log \frac{a}{a-x}$ dan wel $\log(a-x)$ uitzet. In grafiek 1 geeft de getrokken lijn het verband aan tusschen de percentages nog levende bacteriophagen en den duur der afsterving, terwijl de punt-streeplijn de waarden $\log(a-x)$ op de opéénvolgende waarnemingstijden doet zien. De waarde van K weerspiegelt zich in de helling, die de lijn $\log(a-x)$ met den x -as maakt. (Zie de grafieken achter in dit boek).

TABEL 6.

Tijd	Pl. p. pl.	f_v	Pl. totaal in 10^6	Levend %	$\log (a-x)$	K
0'	680	50.000	34.—	100	2.—	—
1'	635	„	31.8	93.4	1.97	0.069
3'	585	„	29.3	86.—	1.93	0.054
5'	569	„	28.5	83.7	1.92	0.037
7'	521	„	26.1	76.6	1.88	0.040
10'	752	33.333	25.1	73.8	1.87	0.030
13'30''	683	„	23.8	69.9	1.84	0.028
17'	668	„	22.3	65.5	1.82	0.024
21'	621	„	20.7	60.9	1.78	0.024
25'	541	„	18.0	53.—	1.72	0.027
30'	488	„	16.3	47.9	1.68	0.025
40'	419	„	14.0	41.1	1.61	0.023
50'	378	„	12.6	34.1	1.53	0.022
60'	971	10.000	9.7	28.6	1.46	0.021
75'	646	„	6.5	19.—	1.28	0.022
90'	663	„	6.6	19.5	1.29	0.022
105'	1014	5.000	5.1	14.9	1.17	0.018
120'	1756	2.500	4.4	12.9	1.11	0.017

Zoowel uit de tabel als de grafiek blijkt overtuigend, dat er onder de gegeven omstandigheden geen sprake is van een langzaam beginnende afsterving, doch dat deze veeleer volgens de formule der monomoleculaire reactie verloopt; echter met deze restrictie, dat de reactie-constante K tijdens het proces een duidelijken „gang” vertoont en voortdurend afneemt.

Daar bij deze proef na 2 uur verwarmen nog 12.9% der bacteriophagen in leven waren en het van belang was te weten of het afnemen der reactie-constante zich ook voordeed in het verdere verloop der afsterving, werd nu een proef bij 55° genomen, waardoor tevens de duur der proef werd verkort. Een tweede punt, dat nader beschouwd diende te worden, was de vraag, of er een verband bestond tusschen de afstervingsnelheid en het aantal bacteriophagen, dat per cc. in de schudflesch

Beziet men de resultaten dezer twee parallel-proeven, dan is het duidelijk, dat de invloed van de bacteriophag-concentratie op de snelheid van de afsterving uitermate gering moet zijn. Wel is bij proef B de reactie-snelheid voortdurend iets geringer, maar wanneer men in aanmerking neemt, dat de temperatuur van het waterbad aan kleine schommelingen onderhevig is, welke de snelheid toch reeds beïnvloeden, mag men daaraan geen al te groote waarde hechten. Om technische redenen was het niet mogelijk beide proeven te gelijker tijd in hetzelfde waterbad te doen; slechts dan waren de resultaten der beide proeven ook in deze kleinere verschillen betrouwbaar geweest.

Wat het afnemen der reactie-constante betreft, dit zet zich blijkbaar ook tijdens de verdere afsterving voort, hoewel in steeds geringere mate.

Het ligt voor de hand zich af te vragen, of het niet de reeds gedoode bacteriophagen zijn of de reactie-producten, die tijdens de afsterving ontstaan, welke de reactie-constante voortdurend doen dalen. Om dit uit te maken werd op nauwkeurig dezelfde wijze als de vorige een nieuwe proef gedaan, waarbij echter 1 cc. van het physiologisch zoutwater in de schudflesch door 1 cc. van een onverdund lysaat vervangen werd, waarin de bacteriophagen door één uur op 60° te verwarmen gedood waren, zoodat er nu bij den aanvang van de proef reeds 100 maal meer dood materiaal aanwezig was, dan er levend werd bijgevoegd.

Tabel 8 geeft het resultaat; ter vergelijking zijn de waarde der reactie-constanten uit tabel 7 (proef A) naast de nieuw-verkregene genoteerd.

De invloed van het gedoode materiaal of der reactie-producten op de snelheid der afsterving is dus praktisch gesproken nul. Dit geeft geen verklaring voor het feit, dat de reactie-constante voortdurend blijft afnemen.

Welke rol speelt het eiwit, dat tot nu toe ad 1% (als bouillon

TABEL 8.

Temperatuur 55°.

Tijd	Pl. per plaat	f_v	totaal per cc.	Levend %	Log (a-x) + 2	K	K_A
0'	530	500	265.000	100.—	4.—	—	—
2'	82	100	74.620	28.2	3.45	0.63	0.60
5'	565	50	28.250	10.7	3.03	0.45	0.41
10'	364	50	18.200	6.9	2.84	0.27	0.32
20'	414	10	4.140	1.6	2.20	0.21	0.21
30'	387	5	1.935	0.73	1.86	0.16	0.16
40'	176	5	880	0.33	1.52	0.14	0.15
50'	115	3.3	380	0.14	1.15	0.13	0.14
75'	31	2	62	0.023	0.36	0.11	0.11

berekend) aan de physiologische zoutoplossing in de schudflesch was toegevoegd? Dat was de tweede vraag, die zich in dit verband opdrong. Om hiervan eenig idee te krijgen, werden twee proeven gedaan, waarbij de vloeistof in de ééne schudflesch 10% bouillon bevatte en in de andere alléén minerale bestanddeelen. Men bedenke echter, dat men met den, hoe ook verdunden, bacteriophagaag toch altijd een hoeveelheid eiwit meebrengt zoowel uit de voor de bacteriën gebruikte bouillon als van de opgeloste bacteriën zelf. Relatief blijft dezelfde overmaat ten opzichte van den bacteriophagaag bestaan; een scheiding te maken is onmogelijk.

Eerst moest echter onderzocht worden, of in zulk een nagenoeg eiwitvrij milieu de bacteriophagaag niet reeds bij kamertemperatuur schade leed. Die vrees bleek gelukkig althans voor een tijdsduur van 3,5 uur ongegrond, zooals tabel 9 blijken doet.

TABEL 9.

Temp.	Tijd	Plages per plaat	f_v
15°	0'	530	500
	2'	504	„
	60'	521	„
	210'	525	„

Tabel 10 en grafiek 3 hebben betrekking op de afsterving in eiwitvrij milieu (V) en met 10% bouillon (E).

TABEL 10. Temperatuur 55°.

Tijd	pl. per pl.	f_v	Pl. p. cc.	Levend %	$\text{Log.}_{(a-x)} + 2$	K
E 0'	114	500	57.000	100.—	4.—	—
2'	115	100	11.500	20.2	3.31	0.79
5'	60	50	3.000	5.3	2.72	0.59
10'	190	10	1.900	3.3	2.52	0.34
20'	115	10	1.150	2.—	2.30	0.20
30'	52	10	520	0.91	1.96	0.16
40'	59	5	295	0.52	1.72	0.13
50'	55	3.3	182	0.32	1.51	0.12
75'	11	2	22	0.038	0.58	0.11
V 0'	148	1000	148.000	100.—	4 —	—
2'	201	100	20.100	13.5	3.13	1.—
5'	69	100	6.900	4.7	2.67	0.61
10'	149	10	1.490	1.—	2.—	0.46
20'	80	5	400	0.27	1.43	0.30
30'	30	2	60	0.041	0.61	0.26
40'	5	2	10	0.007	0.15	0.24

Blijkbaar is de invloed van het eiwit op de snelheid van afsterving zeer groot, zoodat in het nagenoeg eiwitvrije milieu binnen 30 minuten nog slechts 0.041% van het oorspronkelijke aantal bacteriophagen in leven zijn; in de 10% bouillon bevattende vloeistof wordt dit percentage eerst na 75 minuten verwarmen bereikt (0.038% nog in leven). In principe blijft echter de afstervingskromme ongewijzigd; de volgens de formule der monomoleculaire reactie abnormale vertraging der reactie-snelheid blijft bestaan.

Een derde mogelijkheid, waarin de oorzaak van dit verschijnsel gelegen zou kunnen zijn, was deze, dat het voor de proeven

gebruikte lysaat uit verschillend resistente bacteriophagenstammen bestond, welke bij de afsterving na elkander in reactie traden. Door de wijze van overenten van den bacteriophagaag, n.l. door steeds één druppel lysaat, bevattende ongeveer 150 miljoen bacteriophagen, aan een volgende bacterie-suspensie toe te voegen, was er nooit eenige selectie tot stand gekomen, al was deze bacteriophagaag reeds meer dan één jaar in cultuur.

Om dit nader onder oogen te zien werd van een gewone telplaat, waarvan de opgebrachte bacteriophagaag een verhitting van 50 minuten op 55° had doorstaan, één plage afgeënt. Met het daaruit voortgekomen lysaat werd den volgenden dag een afstervingsproef (A) en na weder overenten den daarop volgenden dag een tweede (B) gedaan en wel beide in eiwitvrij milieu.

De gevonden getallen vindt men in tabel 11 en grafiek 4.

TABEL 11. Temperatuur 55°.

Tijd	Pl. p. pl.	t_v	Totaal per cc.	Levend%	Log. (a-x) + 2	K
A 0'	189	1000	189.000	100.—	4.—	—
2'30"	145	100	14.500	7.7	2.89	1.021
5'	250	10	2.500	1.3	2.11	0.874
10'	18	10	180	0.1	1.—	0.690
20'	10	5	50	0.03	0.48	0.405
B 0'	242	1000	242.000	100.—	4.—	—
2'	392	100	39.200	16.2	3.21	0.897
5'	135	100	13.500	5.6	2.75	0.575
10'	509	10	5.090	2.1	2.32	0.386
20'	140	5	700	0.29	1.46	0.127
30'	43	5	215	0.09	0.95	0.102
40'	12	5	60	0.02	0.30	0.093

Ook hier blijft de abnormale snelheids-vertraging bestaan, maar tevens doet zich het merkwaardige feit voor, dat de één-

maal overgeënte bacteriophag, die een verwarming van 50 minuten op 55° doorstaan heeft, gevoeliger is bij een tweede verhitting dan normaal en dat door herhaald overenten de normale gevoeligheid terugkeert.

In verband met de opmerking van COHEN, dat bij de afsterving van bacteriën vaak onregelmatigheden worden veroorzaakt door veranderingen in de waterstofionenconcentratie der vloeistof tijdens de proef, werd nog een afsterving gedaan in een volgens zijn recept bereide bufferoplossing, bestaande uit 50 cc. $\frac{m}{5}$ KH_2PO_4 en 29.63 cc. $\frac{m}{5}$ NaOH in 5000 cc. gedestilleerd water. Colorimetrisch werd de PH tot 7 gecorrigeerd.

De contrôle-proef bij kamertemperatuur gaf tot uitkomst, dat onder die omstandigheden geen afsterving plaats heeft:

TABEL 12.

Temp.	t.	pl. per pl.	f_v
15°	0'	152	1000
	15'	150	"
	30'	141	"
	60'	150	"
	90'	148	"
	120'	141	"

Bij 51° verliep de afsterving als volgt:

TABEL 13.

t.	pl. per pl.	f_v	totaal	% levend	log (a-x)	K
0'	152	1000	152.000	100.-	2.—	—
2'	390	100	39.000	25.7	1.41	0.679
5'	260	100	26.000	17.-	1.23	0.354
10'	240	50	12.000	7.2	0.86	0.262

Ook in dit milieu dus een aanmerkelijke vertraging van de normale snelheid. Blijkbaar is bovendien de vloeistof bij deze

temperatuur schadelijker voor den bacteriophag dan de tot nu toe gebruikte.

C. Afsterving in zuur milieu.

Om nader uit te maken, of het afnemen der reactie-constante ook bij andere wijze van afsterving optreedt, werd vervolgens het gedrag van den bacteriophag in een zure omgeving nagegaan. Daartoe werd zooveel $\frac{n}{10}$ H₂SO₄ aan de physiologische zoutoplossing in de schudflesch toegevoegd, dat het afstervingsproces de gewenschte snelheid verkreeg. Dit bleek bij een PH = 3.83 het geval te zijn, wanneer de afsterving bij kamertemperatuur (15°) plaats had. Overigens bleef de wijze van werken hetzelfde. Tabel 14 en grafiek 5 geven het verloop der afsterving weer.

TABEL 14. Temp. 15°. PH = 3.83.

Tijd	Pl. p. pl.	f_v	Totaal in 10 ⁸	Levend %	Log. (a-x)	K
0'	72	1000	72.-	100.-	2.—	—
5'	69	1000	69.-	95.9	1.98	0.009
10'	64	1000	64.-	88.9	1.95	0.012
20'	115	500	57.5	80.-	1.90	0.012
40'	90	500	45.-	62.5	1.80	0.012
60'	248	100	24.8	34.4	1.54	0.017
80'	284	50	14.2	20.-	1.30	0.020
120'	574	10	5.7	8.-	0.90	0.021
162'	810	2	1.6	2.25	0.35	0.021

Naar het einde toe is hier dus in tegenstelling met alle voorgaande proeven een geringe toename van de reactie-constante waar te nemen.

D. Afsterving door ultraviolette-stralen.

Tenslotte werd de invloed van ultraviolette-stralen op de

afsterving van den bacteriophage quantitatief nagegaan. Het lysaat werd onverdund in een kwarts-erlenmeyer gebracht en aan een schudtoestel loodrecht boven de kwartslamp bevestigd. De afstand van den bodem van de erlenmeyer tot aan de lamp bedroeg 189 cM. De lamp brandde op 220 Volt wisselstroom. Teneinde de erlenmeyer op kamertemperatuur te houden, was er vlak bij een electrischen ventilator opgesteld, die voor de noodige afkoeling zorg droeg.

Aanvankelijk werd bij de voorproeven een duidelijke vertraging aan het begin der afsterving waargenomen, zoodat de afstervingskromme bij een snel verloop van het proces een duidelijken S-vorm vertoonde. Later bleek dit echter aan de zwakke uitstraling van de kwartslamp bij den aanvang der proef toe te schrijven te zijn. Daarom was het noodig, de lamp minstens 15 minuten vóór het begin der bestraling te laten branden, waarna de energie-uitstraling vrij constant bleef. De gevonden getallen ziet men vereenigd in tabel 15 en grafiek 6.

TABEL 15.

Tijd	Pl. p. pl.	f_v	Totaal in 10^6	Levend %	$\text{Log}_{(a-x) + 1}$	K
0'	307	10^7	3070	100.-	3.—	—
4'	277	10^7	2770	90.2	2.96	0.023
8'	255	10^7	2550	83.-	2.92	0.023
12'	213	10^7	2130	69.4	2.84	0.029
20'	178	10^7	1780	58.-	2.76	0.016
28'	150	10^7	1500	49.-	2.69	0.025
37'	—	—	—	—	—	—
48'	186	$\frac{1}{3} \cdot 10^7$	620	20.-	2.30	0.034
60'	121	10^7	400	13.-	2.11	0.035
72'	54	10^7	180	5.8	1.76	0.039
84'	61	10^6	61	2.-	1.30	0.046
96'	27	10^6	27	0.88	0.94	0.048
120'	5	10^6	5	0.16	0.20	0.053

Evenals in het vorige geval is er een geringe toename van de reactie-constante waar te nemen.

VIJFDE HOOFDSTUK

BESPREKING VAN DE RESULTATEN DER AFSTERVINGSPROEVEN

Het eerste punt, dat een bespreking waard schijnt, is wel deze vraag, of de bacteriophag werkelijk vernietigd is, wanneer bij uitzaaing op de plaat geen plages meer opkomen. Het zou even goed mogelijk kunnen zijn, dat er slechts van een inactivering sprake was. Het behoeft niet te verwonderen, dat er bij de vele tegenstrijdige gegevens over de afstervingstemperatuur van den bacteriophag en de daaruit voortgesproten meningsverschillen reeds eerder naar een antwoord op deze vraag gezocht is.

HAUDUROY ¹⁾ kwam bij zijn proeven over den invloed van de temperatuur op diverse bacteriophagen tot de conclusie, dat elke bacteriophag, al naar gelang hij minder of meer virulent is, bij temperaturen van 60°—90° binnen 5 minuten wordt geïnactiveerd, terwijl voor alle bacteriophagen 5 minuten verwarmen op 102° eerst doodelijk is. De aanwezigheid van nog levende bacteriophagen werd gecontroleerd door de verwarmde vloeistof bij bacteriën-suspensies te brengen, welke dan bij positief resultaat oplossen; dus niet door de vorming van plages. De inactivering maakte zich nu hierdoor kenbaar, dat na verwarming van 5 minuten bij temperaturen van 60°—90° de

¹⁾ Arch. Intern. de Pharmacodyn. et de Ther., 28, 1.

onderzochte bacteriophag bij toevoeging aan een jeugdige bacteriën-suspensie niet aanstonds lysis te voorschijn riep, doch eerst na eenige filtraties. Door deze bewerking werd zulk een geïnactiveerde bacteriophag weer gereactiveerd. Hierin zag HAUDUROY een bewijs, dat er naast den bacteriophag ook nog een in de vloeistof overgaande door de bacteriën zelf afgescheiden stof moet zijn, die de lysis mogelijk maakt. En nu zou het juist deze stof zijn, die bij lagere temperaturen wordt vernietigd, maar de eigenlijke bacteriophag blijft tot 102° bij 5 minuten verwarmen volkomen onbeschadigd. Men heeft dus bij den bacteriophag met een complex te doen.

WAGEMANS ¹⁾ onderzocht deze quaestie eveneens en leverde tevens zeer terecht critiek op het werk van HAUDUROY. Diens fout was namelijk, dat hij de bacteriophag-houdende vloeistoffen verwarmde in open buisjes, die gedeeltelijk in een waterbad van de gewenschte temperatuur waren gedompeld en met de hand werden geschud. Daardoor bestond de mogelijkheid, dat er zich in de buisjes boven het niveau van het warme water druppeltjes aan de verwarming onttrokken en aanleiding gaven tot een verkeerd resultaat, vooral wanneer men bedenkt, dat bij een concentratie van 3×10^9 bacteriophagen per cc. (wat voor den bacteriophag van *Bac. danicus* bijvoorbeeld normaal was) reeds de allerfijnste druppeltjes een groot aantal bacteriophagen bevatten en één bacteriophag voldoende is om lysis te doen ontstaan. De eenigste betrouwbare methode ter bepaling van de temperatuur, bij welke na verloop van zekeren tijd de bacteriophag volledig afsterft, is die, waarbij dichtgesmolten buisjes met de te onderzoeken vloeistof geheel in het warme water worden ondergedompeld.

WAGEMANS kwam nu op deze wijze tot de conclusie, dat wel de afstervingstemperatuur (bij constante verwarmingstijd)

¹⁾ Arch. Intern. de Pharmacodyn. et de Ther., 28, 176.

voor verschillende bacteriophagen ver uitéénloopt, maar dat de resultaten van zijn onderzoek hem niet toestaan een onderscheid te maken tusschen de inactiveringstemperatuur en de afstervingstemperatuur.

Om over dit punt een eigen oordeel te kunnen vormen werd met den bacteriophag van *Bac. danicus* de volgende proef gedaan:

Een hoeveelheid lysaat werd gedurende 1 uur op 60° verwarmd. Zooals de ervaring geleerd had, was daarna het aantal plages, dat opkwam bij uitzaaiing van 0.1 cc. onverdund lysaat zoo gering, dat men juist op de grens was van er nu eens één en dan weer geen aan te treffen. Vervolgens werden nu dadelijk na elkander 9 platen, die te voren met bacteriën waren bestreken, met 0.1 cc. geënt en daarnaast eveneens 9 kolfjes met bacteriën-suspensies in bouillon met 0.1 cc. bedeed. Den daarop volgenden dag werden de platen gecontroleerd met het volgende resultaat:

4 platen met 0 plage(s)	
3 „ „ 1 „	
1 plaat „ 2 „	(positief: negatief = 5 : 4)
1 „ „ 3 „	

Verrassend genoeg bleken echter alle kolfjes troebel te zijn, doch na verloop van eenige dagen kwamen de bacteriën in sommige kolfjes voor het grootste deel tot oplossing en wel:

4 kolfjes opgehelderd

5 kolfjes troebel (positief: negatief = 4 : 5)

Door filtratie was het niet mogelijk in de troebel gebleven kolfjes den bacteriophag te reactiveeren; de opgehelderde kolfjes gaven een normalen bacteriophag.

Hieruit blijkt dus overtuigend, dat bij den bacteriophag van *Bac. danicus* met de laatste plage ook de bacteriophag voorgoed verdwijnt. Achteraf beschouwd is het begrijpelijk,

dat alle kolfjes zij het ook met een gering onderling verschil aanvankelijk troebel waren, immers de vier later opgehelderde kolfjes waren slechts met één of enkele bacteriophagen geënt tegenover in het normale geval met één druppel lysaat, d.w.z. met ongeveer 150 miljoen. De welig groeiende bacteriën hebben den eersten tijd geheel de overhand gehad, maar later volgde een vertraagde lysis, daar deze bacteriophagaag ook oudere bacteriën vermag op te lossen. Bij een minder virulenten bacteriophagaag zal dit laatste niet plaats hebben; eerst na filtratie blijkt de aanwezigheid van den bacteriophagaag, op deze wijze aanleiding gevend tot de opvatting, dat er een reactivering zou plaats hebben.

Op grond van deze proef kom ik dus tot dezelfde conclusie als WAGEMANS, n.l. dat er ook voor den bacteriophagaag van *Bac. danicus* géén onderscheid tusschen inactiverings- en afstervings-temperatuur bestaat.

Quantitatief is de invloed van de temperatuur op den bacteriophagaag slechts door DE NECKER¹⁾ onderzocht. Daartoe verhitte hij gelijke hoeveelheden lysaat gedurende een $\frac{1}{2}$ uur in een waterbad bij temperaturen, die van 40° — 70° met sprongen van 2 graden stegen; vervolgens werd de bacteriophagaag-concentratie bepaald volgens de verdunnings-methode, tengevolge waarvan de gevonden waarden, zooals vroeger reeds werd aangetoond, slechts bij benadering juist zijn. Zijn conclusie is, dat een bacteriophagaag voor *Bac. d' HÉRELLE* bij verwarming gedurende een half uur op temperaturen beneden 48° geen schade lijdt, bij temperaturen van 48° — 60° langzaam, boven 60° snel in activiteit vermindert, om tenslotte bij 70° gedood te worden. De vorm der afstervings-kromme is uit deze cijfers niet op te maken, daar bij elke temperatuur slechts één waarneming (na 30 ') werd verricht.

¹⁾ C. R. de la Soc. de Biol., 86, 736.

ZÖLLER¹⁾ toonde reeds eerder aan, dat de bacteriophage door de ultra-violette stralen van een kwartslamp, die op 220 Volt brandde en zoover van de bestraalde vloeistof verwijderd was, dat de temperatuur niet boven 45° steeg, binnen 15 minuten werd gedood. Ook hier dus niets naders omtrent de afstervingskromme.

De resultaten van de afstervingsproeven met den bacteriophage van *Bac. danicus* kunnen in het kort aldus worden samengevat:

a. De afsterving van den bacteriophage door verwarming verloopt niet zoodanig, dat men eenig verband met de individuele variatiekromme aannemen kan; veeleer volgt het proces de formule der monomoleculaire reactie, echter met dien verstande, dat de reactie-snelheid naar deze formule gerekend een abnormale vertraging vertoont.

b. De afname van de reactie-constante tijdens de afsterving door verwarming wordt binnen zekere grenzen niet beïnvloed door toevoeging van reeds gedooide bacteriophagen aan het medium, noch verklaard door de aanwezigheid van eiwit in de vloeistof, evenmin berust zij op het in het lysaat voorkomen van bacteriophagen-stammen van ongelijke resistentie of op veranderingen in de waterstofionenconcentratie der vloeistof.

c. De snelheid van afsterving wordt door toevoeging van bouillon aan het milieu sterk vertraagd.

d. Bacteriophagen, die de afsterving overleven, zijn bij de eerste overenting gevoeliger voor hoge temperaturen dan normaal. Zij herstellen zich bij verdere overenting.

e. In zuur milieu en bij bestraling met ultra-violette stralen werd een afstervingskromme gevonden, die eveneens de formule der monomoleculaire reactie naderde, waarbij echter de reactie-

¹⁾ C. R. de la Soc. de Biol., 89, 860.

constante tijdens het verloop van het proces een toename vertoonde.

In zoverre stellen de resultaten van deze proeven dus teleur, dat zij niet toestaan een nieuw argument ten gunste van de theorie van D'HÉRELLE aan te voeren; evenmin echter pleiten zij voor de andere opvattingen. Een afstervingslijn, die een duidelijk verband met de individueele variatiekromme had aangetoond, ware een onwederlegbaar bewijs geweest voor de levende natuur van den bacteriophagaag; de logaritmische afstervingskromme sluit haar niet uit.

Toch zijn er nog enkele punten, die een nadere beschouwing waard zijn en hier besproken zullen worden.

Het onder *d* genoemde feit, dat n.l. bacteriophagen, die een temperatuur van 50° gedurende 60' doorstaan hebben, na de eerste overenting gevoeliger zijn dan normaal voor hoge temperaturen en zich gaande weg weder herstellen, zal heel moeilijk anders dan uit het leven van den bacteriophagaag verklaard kunnen worden. Intusschen lijkt er een tegenstrijdigheid te bestaan tusschen het vermogen van den bacteriophagaag om zich aan hoge concentraties van bepaalde schadelijke stoffen of, in het algemeen, aan ongunstige omstandigheden aan te passen en deze waarneming. Het is niet zeker, dat alle bacteriophagen zich op dezelfde wijze gedragen; dat zou nader onderzocht moeten worden.

Bij bacteriën bleek door een onderzoek van ALLEN ¹⁾, dat de „temperature-shock” bij verwarming van 30 minuten op 75° in twee verschillende richtingen de reproductie in melk kan beïnvloeden; de meeste bacteriën worden in hun reproductie geschaad; voor sommige is het echter een stimulans tot snellere groei. Het is mogelijk, dat bij bacteriophagen ook iets dergelijks

¹⁾ Journ. of Bacteriol., 8, 555.

voorkomt, d.w.z. dat de bacteriophagen, die de verhitting verdragen hebben, ook na eenige vermenigvuldiging nog niet op één lijn kunnen worden gesteld, wat hun vitaliteit betreft, met nog niet verwarmde bacteriophagen. Evenals bij bacteriën wordt dat door het aanpassingsvermogen niet uitgesloten.

Daar de afsterving van den bacteriophagaag door verwarming niet nauwkeurig volgens de formule der monomoleculaire reactie verloopt en dus de „reactie-constante” niet constant is, kan men ook niet spreken van een temperatuurs-quotient Q_{10} . Toch is het verleidelijk, zij het dan ook globaal, de waarde van Q_{10} te berekenen. Bij 50° bedraagt de „reactie-constante”, wanneer er nog slechts 0.04 % in leven is van het oorspronkelijk aantal bacteriophagen, 0.0138; bij 60° en 0.03 % in leven 1.61, zoodat

$$Q_{10} = \frac{1.61}{0.0138} = 116.6$$

De aanvangssnelheden kunnen bij deze temperaturen niet vergeleken worden, daar bij 60° de afsterving zoo snel verloopt, dat een groot percentage reeds binnen de eerste minuut gedood wordt. Deze berekening van Q_{10} mag men niet anders dan als een raming beschouwen.

Ter vergelijking met andere afstervings- of denatureeringsprocessen zijn hier enkele waarden van temperatuursquotienten, ontleend aan PRZIBRAM ¹⁾, verzameld. (Zie tabel 16.)

Wanneer men de bovenstaande gegevens overziet, blijkt aanstonds, dat van een scheiding in levende wezens en levenlooze stof naar de grootte van Q_{10} geen sprake kan zijn. Evenmin geeft omgekeerd de waarde van Q_{10} eenig houvast omtrent de al of niet levende natuur van het object. $Q_{10} = 116$ en het temperatuursgebied van $50^\circ - 60^\circ$ kan even goed worden aan-

¹⁾ Temperatur und Temperaturen im Tierreiche, 1923.

TABEL 16.

Waarnemer	Object	Q ₁₀	Onderzocht temp. - gebied
FINGER	Afsterving Gonococcus door verwarming	36	45-40
DUCLAUX	Afsterving Tuberkel-bacillen door verwarming	16	65-55
„	Idem	6	70-60
„	Idem	2	80-70
BALNER	Afsterving Miltvuur-sporen door verwarming	14.73	95.2-90.4
„	Idem	10.39	105.3-95.2
BLAU	Afsterving Bac. subtilis door verwarming	5.—	100-80
„	Idem	4.97	120-110
„	Idem	4.91	140-130
MAYER	Afsterving Bac. robur door verwarming	6.72	100-80
„	Idem	9.18	120-110
„	Idem	3.78	130-120
CHICK	Afsterving B. coli commune door verwarming	12.—	52.7-48.9
„	Afsterving B. typhosus door verwarming	136.—	59 49
„	Afsterving Staphylococcus pyogenes aureus door verwarming	29	52.9-48.9
HARTRIDGE ..	Coagulatie van haemoglobine door verwarming (O ₂ Hb)	18841.—	63-62
„ ..	Idem	8.—	67.5-63
„ ..	Coagulatie van haemoglobine door verwarming (CO ₂ Hb)	5.27	74-70
„ ..	Idem	4.66	77.5-74
CHICK-MARTIN	Coagulatie van haemoglobine door verwarming	39.39	75.5-70.4
„	Idem	14.77	65.6-60
„	Idem	12.87	70.4-65.6
„	Coagulatie van ei-albumine door verwarming	18.94	76.3-69.0
FAMULENER-			
MADSEN	Ontleding van vibriolysine door hitte	714.5	47-45.1
„	Idem	351.3	50-47

Waarnemer	Object	Q ₁₀	Onderzocht temp. - gebied
FAMULENER-			
MADSEN	Ontleding van tetanolysine door hitte		
"	Idem	417.9	52.5-49.8
"	Ontleding van geiten-coliagglutinine door hitte	8214.—	53.5-51.5
"	Idem	19962	52-51
"	Idem	11235	53-52
MIQUEL.....	Inactivering der urease	3.94	51.5-46.5
"	Idem	9.05	66-64
HERZOG	Ontleding van het emulsine-ferment door hitte	4.50	50-40
"	Idem	3.57	65-60
"	Idem	6.21	75-70
SETER	Inactivering der katalase uit bloed door hitte	7-3.6	55-45
ZILVA ¹⁾ -VAN ECK ²⁾	Inactivering der peroxydase uit melk door hitte	3000	70-80
COLLANDER ³⁾ .	Afsterving van plantencellen door hitte	26-118	40-60
LEPESCHKIN ..	Idem	6.2-201	50-85

getroffen bij de afsterving van bacteriën (bijvoorbeeld *Bac. typhosus*), als bij die van plantencellen (Collander), terwijl bij de inactivering van enzymen zowel hoge als lage waarden voor Q₁₀ worden aangetroffen.

Een abnormale vertraging van de reactie-snelheid, gerekend naar de formule der monomoleculaire reactie, tijdens het afstervingsproces werd door Miss CHICK ⁴⁾ gevonden bij het dooden van *Bac. paratyphosus* met HgCl₂, door SETER ⁵⁾ bij de katalase en door EULER en LAURIN ⁶⁾ bij de saccharase.

¹⁾ Bioch. Journ., 8, (1914).

²⁾ Ztschr. f. Untersuch. der Nahr und Genussmittel, 22, 393, (1911).

³⁾ Comment. Biol. Fennicae, 1, 7-9, 1.

⁴⁾ Commun. 8e Internat. Congress. Appl. Chem., 26, 180.

⁵⁾ Ztschr. Physik. Chemie, 44, 257.

⁶⁾ Hoppe-Seyler, 108, 64.

De vorm van de afstervingskromme van dezen bacteriophage geeft verder aanleiding tot de volgende opmerking.

D'HÉRELLE vermeldt in één van zijn publicaties ¹⁾ het onderstaande: „Wanneer men op den bacteriophage een zwakke concentratie van een of ander antisepticum laat inwerken en dan de bacteriophagen telt, neemt men waar, dat een zeker aantal — circa 15 à 20 % — vernietigd zijn, terwijl de andere 85 à 80 % weerstand geboden hebben. Zoo is het ook bij de inwerking van warmte. Bij 50° C. worden ongeveer 15 à 20 % der bacteriophagen gedood, de anderen bieden weerstand tot aan 65°. Uit deze proeven blijkt, dat de bacteriophagen, die zich in een zekere cultuur bevinden niet alle gelijk zijn; er zijn twee soorten: een soort, die zeer gevoelig is voor warmte en antiseptica en een andere, die zeer resistent is. Dit feit kan men slechts op één wijze verklaren: de bacteriophage heeft twee vormen, een vegetatieven en een resistenten vorm. Steun aan deze opvatting wordt verleend door het feit, dat ik erin geslaagd ben bacteriophagen te kweken ten koste van door hitte gedode staphylococcen; deze bacteriophagen bestonden echter uitsluitend uit den zeer gevoeligen vorm; zij werden allen gedood door een temperatuur van 54° en eveneens door een verblijf gedurende 12 uur in 20 % alcohol.”

Naar mijn meening toonen de resultaten van de boven beschreven afstervingsproeven onomstootelijk aan, dat er, althans wat den bacteriophage van *Bac. danicus* betreft geen scheiding bestaat in een zeer gevoelige groep en een zeer resistente noch met het oog op de inwerking van warmte noch op die van ultraviolette stralen of een te hooge zuurgraad van het milieu. Ware dat wel het geval geweest, dan had de afstervingskromme stellig geen vloeiend verloop getoond; bij de langzame afsterving, die bij 50° plaats had, moest dat zeker heel duidelijk

¹⁾ 3 Voordrachten, vertaling STORM VAN LEEUWEN, pag. 33, 1924.

aan het licht gekomen zijn, en niet minder bij de bestraling en in de zure vloeistof.

Waarschijnlijk baseerde D'HÉRELLE zijn opvatting aanvankelijk slechts op de proeven van APPELMANS ¹⁾, terwijl het experiment met de gedoode staphylococcen hem later niet deugdelijk is gebleken, — niet alle staphylococcen waren dood — zoodat deze bacteriophage wel degelijk van het normale type was en toch bij 54° reeds geheel afstierf, hetgeen dus ook met mijn waarnemingen in overeenstemming is.

Ten onrechte zocht dus ook SCHUURMAN ²⁾ in de afsterving in twee groepen van verschillende resistentie steun voor zijn hypothese, dat een deel der bacteriophagen voorzien is van een omhullend ionenlaagje en daardoor minder snel te gronde gaat.

D'HÉRELLE ³⁾ geeft een methode aan om niet door filtratie maar door verwarming de bacteriophagen van de bacteriën te scheiden; „on peut donc remplacer la filtration par un chauffage d'une demi-heure à 58—60°, qui tue les bactéries et respecte le bactériophage. Je préfère la filtration, qui m'a toujours paru donner de meilleurs résultats.” Het is mij gebleken, dat een temperatuur van 58—60° gedurende een half uur lang niet elken bacteriophage onaangetast laat, waaraan de betere resultaten van het filtreren wel toe te schrijven zullen zijn. Ook de NECKER ⁴⁾ vermeldt reeds, dat de bacteriophage, welke hij onderzocht, bij 48° de eerste afstervingsverschijnselen vertoonde.

Tenslotte moge gewezen worden op het eigenaardige feit, dat bij de afsterving van den bacteriophage van *Bac. danicus* de snelheid van het proces zelfs door een honderd maal hogere

¹⁾ C. R. de la Soc. de Biol., 85, 1098.

²⁾ Diss. Leiden, 1925, 29.

³⁾ Le Bactériophage, etc., 1921, pag. 17.

⁴⁾ C. R. de la Soc. de Biol., 86, 736.

beginconcentratie niet merkbaar wordt beïnvloed. Bij de afsterving van bacteriën is dat geheel anders.

Zoo vond EIJKMAN ¹⁾, dat bij 47° met dezelfde *B. coli* onder volkomen gelijke omstandigheden bij aanvangconcentraties van 7, 30 en 370 bacteriën per mM³ respectievelijk na 4, 13 en 26 minuten nog 10 % in leven was.

EIJKMAN en andere onderzoekers schrijven dit verschijnsel toe aan de beschuttende werking op de nog levende bacteriën van stoffen, die uit de reeds gedoode cellen in de vloeistof overgaan. Deze meening wordt bevestigd door de vertraagde afsterving na toevoeging aan het milieu van een groote hoeveelheid reeds gedoode bacteriën. Zoo was bij voorbeeld bij een proef na 19 minuten verwarmen op 47° in het normale geval nog slechts 3 % in leven, doch in het doode cellen-milieu 50 %. Verder heeft ook de toevoeging van bouillon een sterke vertraging van het afstervingsproces tengevolge.

Beschouwt men nu hiernaast de gegevens van den bacteriophag, dan blijkt de afstervingssnelheid niet door de beginconcentratie of door toevoeging van reeds gedoode bacteriophagen, wel echter door de aanwezigheid van bouillon in 't milieu te worden vertraagd. Het blijft mogelijk, dat zeer hoge beginconcentraties de snelheid vertragen, — 't geen zeer onwaarschijnlijk is — maar de uitkomst zal dan twijfelachtig zijn, omdat de remming evengoed aan het eiwit kan zijn toe te schrijven, dat den bacteriophag vergezelt.

Wat de inactivering van enzymen betreft, EULER en LAURIN²⁾ vonden, dat bij de saccharase een hogere enzymconcentratie ook een snellere inactivering tengevolge had; de gevoeligheid voor verwarming neemt dus toe met de concentratie.

EFFRONT³⁾ stelde dat reeds eerder vast, terwijl CHICK

¹⁾ Biochem. Ztschr., 11, 16.

²⁾ Hoppe-Seyler, 108, 64.

³⁾ Die Diastasen, Deutsche Uebers., 1900, 62.

en MARTIN ¹⁾ een dergelijk verband tusschen snelheid en concentratie vonden bij coagulatie van proteïnen uit ei-albumine-oplossingen.

In tegenstelling hiermede constateerden MADSEN en WALBUM bij het lebferment een toenemende gevoeligheid voor verwarmen bij grootere verdunning.

Deze gegevens brengen echter geen nieuwe gezichtspunten met het oog op de resultaten der hier beschreven afstervingsproeven.

¹⁾ Journ. of Physiol., 40, 404.

TWEEDE DEEL

EENIGE WAARNEMINGEN OMTRENT LYSIS IN DICHTE BACTERIE-SUSPENSIES

Daar bij de beschreven proefnemingen gebleken was, dat de bacteriophag van *Bac. danicus* tot de sterk virulente bacteriophagen gerekend moest worden, deed zich de vraag gelden of het mogelijk zou zijn iets nader te weten te komen van de stofwisseling van den bacteriophag door grootere hoeveelheden bacteriën tot oplossing te brengen, dan men gewoonlijk doet, en de vloeistof te analyseeren.

In het algemeen heeft een te dichte bacterie-suspensie een ongunstigen invloed op het resultaat van de lysis. D'HÉRELLE ¹⁾ geeft als de beste concentratie ongeveer 250 miljoen bacteriën per cc. aan. Een suspensie van 500 miljoen bacteriën per cc. wordt nog slechts door een bacteriophag „au maximum d'activité” opgelost. Boven deze concentratie wordt de vloeistof niet geheel helder meer; zij blijft des te troebeler naarmate de bacterie-concentratie hooger is, onafhankelijk van de hoeveelheid bacteriophagen, waarmede men ent. Bij een concentratie van 1 milliard per cc. wordt slechts een deel der bacteriën opgelost; de rest wordt alléén gedood, wat daaruit blijkt, dat na uitzaaiing op agar-platen geen koloniën meer te voorschijn komen.

¹⁾ Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité, pag. 34.

Dat de niet opgeloste bacteriën werkelijk dood zijn, lijkt mij hiermede niet bewezen, omdat een mengsel van *levende* bacteriën en bacteriophagen in voldoende concentratie na uitzaaiing eveneens sterielblijvende agarplaten oplevert. Bij een volgende proef, welke D'HÉRELLE uitvoerde om aan te toonen, dat het de in de vloeistof opgeloste producten der lysis zijn, die in een zeer dichte suspensie den verderen voortgang der oplossing stuiten, bleek bovendien, dat de bacteriophag-concentratie in een dergelijke gedeeltelijk opgeloste zeer dichte suspensie die der bacteriën aanmerkelijk overtrof. Daartoe entte hij in een bacterie-suspensie van 250 miljoen per cc. 0.001 cc. bacteriophag; na de lysis, welke een volkomen helder lysaat opleverde, werd de vloeistof opnieuw met bacteriën bedeed, zoodat weder 250 miljoen per cc. aanwezig waren. Dit werd nu tot drie maal toe herhaald, waardoor het totaal aantal toegevoegde bacteriën tot 1000 miljoen per cc. steeg. De lysis was de laatste maal onvolkomen en de vloeistof bleef gedeeltelijk troebel. Het aantal bacteriophagen bedroeg bij telling 2600 miljoen per cc. zoodat deze de niet-opgeloste bacteriën minstens tien maal in aantal te boven gingen. Ook al waren dus alle niet-opgeloste bacteriën nog in levenden toestand aanwezig, dan zou een agarplaat na uitzaaiing stellig steriel blijven. Dit wordt nog aannemelijker, wanneer men bedenkt, dat de bacteriophagen zich in de vloeistof vrijwel oogenblikkelijk aan de bacteriën vasthechten, zooals VON ANGERER ¹⁾ heeft bewezen. D'HÉRELLE heeft dus niet het recht op grond hiervan aan te nemen, dat de bacteriën niet opgelost maar wel gedood zijn.

Het resultaat, dat D'HÉRELLE met zeer dichte bacterie-suspensies bereikte, gaf in ieder geval weinig hoop om langs dezen weg verder te komen. Een tweede mogelijkheid is deze, dat men

¹⁾ Archiv. f. Hygiene, 92, 312.

de oplossing op de normale wijze laat verlopen, d.w.z. de bacteriën suspendeert in bouillon en met bacteriophag ent, en vervolgens een groote hoeveelheid lysaat in vacuo indampt om zodoende de producten der lysis te concentreeren. Hieraan is echter het bezwaar verbonden, dat men naast deze stoffen een niet gering quantum aan eiwitachtige verbindingen ophoopt, welke afkomstig zijn van de resterende bouillon en van de stofwisseling der bacteriën, waardoor de analyse, die zich toch in hoofdzaak naar de eiwitontleding moet richten, zeer wordt verzwaard.

Nu zou het mogelijk zijn deze moeilijkheid te ontgaan door de bacteriën in zuiver mineraal milieu te kweken, wat met *Bac. danicus* ook wel gelukt, en ze daarna door den bacteriophag te doen oplossen, doch de opbrengst aan bacterie-materiaal is dan zoo gering, dat men geen behoorlijke hoeveelheid bijeen verzamelen kan. Bovendien liet in dat geval de werking van den bacteriophag te wenschen over. Hiervan moest dus dadelijk worden afgezien.

Op grond van het voorafgaande bleef er geen andere keus dan te trachten de lysis tot stand te brengen in een dichte bacterie-suspensie en tevens in een milieu, dat behalve de bacteriën zoo weinig mogelijk organische stof bevat.

Er stonden nu weder twee wegen open ter verkrijging van een groote hoeveelheid bacteriën, welke voor het bereiden der suspensie noodig was, namelijk het kweken in een voedingsvloeistof of op een vasten voedingsbodem.

Een poging om van den eersten gebruik te maken strandde op de onmogelijkheid om de in een voedingsvloeistof gegroeide bacteriën zonder infectie met andere bacteriën of schimmels van deze vloeistof te scheiden. Steriel filtreren kan men natuurlijk wel, maar een bacterie-dicht filter is zoo spoedig verstopt, dat er geen groot volume door te zuigen is; terwijl steriel centrifugeeren niet voor verwezenlijking vatbaar bleek.

Zodoende bleef er niets anders over dan de bacteriën op platen te kweken en met dit materiaal een suspensie te bereiden. Voor dit doel werden gebruikt groote glasdozen met 22 cM diameter en als voedingsbodem vleeschagar met 1 % glucose. Na bekoeling van de agar werden de dozen op de gebruikelijke wijze gedroogd, daarna geënt met *Bac. danicus* en bij 26° gedurende 18 uur in de broedstoof geplaatst. Vervolgens werd de oogst van 10 dergelijke platen afgespateld en gesuspenseerd in een erlenmeyer van 1 Liter inhoud, bevattende de volgende gesteriliseerde oplossing:

600 cc. leidingwater
0.3 gr. K_2HPO_4
0.3 gr. $MgSO_4$

Wanneer door langdurig schudden een homogene suspensie was verkregen, werd met een steriele pipet van 100 cc. in elk van twee erlenmeyers van 1 Liter, welke reeds een steriel mengsel van

0,5 gr. $CaCO_3$
5 cc. 2 % Na_2CO_3 -oplossing

bevatten, 300 cc. van de suspensie overgebracht, zoodat nu twee volkomen vergelijkbare, gelijkwaardige suspensies werden verkregen. Tenslotte werd één dezer beiden voorzien van één druppel lysaat van *Bac. danicus* en het tweetal flesschen bij kamertemperatuur op een schudapparaat gezet om de bacteriën te beletten zich op den bodem af te zetten.

Het is wel duidelijk, dat deze wijze van behandelen langzamerhand uit velerlei voorproeven is gegroeid tot een vaste methode van werken. Spoedig kwam echter het volgende aan het licht: de infectiekans bij het enten en afspatelen van een 10-tal groote glasdozen — wat toch zeker enkele minuten per doos duurt — is zoo groot, dat het slechts zelden gelukt om het

bacterie-materiaal volkomen rein te winnen. Teneinde deze infectie zooveel mogelijk te voorkomen werden de doozen gevuld met vleeschagar-glucose, waaraan 1 % Arabische gom was toegevoegd. Daar de gom het door de agar uitgeperste water opneemt, vervalt de noodzakelijkheid om het agaroppervlak vóór het gebruik op een stoof te drogen. Deze bron voor infectie is daarmee uitgeschakeld. Bovendien moest voorkomen worden, dat bij het enten en afspatelen bacteriën en bacteriesporen uit de lucht op de geopende doozen vielen; te dien einde werden de doozen vóór de bewerking geschoven in een op zijn kant liggende glazen bak van $70 \times 50 \times 30$ cM, welke te voren door spuiten met absolute alcohol inwendig was gesteriliseerd, wat vóór het inschuiven van elke doos werd herhaald. Ook handen en armen werden geregeld gedesinfecteerd. Langs dezen weg was het mogelijk rein materiaal in elke gewenschte hoeveelheid te verzamelen. Later bleek de oogst van gistagar-glucose-platen met wat krijt nog grooter te zijn dan van vleeschagar-glucose.

Het lysaat, waarvan aan de eene suspensie één druppel werd toegevoegd, was afkomstig van een gewone bouillon-cultuur van *Bac. danicus*, waarin een kleine hoeveelheid bacteriophage was overgeënt. De hoeveelheid eiwit uit bouillon etc., die men met dien druppel aan de suspensie toevoegt, is gevoeglijk te verwaarloozen.

De lysis in de op voorgaande wijze bereide en met bacteriophage bedeelde suspensie verliep tegen de verwachting in zeer voorspoedig, echter langzamer dan die in een suspensie van de gebruikelijke dichtheid. Na tweemaal 24 uur was er nog geen verschil tusschen de suspensies met en zonder bacteriophage te zien. Enkele uren later had in die met bacteriophage een lichte uitvloeking der bacteriën plaats; na 8 uur ongeveer waren alle bacteriën volkomen opgelost. Dit resultaat was verrassend, te meer daar de dichtheid van de suspensie met

ongeveer 1000 maal het door D'HÉRELLE aangegeven maximum overtrof.

Een vergelijking en nader onderzoek der beide suspensies verstrekke de volgende gegevens:

a. De suspensie zonder bacteriophag was niet noemenswaard in eigenschappen veranderd, noch macro-, noch microscopisch; bij uitzaaiing op vleeschagar-glucose-platen kwamen met normale snelheid een groot aantal welig groeiende koloniën van *Bac. danicus* te voorschijn, wat wel bewijst, dat de vitaliteit der bacteriën door het verblijf van $2\frac{1}{2}$ etmaal in de alcalische minerale oplossing niet had geleden.

b. De suspensie met bacteriophag was overgegaan in een doorzichtige doch vrij sterk opalesceerende, olieachtige vloeistof, waarin macroscopisch alléén het restant van het toegevoegde CaCO_3 in het oog viel. De geur en ook de reactie ten opzichte van lakmoes was duidelijk zuur. Een telling van het aantal bacteriophagen gaf een concentratie aan van 11.6×10^{10} per cc. vloeistof; dat is ongeveer 34 maal hoger dan ooit in het lysaat van *Bac. danicus* werd waargenomen. De vroeger geconstateerde waarden liepen van $1.3-34 \times 10^8$. Blijkbaar werd dus ook de bacteriophag door dit milieu niet geschaad; integendeel hij vermenigvuldigde zich in dit milieu buitengewoon goed.

Nu werden de beide vloeistoffen gecentrifugeerd onder toevoeging van 1 % NaCl om het centrifugeeren te vergemakkelijken. Photo F geeft een indruk van de radicale opruiming, welke de bacteriophag in de ééne suspensie had gehouden. De kleine hoeveelheid wit materiaal in de buis + ph. bestaat uit CaCO_3 en een menigte korreltjes ter grootte van 1 à 2 μ ongeveer. Onder het microscoop gezien komen deze laatste in grootte en gestalte overeen met de korreltjes, die in de cel van *Bac. danicus* aanwezig zijn; ze zijn niet in zuren oplosbaar. Hun identiteit kon niet nader worden vastgesteld.

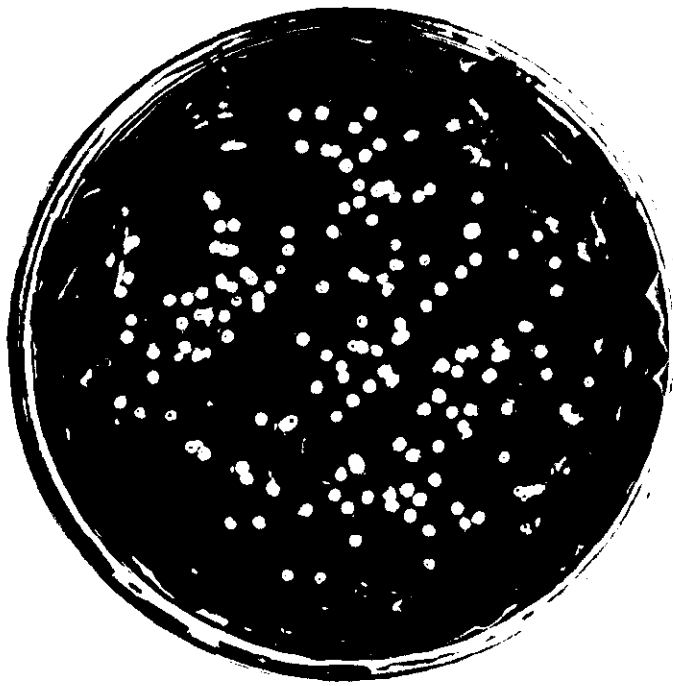


Photo E. (Vergrooting 0.5 X; doorvallend licht.)

Cultuurplaat, 18 uur oud, zooals bij dit onderzoek gebruikt is voor het tellen van het aantal bacteriophagen, waarop een laag bacteriemateriaal van *Bac. Danicus* met plages van diens bacteriophagaag. (Pag. 48.)



Photo F. (Vergrooting 0.5 X)

Centrifugaten van twee dichte bacterie suspensies, waarvan aan de rechtsche bacteriophagaag was toegevoegd.



Photo G. (Vergrooting 2.7 X)

Plages van den bacteriophagaag van *B. radicola*. (Pag. 94)

Het chemisch onderzoek beperkte zich tot de bepaling van :

1. de hoeveelheid totaal-stikstof in het centrifugaat;
2. „ „ totaal-stikstof in de vloeistof;
3. „ „ eiwit-stikstof in de vloeistof;
4. „ „ aminozuur-stikstof in de vloeistof;
5. „ „ ammoniak-stikstof in de vloeistof.

Voor de eerste twee bepalingen werd het centrifugaat of een bekend deel van de vloeistof volgens KJELDAHL behandeld (destrueeren, ammoniak overdestilleeren en titreeren). Ter bepaling van het gehalte aan eiwitstikstof werd gebruik gemaakt van de methode van BARNSTEIN ¹⁾).

Deze bestaat uit het volgende :

50 cc. der te onderzoeken vloeistof worden tot 100° verhit; vervolgens voegt men 25 c.c van een CuSO₄-oplossing toe, die per Liter 60 gram (gekristalliseerd) CuSO₄ bevat, en daarop onder voortdurend omroeren 25 cc. van een 1.25 %-ige NaOH-oplossing. Na het bezinken van het neerslag schenkt men de bovenstaande vloeistof door een filter af, decanteert het neerslag eenige malen met water en brengt dit vervolgens op het filter, waarna het zoolang met warm water wordt uitgewassen tot de doorlopende vloeistof geen reactie met K₄Fe(CN)₆ of BaCl₂ meer geeft. Tenslotte wordt het stikstofgehalte van het neerslag volgens KJELDAHL bepaald.

Het gehalte aan aminozuur-stikstof werd nagegaan volgens de door JESSEN-HANSEN ²⁾ gegeven voorschriften voor de formoltitratie van SÖRENSEN. Daar blijkens de destillatie in vacuo na toevoeging van MgO in geen der beide gecentrifugeerde vloeistoffen vrije ammoniak aanwezig was, bestond de voorbereiding van de te onderzoeken vloeistof uitsluitend uit het verwijderen van phosphor- en koolzuur.

¹⁾ KÖNIG Untersuchung landw. und gewerblich wichtiger Stoffe, 1911, pag. 250.

²⁾ ABERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 1, Teil 7, pag. 252.

Daartoe werden 50 cc. van de vloeistof gebracht in een maatkolf van 100 cc. en bedeed met 2 gr. Bariumchloride en 1 cc. van een phenolphtaleïn-oplossing, die bestond uit 0.5 gr. phenolphtaleïn opgelost in 50 cc. alcohol van 96 % en 50 cc. water. Na schudden tot het Bariumchloride is opgelost werd zooveel verzadigde Bariumhydroxyde-oplossing toegevoegd, dat de vloeistof rood kleurde en daarboven nog 5 cc., waarna de maatflesch tot de streep met water werd bijgevuld. Na flink omschudden en 15 minuten rust werd de vloeistof door een droog filter gefiltreerd. Vervolgens werden nu 80 cc. van het heldere filtraat in een maatkolf van 100 cc. gebracht, door toevoeging van $\frac{n}{5}$ zoutzuur ten opzichte van gevoelig lakmoespapier geneutraliseerd, en tenslotte op een volume gebracht van 100 cc. door toevoeging van uitgekookt gedestilleerd water.

De eigenlijke titreering verliep nu als volgt:

Naast de te onderzoeken vloeistof wordt om het eindpunt der titratie duidelijk te kunnen waarnemen en den invloed van de formoloplossing te corrigeren een contrôle-oplossing getitreerd, bestaande uit 20 cc. uitgekookt gedestilleerd water, 10 cc. formolmengsel en zooveel $\frac{n}{5}$ NaOH als het halve volume bedraagt, dat aan het te onderzoeken monster bij terugtitratie zal moeten worden toegevoegd. Het formolmengsel wordt bereid door 50 cc. 30 % handelsformol met 1 cc. phenolphtaleïne-oplossing te vermengen en daarna zooveel $\frac{n}{5}$ NaOH toe te voegen tot een rose-kleur optreedt. De contrôle-oplossing werd nu met $\frac{n}{5}$ HCl teruggetitreerd tot nog slechts een zwakke rose-kleur zichtbaar was (PH = 8.3: 1e stadium) en vervolgens weer met één druppel $\frac{n}{5}$ NaOH gebracht tot een duidelijk roode kleur (PH = 8.8; 2e stadium).

20 cc. van de te analyseren vloeistof, overeenkomende met 8 cc. van de oorspronkelijke gecentrifugeerde vloeistof, werden nu gemengd met 10 cc. formolmengsel en met zooveel $\frac{n}{5}$ NaOH, dat de kleur sterker is dan die der contrôle-oplossing in het 2e stadium. De kleur werd nu met $\frac{n}{5}$ HCl weer beneden die der contrôle-oplossing gebracht en vervolgens met loog nauwkeurig daaraan gelijk gemaakt. Tenslotte werden zoowel de contrôle- als de analyse-vloeistof met enkele druppels loog tot dezelfde kleurschakeering in het 3e stadium (PH = 9.1) gebracht.

Ter contrôle op de nauwkeurigheid van werken werd een voorproef gedaan met glyocol. Daartoe werden 375 mgr.

glycocol opgelost in 50 cc. uitgekookt gedestilleerd water en in 10 cc. van deze oplossing het gehalte aan aminozuur-stikstof bepaald. Daarbij werden de volgende cijfers gevonden:

Contrôle: 2.535 cc. $\frac{n}{5}$ NaOH 2.490 „ „ HCl <hr style="width: 80%; margin-left: 0;"/> 0.045 „ „ NaOH	Analyse: 5.015 cc. $\frac{n}{5}$ NaOH 0.090 „ „ HCl <hr style="width: 80%; margin-left: 0;"/> 4.925 „ „ NaOH ÷ Contrôle: 0.045 „ „ NaOH <hr style="width: 80%; margin-left: 0;"/> 4.88 „ „ NaOH
---	---

In 10 cc. glycocol was dus aanwezig $4.88 \times 2.8 = 13.6$ mgr. aminozuurstikstof en in de opgeloste hoeveelheid glycocol $5 \times 13.6 = 68$ mgr. Berekent men hieruit de gebruikte hoeveelheid glycocol dan bedraagt deze $\frac{75}{14} \times 68 = 364.3$ mgr. Twee hiernaast uitgevoerde duplo-proeven gaven als uitkomst 369 en 366.5 mgr. met een gemiddelde van 366.6 mgr. zijnde 97.76 % van de werkelijke hoeveelheid ad 375 mgr. glycocol. Daar SÖRENSEN als nauwkeurigheid van de formoltitratie 95—100 % opgeeft, is deze uitkomst bevredigend.

In de eerste plaats werd nu nagegaan of de gebruikte hoeveelheid bacterie-materiaal voldoende was om goed aantoonbare verschillen in stikstof-cijfers te geven. Het gewicht van de bacteriën, afkomstig van 5 dozen vleeschagar-glucose bleek in natten toestand te bedragen 13.639 gr.; na droging in de stoof bij 100° bedroeg de hoeveelheid water, die ontweken was, 12.240 gr., zoodat het gehalte aan droge stof 1.399 gram was, waarin 140 mgr. stikstof of rond 10 %. Dit laatste klopt volkomen met de opgave van NICOLLE en ALILAIRE, die als gemiddelde van 15 bacteriënsoorten in de droge stof 10 % stikstof vonden ¹⁾.

Stikstofbepalingen in de centrifugaten, die op photo F

¹⁾ KRUSE, Allgemeine Mikrobiologie, pag. 55.

werden afgebeeld, en in de afgecentrifugeerde vloeistoffen gaven het volgende resultaat in mgr. N₂:

	+ bacteriophaag	— bacteriophaag
centrifugaat	4.4	95.1
vloeistof	136.8	46.6
totaal	141.2	141.7

Onder invloed van den bacteriophaag was dus blijkbaar 90.7 mgr. van de in de bacteriën aanwezige stikstof in de vloeistof overgegaan. Herhaling van deze proef gaf overeenkomstige resultaten.

Teneinde de hoeveelheid stof nog wat te vergrooten werd voor de verdere proeven gebruik gemaakt van gistagar-krijt-glucose-platen, waarop de groei der bacteriën nog weliger was. Bovendien werden in de vloeistof eiwit- en aminozuurstikstofbepalingen uitgevoerd. Het totaal-stikstofcijfer steeg nu tot ongeveer 200 mgr. per 5 dozen. De gevonden cijfers waren:

	+ bacteriophaag	— bacteriophaag
mgr. N ₂ in het centrifugaat	23.1	167.4
„ „ als eiwit in de vloeistof	52.5	18.6
„ „ als aminozuren in de vloeistof	74.1	10.4
„ „ totaal in de vloeistof	181.6	32.4
„ „ in de vloeistof + centrifugaat	204.7	199.8
„ „ in de vloeistof als ammoniak	—	—

Deze uitkomst toont aan, dat bij de lysis een sterke vermeerdering van het stikstofgehalte der vloeistof plaats heeft, terwijl de verhouding tusschen aminozuur-stikstof en eiwit-stikstof van 74 : 52 aannemelijk maakt, dat de oplossing der bacteriën gepaard gaat met een ontleding van het protoplasma. Om dit laatste met zekerheid te kunnen zeggen, zou men de samenstelling van het protoplasma in de levende bacterie moeten kennen. Nu is dat veel moeilijker te bepalen dan het oppervlakkig bekeken lijkt; immers, daartoe moeten de bacteriën

worden vernietigd en de inhoud in vrijheid gesteld, hetzij door chemische extractie-middelen, hetzij langs mechanischen weg. De chemische middelen hebben allen min of meer het bezwaar, dat ze tevens ontledend werken. Slechts de mechanische behandeling blijft dus over. Technische moeilijkheden maakten het onmogelijk van *Bac. danicus* de verhouding tusschen eiwit en aminozuur-stikstof in het levende protoplasma te weten te komen. In de litteratuur is daarover ook bij andere micro-organismen zeer weinig vermeld. KRUSE ¹⁾ zegt over het voorkomen van albumosen, peptonen en aminozuren in de cellen van micro-organismen, dat dit stellig het geval is; „Man hat ihnen bisher nur zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt, und sie sind auch wohl in kleinsten Mengen als solche in den Zellen vorgebildet.”

STUTZER ²⁾ onderzocht de stikstofhoudende verbindingen in schimmels en gisten; hij vond deze waarden:

	Schimmels	Gisten
totaal stikstof	3.78 %	8.65 %
verteerbaar eiwit	1.49	5.51
onverteerbaar „nuklein”	1.54	2.26
amiden en peptonen	0.75	0.88

Waarschijnlijk zal ook in *Bac. danicus* de hoeveelheid aan aminozuren gebonden stikstof gering zijn ten opzichte van de eiwitstikstof.

Nu doet zich echter bij de beoordeeling van de bij de lysis gevonden stikstof-cijfers behalve de onbekendheid met de samenstelling van het protoplasma nog een tweede complicatie voor. *Bac. danicus* heeft het vermogen gelatine te vervloeien en bezit dus proteolytische enzymen. Daarom zal men de vermeerdering van het aminozuur-gehalte der vloeistof niet zonder

¹⁾ Allgemeine Mikrobiologie, pag. 71.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 6.

meer aan de inwerking van den bacteriophag mogen toeschrijven. Het is zelfs zeer goed mogelijk, dat de bacteriophag niets anders doet dan de bacteriën oplossen, terwijl de verdere ontleding geheel op rekening van de eiwitsplitsende enzymen komt. Het lag voor de hand te trachten omtrent deze autolyse eenige waarnemingen te doen. Men zou een ideale vergelijking tusschen de bacterio- en autolyse kunnen maken, wanneer het gelukte binnen denzelfden tijd een even groot quantum bacteriën langs deze twee wegen te laten oplossen. Helaas bleek het niet mogelijk door toevoeging van toluol of chloroform een bacterie-suspensie binnen 3 dagen in autolyse te brengen. Vervolgens werd nu een uitweg gezocht voor deze moeilijkheid door de autolyse met een mechanische celvernietiging te combineeren.

Daartoe werd een zelfde hoeveelheid bacteriën als bij de voorgaande proef gebracht in een cilindrische glazen flesch met groote en kleine glazen knikkers en zooveel CaCO_3 en Na_2CO_3 als ook bij de lysis gebruikt werd. De flesch met inhoud was vóór de toevoeging der bacteriën gesteriliseerd. Zij werd nu op een horizontale rolmachine gelegd, die haar gedurende 3 dagen in matigen gang ronddraaide. Daarna werd de inhoud met water verdund, gecentrifugeerd en geanalyseerd. Het resultaat ziet men met de cijfers der oplossingsproef in de volgende tabel:

	met bacteriophag	gerold	zonder bacteriophag
mgr. N_2 in het centrifugaat	23.1	97.7	167.4
„ „ als eiwit in de vloeistof . . .	52.5	46.7	18.6
„ „ als aminozuren in de vloeistof	74.1	39.7	10.4
„ „ totaal in de vloeistof	181.6	98.3	32.4
„ „ vloeistof + centrifugaat ..	204.7	196.0	199.8
„ „ als ammoniak in de vloeistof	—	—	—

Hieruit blijkt, dat de waarden voor de gerolde bacteriën

tusschen die der andere behandelingswijzen instaan. De bacteriën worden door het wrijven der glazen kniekers minder vernietigd dan door den bacteriophag. Ook hier heeft een aanwinst aan eiwit- en aminozuurstikstof in de vloeistof plaats, echter met dit verschil, dat de verhouding nagenoeg 1 : 1 is n.l. aan eiwitstikstof $46.7 - 18.6 = 28.1$ en aan aminozuurstikstof $39.7 - 10.4 = 29.3$ mgr. tegen bijna 1 : 2 in het lysaat n.l. aan eiwitstikstof $52.5 - 18.6 = 33.9$ en aan aminozuurstikstof $74.1 - 10.4 = 63.7$ Men zou geneigd zijn daaruit op te maken, dat zich hier iets anders afspeelt dan bij de lysis.

Intusschen is mijns inziens het fijnwrijven der bacteriën te onvolledig om alleen daaruit te concludeeren, dat na de lysis dezelfde of andere processen zich afspelen dan bij de autolyse. Bovendien zou men ook niet tevreden mogen zijn met een overeenkomst in aminozuur- en eiwitstikstofcijfers, doch deze stikstofverbindingen ook nader moeten specificceeren. Een poging hiertoe leed schipbreuk op de kleine hoeveelheid stof, die men ter beschikking heeft; wel kan gemakkelijk de hoeveelheid coaguleerbaar eiwit, albumosen, peptonen, e.d. bepaald worden, doch een nadere analyse van de vloeistof na de verwijdering van het eiwit bracht onoverkomelijke moeilijkheden mee. Zoo lukte het bijvoorbeeld niet om nucleïnezuren of hun splitsingsproducten aan te toonen, die vaak in groote hoeveelheden in bacteriën en gisten voorkomen.

Het was dus nu, gezien de resultaten met *Bac. danicus*, de aangewezen weg te trachten een lysis-in-massa te verkrijgen met een bacterie, die niet in staat was gelatine te vervloeiën. Voor dit doel was een uitstekende *Coli*-bacteriophag ter beschikking. De verrassende uitkomst van deze proefnemingen was, dat het niet mogelijk bleek een eenigszins zwaargeladen suspensie van *Coli*-bacillen tot oplossing te brengen. Hier werd dus werkelijk de uitspraak van D'HÉRELLE bevestigd, dat boven een concentratie van 250 millioen cellen per cc.

de lysis steeds minder goed verloopt, naarmate er meer bacteriën aanwezig zijn.

Stellig zou het de moeite waard zijn, wanneer er over dit punt een nader onderzoek werd gedaan, of er dus werkelijk een vaste regel bestaat, dat alléén die bacteriën voor een lysis-in-massa in aanmerking komen, die met sterke proteolytische enzymen zijn toegerust. Mij ontbreekt, helaas, hiertoe tijd en materiaal; de eischen aan dit laatste te stellen zijn waarlijk niet gering en het zal veel tijd kosten, eer men over een collectie bacteriophagen beschikt, van wel en geen gelatine-vervloeiende bacteriën, die geen secundaire cultuur geven.

Gaat deze regel op, dan zou wellicht de verklaring van het verschijnsel daarin gezocht kunnen worden, dat bij de proteolytische ontleding ook die lysis-producten worden aangetast, waarvan D'HÉRELLE heeft aan getoond, dat ze den voortgang der lysis remmen.

Tenslotte moge hier vermeld en besproken worden, wat in de litteratuur met betrekking tot de producten der lysis is verschenen en door het voorafgaande onderzoek wordt bevestigd, aangevuld of tegengesproken.

D'HÉRELLE ¹⁾ heft in zijn boek het hoofdstuk over de opgeloste bacteriebestanddeelen aldus aan: „Les bactéries sont lysées en totalité par le Bactériophage, sans résidus,” en ook SCHUURMAN ²⁾ geeft op, dat men in een opgeloste bacterie-cultuur noch macro- noch microscopisch iets meer vindt. Bij de oplossing van *Bac. danicus* kwam na het centrifugeeren aan het licht, dat er toch in dit geval wel eenig restant is, bestaande uit de besproken korreltjes, die als een fijn, licht geel slijmerig laagje op het CaCO_3 liggen, niet in zuren oplossen en waarschijnlijk van organischen oorsprong zijn.

¹⁾ D'HÉRELLE, *Le Bactériophage, etc.*, pag. 41.

²⁾ SCHUURMAN, *De bacteriophag, enz.*, Diss. Leiden, pag. 55.

IONESCO-MIHAIESTI ¹⁾ deed proeven met een uit konijnen-faeces geïsoleerden bacteriophage voor „Shiga 73” en een „Rawling-typhoid” stam. De formoltitratie uitgevoerd volgens de methode van BROWN ²⁾ in een cultuur, die 8, 24 en 48 uur aan den bacteriophage was blootgesteld gaf geen verschillen in vergelijking met de contrôle-culturen. Hun conclusie is: „it is concluded from these titrations that the bacteriolysis caused by the bacteriophage is not a true proteolysis, but rather a simple plasmolysis of the bacterial cell without splitting of the protein-molecule. This conclusion is supported by experiments showing the persistence of antigenic properties in the filtrates of lysed cultures.” Hierbij dient te worden opgemerkt, dat de beide gebruikte bacteriën geen gelatine-vervloeiende enzymen hebben en dat de onderzoeker verzuimd heeft na te gaan of de hoeveelheid aanwezige stikstof groot genoeg is om eventuele verschillen in aminozuur-stikstof naar behooren aan te kunnen toonen.

DÖRR ³⁾ heeft een Shiga-suspensie in twee gelijke delen verdeeld, de ééne helft met bacteriophage tot oplossing gebracht en vervolgens in beide suspensies de hoeveelheid dysenterietoxine en agglutinogeen bepaald. Deze waarden waren in beide gevallen even groot, waaruit hij opmaakt, dat er geen ontleding van eiwit bij de bacteriolyse plaats heeft.

Ook WEISS en ARNOLD ⁴⁾ kwamen door middel van serologische reacties en formoltitraties tot de conclusie, dat de bacteriolyse meer op een plasmolyse dan op een proteolyse lijkt en dat een toename van niet-proteïne-stikstof niet plaats heeft. Zij gebruikten een typhoid- en een staphylococcen-bacteriophage

¹⁾ Journ. of Exp. Medicine, 40, 317.

²⁾ Journ. of Bact., 8, 245.

³⁾ Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 53, 1009.

⁴⁾ Journ. of Infectious diseases, 34, 317.

bij hun onderzoek. Alleen staphylococcen doen gelatine vervloeien. Zij suspendeerden de bacteriën in bouillon.

IKOMA ¹⁾ heeft aangetoond, dat het lysaat van *B. dysenteriae* Shiga geen agglutinine-bindend vermogen meer heeft, wat naar zijn meening wijst op een sterke eiwit-ontleding, daar deze eigenschap uitsluitend aan het eiwit gebonden is. Dit laatste is niet het geval met de complement-binding; deze blijft dan ook bestaan.

Volgens DE NECKER ²⁾ geven opgeloste bacterie-culturen nog dezelfde praecipitatie- en complementbindingsreacties en overeenkomstige locale en algemeene reacties na subcutane injectie als de contrôle-cultuur. Deze worden echter geringer naarmate de filtraten ouder zijn. Dit laatste verschijnsel heeft D'HÉRELLE ook in Shiga-lysaten waargenomen, waaruit op den duur het stabiele dysenterie-toxine verdwijnt, hetgeen hem er toe doet besluiten, dat de lysis nog langzaam als een proteolyse voortgaat.

Het is niet onmogelijk, dat deze langzaam voortschrijdende proteolyse toe te schrijven is aan de proteolytische endoenzymen der bacteriën; tevens maakt zij aannemelijk, dat bij bacteriën, die gelatine vervloeien, deze proteolyse veel sneller verloopt.

Blijkens de litteratuur is het bij *Bac. danicus* dus de eerste maal, dat er in het lysaat van een bacterie een belangrijke vermeerdering van aminozuur-stikstof is waargenomen. Overigens is er in de litteratuur nog veel tegenstrijdigheid over de vraag of de lysis werkelijk met een proteolyse gepaard gaat.

De resultaten van dit deel van het onderzoek samenvattend, acht ik de volgende conclusies te mogen trekken:

a. bij de lysis van *Bac. danicus* heeft een sterke vermeerdering

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. (Originale), 91, 554.

²⁾ C. R. de la Soc. de Biologie, 85, 742.

- plaats van de hoeveelheid aminozuur-stikstof en eiwit-stikstof in het lysaat;
- b.* het is waarschijnlijk, dat de proteolytische enzymen der cel daarbij een rol spelen;
 - c.* de hoeveelheid bacteriën per cc., die bij *Bac. danicus* nog tot oplossing kwamen, overtroffen het door D'HÉRELLE aangegeven maximum met ongeveer duizend maal;
 - d.* het is gewenscht, dat er een onderzoek worde ingesteld naar het samengaan van het onder *c* vermelde en de aanwezigheid van uit de cel diffundeerende proteolytische enzymen.

DERDE DEEL

STERIEL GEKWEKTE KLAVERPLANTEN PRODUCEEREN GEEN BACTERIOPHAAG

In 1923 werd onafhankelijk van elkander door GERRETSEN en SACK en door SÖHNGEN en GRIJNS geconstateerd en gezamenlijk gepubliceerd ¹⁾, dat in de wortelknolletjes der leguminosen bacteriophagen voorkomen, die een lytische werking op *B. radicola* uitoefenen. Bij klaver, lupine en serradella bleek dat het geval te zijn. Vóór het onderzoek werden de knolletjes in sublimaat (1 : 1000) gedurende 15 minuten gesteriliseerd, vervolgens in absolute alcohol en tenslotte in steriel water gespoeld. De fijn gedrukte knolletjes dienden tot het aantonen van den bacteriophagaag; zij werden namelijk overgebracht in een jonge cultuur van *B. radicola*, daarin eenige dagen gelaten en tenslotte werd de vloeistof door een gesteriliseerde filterkaars afgefiltreerd en voor een gering deel bij een nieuwe jonge cultuur gebracht. Langs dezen weg gelukte het een goeden bacteriophagaag af te zonderen.

Deze had het vermogen een reeds troebele bacterie-cultuur weder tot oplossing te brengen en gedurende langen tijd in dien toestand te houden; ook bij tamelijk oude culturen was zulks mogelijk. Bovendien kon de werking van den bacteriophagaag ook gedemonstreerd worden door cultuur-platen gedeel-

¹⁾ Centralbl. f. Bakt., 2, 60, 311.

telijk met bacteriophag te bestrijken, op welke plaatsen *Bact. radicicola* niet meer groeien kan.

Verder bleek de Serradella-bacteriophag bijzonder specifiek te zijn, zoodat hij de bacteriën van de lupine, wikke, erwt, boon, klaver en esparsette niet aantaste. *B. coli*, *Azotobacter chroococcum*, *Radiobacter*, *Bac. fluorescens liquef.* en *Bac. violaceus* werden door de lupine- en klaverbacteriophagen niet opgelost. Zelfs werd niet elke uit klaver geïsoleerde *Bact. radicicola* door een klaver-bacteriophag tot lysis gebracht.

Daar deze bacteriophagen, volgens onderzoek, door dunne collodiummembranen heen diffundeeren, was het niet uitgesloten, dat de bacteriophagen op plaatsen in de klaverplant konden voorkomen, waar de bacteriën niet doordrongen. Inderdaad bleken ze niet alleen in de knolletjes maar ook in de wortels en stengels aanwezig te zijn, echter niet in de bladeren.

Daaruit zou mogelijkerwijs verklaard kunnen worden, dat de bacteriën niet verder in de plantenwortels doordringen, maar zich slechts lokaal ontwikkelen kunnen in de knolletjes. De bacteriophag kon aangetoond worden in tuin- en akkergrond, echter niet in heide- en boschgrond. Aan strooken filtreerpapier gedroogd behield de bacteriophag gedurende twee maanden zijn werkzaamheid. Wat de weerstand tegen verwarming betreft, een serradella-bacteriophag bleek slechts een $\frac{1}{2}$ uur verwarmen tot 60° te verdragen en klaver- en lupine-bacteriophagen 15 minuten op 65° . Bij bestraling met ultraviolette stralen gedurende $2\frac{1}{2}$ uur op een afstand van 30 cM. van de lamp werd de bacteriophag binnen $2\frac{1}{2}$ uur vernietigd.

Niettegenstaande de vele pogingen daartoe gelukte het toentertijd niet, om van dezen bacteriophag van *Bact. radicicola* behoorlijke plages te verkrijgen op een cultuurplaat, ofschoon, zooals gezegd, bij het uitstrijken van *Bact. radicicola* gemengd met een kleine hoeveelheid bacteriophag de plaat steriel bleef.

Dat feit bracht een gevoel van onvoldaanheid te weeg, niet alleen omdat men nu eenmaal van een nieuwen bacteriophage gaarne de plages zien wil, maar ook omdat er lytische stoffen bekend zijn, die den naam van bacteriophagen niet verdienen. Zoo vond bijvoorbeeld D'HÉRELLE ¹⁾ in de faeces van choleralijders na 3 à 4 dagen een lytisch werkende stof, welke geen bacteriophage bleek te zijn, en toch quantitatief werkte, terwijl SCHUURMAN ²⁾ nog verscheidene andere processen opsomt, waarbij verwarring met een echten bacteriophage mogelijk is. Daarom trachtte ik een methode te vinden om het vermogen plages te vormen ook bij deze bacteriophagen te kunnen demonstreeren.

Vergelijkt men een plaatcultuur van *Bact. radicularis* met *B. coli* bijvoorbeeld, dan ziet men aanstonds, dat er in het eerste geval meer kans is, dat een plage weder dicht loopt dan bij de *coli*; de groei is welig, draderig en taai-vloeibaar. Daarom werd getracht de *radicularis* op zulke platen te cultiveeren, dat de bacterie-laag droger en minder welig was. Aanvankelijk probeerde ik dat op platen van klaver- en duinagar (1 : 1) met 1 % saccharose, doch beter voldeden vleeschagar-saccharose platen. Deze werden dus nu met een dunne laag van een jonge *Bact. radicularis*-cultuur bestreken na bijmenging van een uiterst kleine hoeveelheid lysaat. Na eenige dagen kwamen een zeer groot aantal uiterst fijne plages tot ontwikkeling. Photo G (pag. 80) geeft een afbeelding van een klein deel van een cultuurdoos met plages van *Bact. radicularis*. Zij blijven lang zichtbaar, vloeien niet dicht maar worden niet merkbaar groter op den duur. Ze zijn niet zoo scherp omljnd als gewoonlijk.

Hiermede is dus bewezen, dat de bacteriophage van *Bact. radicularis* dien naam niet ten onrechte draagt.

¹⁾ Comptes rendus de la Soc. de Biol., 88, 723.

²⁾ Diss. Leiden, 1925, 21.

De hypothese van D'HÉRELLE, dat de bacteriophagaag tot de normale darmbewoners behoort, — vandaar de naam *Bacteriophagum intestinale*, — leeft ten koste van *B. coli* en door aanpassing in staat is pathogene indringers te bestrijden, heeft aanleiding gegeven tot de vraag of de bacteriophagaag kort na de geboorte van het individu door infectie van buiten af het organisme binnenkomt dan wel door het organisme zelf wordt geproduceerd. In den strijd over de al of niet levende natuur van den bacteriophagaag werd ook dit punt gretig aangegrepen om er nieuwe argumenten aan te ontleenen.

DÖRR ¹⁾ onderzocht steriel opgekweekte kuikens op de aanwezigheid van bacteriophagen in den darm. Daartoe werden uitwendig gesteriliseerde broedeieren in een broedmachine steriel uitgebroed, de kuikens overgebracht in steriele bakken en met steriel voeder opgefokt. Op geregelde tijdstippen werden enkele exemplaren gedood, de darmen er steriel uitgeprepareerd, met NaCl-oplossing en steriel kwartszand fijngezeven en tenslotte ten opzichte van *B. coli* op bacteriophagaag onderzocht. Het resultaat van deze proef was, dat de darmextracten van deze kuikens, die van 1—8 dagen oud waren, niet lytisch werkten; ook oudere steriele kuikens bleven ultra-steriel. Daarmede was DÖRR echter nog niet tevreden; hij behandelde steriel uitgebroede kuikens niet verder steriel, maar liet hen loopen op een bodem, die met een laag compost bedekt was, en voerde hen met ongestertiliseerd voer. Ofschoon dus nu de dieren reeds den eersten dag terdege met bacteriën werden geïnfecteerd, konden eerst na 15 dagen lytisch-werkende stoffen in den darm aangetoond worden, die specifiek waren ten opzichte van de bacteriën, die uit den darminhoud werden gekweekt. Hierin zag DÖRR de mogelijkheid, dat toch nog de bacteriophagaag door het organisme is afgescheiden, want, waarom komen de

¹⁾ Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 53, 1009.

lytische stoffen dan pas 15 dagen na de eerste infectie voor den dag?

Mijns inziens verliest DÖRR hierbij te veel uit het oog, dat het spijsverteringskanaal niet overal een indifferent medium voor den bacteriophage biedt, met name de maag zal voor de meeste bacteriophagen uiterst moeilijk te passeeren zijn wegens de sterk zure reactie van het maagsap. Volgens onderzoekingen van MICHAELIS, MENDELSSOHN, DAVIDSOHN, AUERBACH en PICK¹⁾ werden de volgende waterstofionen-concentraties gevonden in:

normaal maagsap	1.7×10^{-2}
maagsap (hyperacid)	4×10^{-2} tot 1×10^{-1}
darmsap	1×10^{-8}
faeces	1×10^{-8}
faeces bij zuigelingen	1×10^{-7} tot 1×10^{-6}

Wanneer men nu bedenkt, dat bijvoorbeeld de bacteriophage van *Bac. danicus* bij een P_H van 3.83 binnen 162 minuten tot op 2.25 % van het totaal afsterft bij een temperatuur van $15^\circ C.$, dan mag het een wonder heeten, wanneer een bacteriophage de maag met een P_H van 1.77 bij een temperatuur van 37° ongehinderd passeert. Voorbij de maag vervalt dit bezwaar, zooals uit de verdere gegevens blijkt.

DÖRR herhaalde de proef nogmaals, maar voederde nu de kuikens met voer, dat gemengd was met een niet-lysogene colistam, terwijl overigens steriliteitsvoorzorgen werden genomen. Na twee dagen vond hij in den darm van een dergelijk kuiken een bacteriophage, die specifiek was voor den gebruikten Coli-stam, en vijf dagen later in den darm van een ander kuiken eveneens een bacteriophage, die behalve den colistam ook andere stammen aantastte; tenslotte werden 15 dagen later nog steeds bacteriophagen gevonden, doch deze hadden het vermogen om den gevoederden coli-stam op te lossen verloren;

¹⁾ Chem. Kalender. Biedermann u. Roth. 1925 II 454.

deden dat echter wel met andere stammen. Op grond hiervan houdt DÖRR het niet voor uitgesloten, dat het vermogen om een bacteriophage te vormen reeds zeer vroeg in den darm aanwezig is en door voeding met speciale bacteriën kan worden aangezet.

Later is door verschillende onderzoekers in twijfel getrokken of DÖRR wel voldoende steriele en ultrasteriele voorzorgen bij zijn laatste proef genomen heeft, terwijl SCHURMAN ¹⁾ hem bestrijdt met de opmerking, dat het tegen DÖRR's proef pleit, dat die zogenaamde als reactie-product gevormde bacteriophagen een plurivalentie bezaten, die zich uitstreckte over die microben, waarmee het darmslijmvlies in 't geheel niet in aanraking was geweest, omdat biologische reactieproducten in het algemeen specifiek zijn.

PIERRET en BILOUET ²⁾ gingen bij een onderzoek over de mogelijkheid, dat de bacteriophage een rol speelt bij de aandoeningen van de spijsverteringsorganen van zuigelingen na, wanneer de bacteriophage in den darm aantoonbaar is. Met een steriele gummi sonde werd uit het meconium op een diepte van 6 centimeter een hoeveelheid faeces genomen en daarin de aanwezigheid van een bacteriophage ten opzichte van *B. dysenteriae* Shiga, *B. coli* en den bacil van EBERTH onderzocht. Zij deden dat bij kinderen van 3, 5, 8, 15, 21, 37 en 96 uur oud. Al deze onderzoekingen vielen negatief uit, terwijl bij een kind van 12 dagen een positief resultaat werd verkregen. Bij de kinderen van 3, 5 en 8 uur oud was dat begrijpelijk, omdat de darm niet alleen ultra-steriel maar ook vrij van bacteriën was; bij de overige kinderen wemelde de darm reeds van bacteriën. Dat de oorzaak van het ultra-steriel blijven niet in het meconium zelf was te zoeken, bleek daaruit, dat de reactie van

¹⁾ Diss. Leiden, pag. 63.

²⁾ C. R. de la Soc. de Biol., 93, 635.

het milieu neutraal was, dat een kunstmatig in den darm gebrachte bacteriophag actief bleef en dat 75 % van de gevallen positief uitvielen, wanneer men de aseptische voorzorgen naliet (de door infectie ingebrachte bacteriophagen bleven in het monster faeces werkzaam). Op grond van deze proeven sluiten zij zich aan bij hen, die aannemen, dat de darm niet in staat is een bacteriophag af te scheiden.

BORCHARDT ¹⁾ meende te hebben aangetoond, dat bij de inwerking van een mengsel van pancreas- en darmslijmhuideextract van een kat op coli en andere bacillen bacteriophagen ontstonden; FLU ²⁾ heeft echter aangetoond, dat men een negatief resultaat verkrijgt, wanneer men de uiterste aseptische voorzorgen in acht neemt, welke BORCHARDT blijkens de beschrijving naliet.

Ook SURANYI en KRAMAR ³⁾ kwamen tot de conclusie, dat de bacteriophag niet eerder in de faeces der zuigelingen verschijnt dan den vierden levensdag; zij stemmen daarin overeen met PIERRET en BILOUET.

Naar analogie van de hierboven opgesomde onderzoeken leek het van belang na te gaan of een klaverplant in staat is een bacteriophag af te scheiden, dan wel of men alleen dan een bacteriophag in de klaverplant aantreft, wanneer deze er door infectie van buiten af is ingekomen.

Teneinde hierop een antwoord te kunnen geven, werd de volgende proef ingezet:

40 erlenmeyers van 1½ Liter inhoud werden gedeeltelijk gevuld met een 6 cM. dikke laag agar van deze samenstelling:

leidingwater	1000 cc.
agar	10 gr.
MgSO ₄	0.5 gr.
K ₂ HPO ₄	0.5 gr.

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung (Orig.), 37, 1.

²⁾ Tijdschr. voor vergelijkende Geneeskunde, enz., 10, afl. 2—3, p. 1.

³⁾ Monatschr. f. Kinderheilkunde, 28, 330.

van een wattenprop voorzien en vervolgens gesteriliseerd. Nu werd een voldoende hoeveelheid gave, goed gevulde klaverzaden uitgezocht, eerst in alcoholische sublimaat-oplossing (1 : 1000) en daarna in zuivere alcohol van 96 % gesteriliseerd, en vervolgens eenige malen in steriel water afgespoeld. Toen de erlenmeyers in lauw water zoover waren afgekoeld, dat een op het agaroppervlak gebracht zaadje juist eenige millimeters wegzonk en dan in evenwicht bleef, werden in iedere erlenmeyer ongeveer 10 steriele zaadjes gebracht. Het is noodzakelijk, dat de zaadjes eenigszins onder het agaroppervlak komen te zitten, anders zijn ze later, zooals de ervaring geleerd had, niet in staat hun wortels in de agar te doen doordringen en blijven achter in groei. Nu werden alle flesschen met een steriele pipet voorzien van 1 cc. van een suspensie van *B. radiccicola*. Deze bacterie was reeds meer dan een jaar in cultuur en volgens alle bekende methoden ¹⁾ niet lysogeen gebleken, d.w.z. zij was vrij van een besmetting met bacteriophaga. Bovendien werd de helft van het aantal flesschen met 1 cc. lysaat van *B. radicola* bedeed. Tenslotte werden ze allen van een steriele kap voorzien en in een verwarmde broeikas gezet, zoodat de jonge klaverplanten zooveel mogelijk van het daglicht konden profiteeren.

De kieming verliep volkomen normaal, terwijl ook bij de verdere ontwikkeling der planten geen verschillen tusschen de planten met en zonder bacteriophaga waren op te merken. Nagenoeg in alle flesschen had overvloedige knolletjesvorming aan de wortels plaats.

Een moeilijkheid is hierbij nog, dat men niet weet, hoelang de klaverzaden gesteriliseerd moeten worden; dit hangt af van het oppervlak van het klaverzaad en van den graad van infectie. Doet men het te lang, dan wil geen enkel zaad kiemen;

¹⁾ Flu, Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde, 11, 737.

te kort, dan heeft men een groot aantal infecties in de flesschen. Het beste is nog om wat lang te steriliseeren en meer zaden in iedere flesch te doen.

Na verloop van vier maanden werden de flesschen nauwkeurig geïnspecteerd, waarbij er van de 40 flesschen toch nog 18 geïnfecteerd bleken te zijn en 22 volkomen steriel, n.l. 10 met bacteriophag en 12 zonder. Infectie heeft behalve door onvoldoende sterilisatie ook nog plaats door het binnendringen van kleine insecten langs de wattenprop heen en door het doorgroeien van de proppen met schimmels.

Het onderzoek op de aanwezigheid van een bacteriophag had nu als volgt plaats: onder zeer nauwkeurig aseptische voorzorgen (gedesinfecteerde handen en armen; steriel gereedschap; in een rustig, niet als werklokaal gebruikt vertrek) werden de klaverplanten met een lange tang met wortel en al uit de agar getrokken, steriel fijngewreven in een mortier en de massa gebracht in een kolfje met 50 cc. klaverextract, dat licht troebel was, doordat er den vorigen dag *B. radicola* in was geënt en deze bij 26° was gekweekt. Het glazen mortier, dat voor elke flesch opnieuw gereinigd en gesteriliseerd moest worden, werd na ieder gebruik met water uitgespoeld, daarna geheel in alcohol van 96 % ondergedompeld en tenslotte zoolang met steriel water nagespoeld tot mocht worden aangenomen, dat de alcohol volkomen verdwenen was. De 22 kolfjes met de fijngewreven massa werden vervolgens gedurende twee maal vier en twintig uur bij 26° geplaatst en eindelijk door uitgegloeide kaarsen van CHAMBERLAND afgefiltreerd. In dit filtraat werd daarna op de gebruikelijke wijze het al of niet aanwezig zijn van een bacteriophag aangetoond door enkele druppels filtraat te brengen in een zeer jonge *B. radicola*-cultuur en deze na plaatsing bij 26° te vergelijken met een contrôle-cultuur. Het onderzoek op agarplaten leent zich bij de *radicola* minder goed voor dit doel, omdat men de bacte-

riën kunstmatig in haar groei moet belemmeren om behoorlijke plages te verkrijgen.

Het resultaat was nu, dat reeds bij de eerste filtratie alle 10 filtraten afkomstig van klaverplanten, die in tegenwoordigheid van den bacteriophag waren gekweekt, lysis opwekten in jonge radicolaculturen, zooals ook te verwachten was, en dat de 12 filtraten, afkomstig van bacteriophag-vrije klaverplanten, ook na herhaalde filtratie geen spoor van lysis vertoonden; de contrôle-culturen waren en bleven volkomen gelijk aan deze laatsten.

Hiermede is dus bewezen, dat onder deze omstandigheden:

1e. klaverplanten niet in staat zijn bacteriophagen ten opzichte van *B. radicola* af te scheiden en

2e. dat de aanwezigheid van een bacteriophag niet noodzakelijk is om de grootte der wortelknolletjes binnen de perken te houden.

Wat het eerste punt betreft, het lijkt waarschijnlijk, dat ook in de natuur door klaverplanten of in 't algemeen door leguminosen geen bacteriophagen worden geproduceerd. De tweede conclusie weerlegt de vroeger opgestelde hypothese, dat de bacteriophag wellicht in staat zou zijn de in de wortels doordringende bacteriën op een gegeven oogenblik het verder voortwoekeren te beletten, opdat niet tenslotte het geheele wortelstelsel ontaardt tot één massa van wortelknollen. Het blijft dus nog steeds raadselachtig, hoe de klaverplant de binnendringende bacteriën weet te localiseceren.

Tenslotte is er nog een zeer belangrijk en niet minder moeilijk verklaarbaar punt met betrekking tot de symbiose van plant en bacterie, d.i. de overdracht van de door de bacteriën geassimileerde stikstof op de plant. Zooals bekend is, nemen de bacteriën voortdurend in aantal toe in de knolletjes, totdat de plant gaat bloeien. Op dat oogenblik houdt de activiteit van de bacteriën plotseling op, de knolletjes verslijmen en de inhoud

wordt door proteolytische enzymen opgelost, die de plant, zooals men aanneemt, afscheidt. Daarna resorbeert de plant de ontledingsproducten der bacteriën en voert deze toe aan de nu in volle ontwikkeling zijnde zaden. Van de knolletjes blijft alleen het buitenste deel als vliesje achter, terwijl er gewoonlijk hier en daar toch nog een enkel knolletje het normale uiterlijk behoudt.

Het leek niet onmogelijk, dat bij deze zonderlinge gebeurtenis ook de bacteriophag een rol speelt, omdat hij van nature schijnt aangewezen om bacteriën tot oplossing te brengen. Oogen-schijnlijk geeft ook hierop het resultaat van de bovenstaande proef het antwoord in den vorm van deze conclusie: de bacteriophag heeft voor de klaverplant onder deze omstandigheden geen physiologische beteekenis in dien zin, dat hij geen rol speelt bij de overdracht van de door de bacteriën in de knolletjes geassimileerde stikstof.

Het lijkt mij echter niet geoorloofd deze gevolgtrekking te maken, omdat de klaverplanten de periode, waar het hier om gaat, nog niet hadden bereikt en waarschijnlijk ook niet bereikt zouden hebben, al waren zij langer intact gebleven. In hoofdzaak ligt dat aan de gebrekkige ventilatie door de wattenprop der erlenmeyers; men zou stellig kunstmatig steriele lucht, desnoods met verhoogd CO₂-gehalte, moeten doorleiden om een behoorlijke zuurstof- en koolzuurverversching mogelijk te maken. Bovendien is niet komen vast te staan, dat er bij de klaverplanten werkelijk stikstofassimilatie en stikstofoverdracht aan de plant heeft plaats gehad; slechts een nauwkeurige analyse had dat kunnen bewijzen. Dat is ook niet waarschijnlijk, wanneer men leest, dat NOBBE en HILTNER ¹⁾ hebben aangetoond, dat planten, waarvan de wortelknolletjes onder water zijn gedompeld, niet aan stikstof winnen, voordat men deze weder

¹⁾ Percival, *Agricultural Bacteriology*, p. 196.

boven het wateroppervlak brengt. Daarmede is geheel in overeenstemming het zeer merkwaardige feit, dat de klaverplanten in de erlenmeyers bijzonder rijk aan wortelknolletjes waren op die plaatsen, waar de wortels eenige millimeters over het agaroppervlak liepen alvorens er in te verdwijnen. Deze knolletjes waren niet onder aan deze wortelstukken vastgehecht, maar stonden er bovenop en staken vrij uit de lucht in. Blijkbaar hadden de bacteriën of de planten zich weten te wapenen tegen het dreigend stikstofgebrek. Dat maakt toch wel eenigszins aannemelijk, dat er stikstofassimilatie heeft plaats gehad, evenals de vroeger opgedane ervaring, dat de klaverplanten in dergelijke erlenmeyers aanmerkelijk minder goed groeien, wanneer men geen bacteriën toevoegt onder overigens gelijke omstandigheden.

Een antwoord op de vraag of de bacteriophag een rol speelt bij de stikstofoverdracht zal dus alleen dan te beantwoorden zijn, wanneer het gelukt klaverplanten met en zonder bacteriën en bacteriophag overigens steriel zoodanig te kweken, dat zij door de bloeiperiode heenkomen en werkelijk de verdwijning der knolletjes vertoonen. Met 't oog op den langen duur der proef was het niet mogelijk deze nogmaals te herhalen vóór het afsluiten van dit onderzoek.

Eindelijk zij er nog op gewezen, dat de oorspronkelijke proef alleen heeft aangetoond, dat onder deze omstandigheden de klaverplant geen bacteriophag produceert; niet bewezen is dat in de planten, die in tegenwoordigheid van den bacteriophag zijn gekweekt, de bacteriophag reeds was binnengedrongen; immers, dan zouden de planten vóór het fijnwrijven uitwendig moeten zijn gesteriliseerd. In verband met het gering aantal van bacteriophag voorziene flesschen, dat vrij van infectie was, achtte ik het beter dit uit te stellen tot een nadere proef, temeer daar het mij niet bekend was, hoelang een klaverplant de uitwendige sterilisatie verdraagt.

Er bestaat dus een analogie tusschen het resultaat van de aan het begin van dit deel besproken proeven over het produceeren van den bacteriophag door zuigelingen, kuikens, e.d. en de uitkomst van dit onderzoek. Zelfs in tegenwoordigheid van *B. radicicola* wordt in de klaverplant geen bacteriophag gevormd, hetgeen er op wijst, dat de bacteriophag noch een product der bacteriën noch een product van de plant is, maar uit den grond in de plant doordringt.

