

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming
van het NIOZ.

Desulfovibrio desulfuricans in een chemostaat met
sulfaat als beperkende faktor

door

H.J. Gons

Desulfovibrio desulfuricans in een chemostaat met
sulfaat als beperkende faktor

door

H.J. Gons

Intern verslag
over
werkzaamheden verricht als doctorale studie
in het tijdvak juni - oktober 1971
aan
NIOZ te Texel
voor
Laboratorium voor Microbiologie, Amsterdam

onder supervisie van J.H. Vosjan

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE
PUBLICATIES EN VERSLAGEN:
nummer 1972-12

INHOUD

I. SAMENVATTING SUMMARY	... 1
II. INLEIDING	... 2
III. MATERIALEN EN METHODEN	... 3
IV. RESULTATEN EN DISKUSSIE	... 6
V. LITERATUUR	...12

I. SAMENVATTING

Bij dit onderzoek werd *Desulfovibrio* gekweekt in een chemostaat met sulfaat als beperkende faktor en pyruvaat als C-bron.

Uit de verhouding tussen de konsumptie van pyruvaat en de konsumptie van sulfaat blijkt bij toenemende D een verschuiving op te treden van fermentatie naar anaerobe respiratie tot D een waarde van rond 0,1 bereikt. Vervolgens blijkt de verhouding tussen fermentatie en anaerobe respiratie konstant te blijven tot D een waarde van 0,3 bereikt. Bij verder toenemende D vindt een onderdrukking van anaerobe respiratie plaats.

Bij een experiment met een overmaat van sulfaat in het medium bleef de mate van anaerobe respiratie konstant in het onderzochte traject van $D = 0,02$ tot $D = 0,28$.

SUMMARY

At this investigation *Desulfovibrio* was cultured in a chemostate with sulphate as limiting factor and pyruvate as C-source.

From the ratio between the consumption of pyruvate and the consumption of sulphate it appears that with increasing D a shift takes place from fermentation to anaerobic respiration until D reaches a value of about 0,1.

Then the ratio between fermentation and anaerobic respiration appears to remain constant until D reaches a value of 0,3.

With further increasing D a suppression takes place of anaerobic respiration.

At an experiment with a surplus of sulphate in the medium the measure of anaerobic respiration remained constant in the investigated interval from $D = 0,02$ till $D = 0,28$.

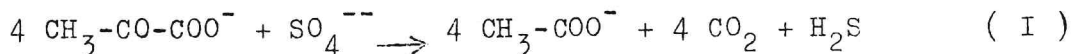
II. INLEIDING

Desulfovibrio desulfuricans bezet een centrale plaats in de zwavel-cyclus, zoals uit het schema van Fig. 1 duidelijk wordt (ontleend aan STANIER ET AL., 1970).

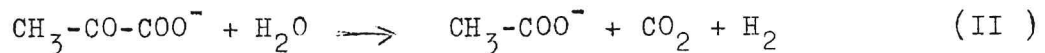
De betekenis van de zwavel-cyclus is groot bij de vorming van mariene sedimenten (Fig. 2). Door afbraak van detritus is de bodem reeds dicht onder het oppervlak anaeroob, waardoor ter plaatse veel fermentatieproducten ontstaan terwijl sulfaat hier gemakkelijk kan doordringen: een ideale habitat voor de obligaat anaerobe Desulfovibrio. Het door dit organisme geproduceerde H_2S bindt Fe^{++} tot FeS , hetgeen de zwarte kleur van de desbetreffende laag verklaart.

De activiteiten van Desulfovibrio vormen een shunt in de zwavel-cyclus, waardoor in principe zelfs een volledig anaerobe kringloop mogelijk is.

Desulfovibrio heeft het vermogen tot anaerobe respiratie, waarbij sulfaat de elektronen accepteert. Als C- bronnen kunnen o.a. lactaat en pyruvaat dienen. De groeiopbrengst op pyruvaat blijkt hoger dan die op lactaat, bovendien is gebleken dat in afwezigheid van sulfaat geen groei op lactaat optreedt maar nog wel op pyruvaat (VOSJAN, 1970). Op pyruvaat is dus zowel anaërobe respiratie mogelijk, door oxidatieve fosforilering met sulfaat als elektronen acceptor, volgens



als fermentatie volgens



Onder "Materialen en Methoden" zal ingegaan worden op enige principes die van toepassing zijn op de cultuur in een chemostaat.

Zolang sulfaat beperkend is zullen beide processen in de chemostaat naast elkaar verlopen, daar enerzijds het sulfaat "op" is, maar anderzijds voortdurend aangevoerd wordt. Het is trouwens de vraag in hoeverre deze processen van elkaar zijn te ontkoppelen. Bij de gisten vinden we het z.g. Pasteur-effekt: gisting laat zich bij een aantal soorten bijna volledig onderdrukken door krachtige doorluchting, hetgeen zinvol is daar de aerobe afbraak veel meer energie oplevert. Een verklaring voor dit verschijnsel biedt het feit dat ATP het enzym fosfofructokinase remt, welk enzym de eerste stap van de hexose-afbraak bij de glycolyse katalyseert. AMP is hier echter een positieve effektor. Gisting zou dan eerst mogelijk worden wanneer door afwezigheid van zuurstof de oxidatieve fosforilering onmogelijk en zo de verhouding ATP/AMP kleiner wordt.

Vanuit oceanografisch gezichtspunt is het ATP-gehalte, als maat voor biomassa, bij een verscheidenheid aan fysiologische kondities interessant.

De chemostaat is een uitermate geschikt hulpmiddel bij dit soort onderzoek, daar men ondanks het feit dat een bepaalde grootte als beperkende factor optreedt toch een grote produktie van de te onderzoeken organismen kan hebben. De te verkrijgen Dx-kurve wordt beschreven door een aantal parameters die belangrijke

referenties kunnen zijn voor fysiologisch en oecologisch onderzoek.

III. MATERIALEN EN METHODEN

In Fig. 3 wordt de gebruikte chemostaat-opstelling afgebeeld. De bacteriën werden gehouden in een vat met deksel, waarin een aantal openingen waardoor

A medium werd toegevoerd

B kon worden geënt

C een kontakt-thermometer kon worden ingebracht

en D een lichte stikstof-overdruk kon worden aangehouden en monsters konden worden genomen.

Het cultuur-volume in het vat werd konstant gehouden d.m.v. een overloop-afvoer E.

Het deksel kon luchtdicht op het vat worden bevestigd door de geslepen randen van vat en deksel in te vetten en beide op elkaar te klemmen. Het medium werd in een dergelijk vat van 20 liter gehouden.

Het medium werd via een peristaltische pomp aangevoerd. Een nauwkeurige regeling van de toegevoerde hoeveelheid per tijdseenheid ($f = \text{flow}$) is met dit type pomp goed mogelijk. De flow werd gemeten m.b.v. een buret, waarbij slangen-klem 1 gesloten en 2 geopend werd.

Een temperatuur van 30°C kon nauwkeurig worden aangehouden via de koppeling van een infrarood-lamp aan een kontakt-thermometer.

Voor het handhaven van een anaërobe toestand stonden de volgende omstandigheden borg:

- door steriliseren wordt zuurstof uit het medium verdreven
- een lichte stikstof-overdruk werd zowel op het medium als in de cultuur aangebracht
- door dik beënten wordt de bij de aanvang nog aanwezige zuurstof door H_2S gebonden
- H_2S -produktie in de cultuur.

De stikstof werd via steriele wattenproppen geleid. De thermometer werd in alcohol gesteriliseerd. Het voorraad- en het cultuur-gedeelte werden afzonderlijk gesteriliseerd en vervolgens aan elkaar gekoppeld (koppelingen niet in Fig. 2 aangegeven). De grootste moeilijkheid vormde het aparte slangstuk voor de pomp, daar vaak de koppelingen hiervan met de overige slangen na steriliseren kapot waren. Om infectie van het medium vanuit de cultuur te voorkomen werd het medium via een dubbele trap in de cultuur geleid. Ook achter de afvoer was een trap aangebracht.

Met een magneet-roerder werd getracht een zo goed mogelijke menging in de cultuur te bereiken (zodat geen metabolische gradiënten ontstaan) en tevens groei op de wanden van het vat te voorkomen (verlies aan produktie bij het monsteren). Het verzamelen van bacteriën en cultuur-vloeistof in de monsterbuis (30 ml) geschiedde door een omkering van de stikstof-toevoer door klemmen 3 en 5 te openen en 4 en 6 te sluiten.

Bij de aangehouden roermotor-stand en magneet en na het inbrengen van thermometer en stikstof-toevoer werd het volume van de cultuur bepaald op 325 ml.

Desulfovibrio werd in de chemostaat gekweekt op een complex "marien" medium met sulfaat als beperkende factor en pyruvaat als C-bron:

NaCl	20	g/l	
KH ₂ PO ₄	0,1		
MgCl ₂	0,1		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,003		
Tris	6,06		
HCl	3,8 ml/l		pH 7,3
gistextrakt	0,5	g/l	
trypticase "bacto-casitone"	0,5		
Na-pyruvaat	5,5		= 50 mMol/l
Ammonium-sulfaat	0,66		= 5 mMol/l

De pH bleek na het steriliseren lager te zijn geworden b.v. 6,9. Geënt werd vanuit een voorkultuur waarin het pyruvaat was vervangen door 3,3 g/l Na-lactaat (de groei op lactaat is voor de meeste organismen nihil).

De groei werd bepaald als eiwit mg/l met biureet-reagens en beschouwd tegen pyruvaat- en sulfaat-konsumptie. Pyruvaat werd bepaald als pyruvaat-hydrazone na reactie met 2,4-dinitrofenylhydrazine en loog en extractie met Na-carbonaat. Sulfaat reageert met BaCl₂ tot het slecht oplosbare BaSO₄, meting kan dan volgen door de licht-verstrooiing door de ontstane partikeltjes. Meting van de hoeveelheden eiwit, pyruvaat en sulfaat vond plaats met de Zeiss-fotospectrometer.

Ook werden enige pogingen ondernomen ATP te bepalen. Aanvankelijk met een test-kombinatie van Boehringer Mannheim GMBH welke berust op de koppeling tussen ATP → ADP en NADH₂ → NAD bij de omzetting van 3-fosfoglyceraat tot glycerinealdehyde-3-fosfaat (ADAM, 1962). De omzetting NADH₂ → NAD kan fotometrisch gevolgd worden. En vervolgens met de luciferine-methode m.b.v. vuurvliegen-extrakt. ATP wordt hier verbruikt bij de omzetting

$$\text{ATP} + \text{Mg}^{++} + \text{O}_2 + \text{LH}_2 + \text{luciferase} \longrightarrow \text{licht}$$
Het aantal licht-pulsen kan gemeten worden op de vloeistof-scintillatie-teller (Nuclear Chicago). Literatuur: SCHRAM, 1969. Op de gevolgde werkwijze wordt later ingegaan.

De monsters werden bewaard in de koelkast. I.h.a. werd bij iedere D (zie p. 6) driemaal een monster genomen. Indien de laatste twee monsters in hun eiwit-gehalten overeenkwamen werd aangenomen dat de cultuur in steady state was. Alleen de eiwit-bepaling werd in duplo uitgevoerd. Bij hoge D kunnen de monsters vrij snel op elkaar volgen. Overigens werd vaak als criterium genomen voor de eerste monsternamen bij een bepaalde D dat niet meer dan 5 % van de oorspronkelijke populatie aanwezig mocht zijn, hetgeen berekend kan worden volgens $0,05 = e^{-Dt}$.

Tenslotte werd de groei in enige batchkulturen fotometrisch gevolgd (Biofotometer, Jouan) m.n. om de maximale groeisnelheidskonstante μ_{max} in dit medium te bepalen.

Het is door de grote morfologische variatie binnen dit organisme moeilijk de reinheid van de kultuur met het mikroskoop te beoordelen. In twijfelgevallen werden daarom "Pasteur pipet" verdunningen in een medium volgens POSTGATE (POSTGATE, 1965) gemaakt en bij 30° geïnkubeerd. Dit medium behoort bijzonder selectief voor kontaminant anaerobe bakteriën te zijn. Wanneer de kultuur rein is zullen betrekkelijk weinig koloniën verschijnen die allen zwart zijn. Ook deze procedure bleek echter weinig bevredigend daar soms helemaal geen bakteriën opkwamen en er aanwijzingen waren dat het in de agar aanwezige Fe te zeer gebonden was, zodat eventuele koloniën van *Desulfovibrio* niet zwart werden en voor een infectie konden worden aangezien, zodat een experiment ten onrechte werd gestaakt. Eventuele oorzaken zouden een teveel aan agar en een pH-wijziging na toevoeging van de agar kunnen zijn.

Enige principes die betrekking hebben op de groei in een chemostaat volgen hieronder.

De groei van cellen heeft een exponentieel karakter en voldoet aan

$$x_t = x_0 \cdot e^{\mu t}$$

waarin μ de groeisnelheidskonstante is, welke door het milieu wordt bepaald. In een milieu zonder externe limitatie zal μ maximaal zijn en wordt dan μ_{max} genoemd. De betrekking tussen μ en de konsentratie van het beperkende substraat wordt gegeven door

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

hier is S de konsentratie van het beperkende substraat in het kweekvat en K_S de konsentratie waarbij $\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$ (zie Fig. 4).

Wordt het volume van de kultuur V genoemd en de hoeveelheid vers medium/hr f dan is de verdunningsfaktor $D = f/V$, dimensie hr^{-1} .

D drukt dus uit welk gedeelte van de kultuur ieder uur door vers medium wordt vervangen en dus ook in welke mate cellen de kultuur zullen verlaten.

Wanneer het uitspoelen van cellen juist gekompenseerd wordt door groei spreekt men over een steady state. Een steady state zal "altijd" bereikt worden, mits $D_{\mu} < D_{\mu}^{\max}$ niet overtreft. Bij een steady state geldt immers $\mu = D$. Indien D_{μ} overtreft zal de konzentratie van het beperkende substraat toenemen en daardoor ook μ totdat deze gelijk wordt aan D . Zo kan ook beredeneerd worden dat zich een evenwicht instelt wanneer μ aanvankelijk groter is dan D .

De relatie tussen biomassa en substraat-konzentratie wordt gegeven door

$$x = Y (S_R - S)$$

hier is S de konzentratie van het substraat in de kultuur

S_R de konzentratie in het medium
en Y^R (yield) een "economische faktor"

In dit verslag wordt Y_{pyr} (de groeiopbrengst op pyruvaat) gegeven als eiwit mg/l per mMol gekonsumeerd pyruvaat.

Volgens vergelijking I (p. 2) kan bij anaërobe respiratie een sulfaat-ion de elektronen van vier pyruvaat-ionen accepteren. De verhouding tussen gekonsumeerd pyruvaat en gekonsumeerd sulfaat, voortaan uitgedrukt als P/S, wordt dan = 4. Zodra ook fermentatie optreedt en pyruvaat-konsumptie dus niet gebonden is aan het voorhanden zijn van sulfaat, wordt dit meer dan 4.

In de Dx -kurve kunnen de relaties tussen de verschillende grootheden worden opgenomen. In Fig. 5 wordt de ideale Dx -kurve afgebeeld.

IV. RESULTATEN EN DISKUSSIE

De resultaten van de experimenten worden in tabellen I tot VI gegeven en aan de hand van Dx -kurves besproken.

Tabel I. Experiment 1.

D hr^{-1}	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y_{pyr}	sulfaat ¹⁾ mMol/l	P/S
0,06	282-263	4,2	6		9
	240-242	6,8	5,5		8,5
	247-273	2,8	5,5		9,5
0,17	275-273	12,8	7,5		7,5
	288-306	10,3	7,5		8
	verloren	9,2			8
	324-298	14,0	8,5		7
0,24	308-319	8,3	7,5		8,5
	312-317	12,1	8		7,5
	306-319	6,3	7		9

1) sulfaat werd hier alleen kwalitatief bepaald en bleek op te zijn.

Experiment 1 (Tabel I) werd stopgezet daar infectie was opgetreden.

Tabel II. Experiment 2.

D hr ⁻¹	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y _{pyr}	sulfaat ¹⁾ mMol/l	P/S
0,17	331-333	10,3	8,5		8
	377-380	12,7	10		7,5
	315-319	8,6	8		8
0,23	240-228	14,5	7		7
	240-263	10,9	7		8
	247-284	14,7	7,5		7
0,32	200-228	20,0	7	verloren	

1) sulfaat bleek op te zijn.

Voortzetting van experiment 2 (Tabel II) was onmogelijk doordat Desulfobivrio in het voorraad-vat was terechtgekomen.

De fragmentarische Dx-kurves die experimenten 1 en 2 opleverden worden gegeven in Fig. 6.

Tabel III. Experiment 3.

D hr ⁻¹	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y _{pyr}	sulfaat mMol/l	P/S
0,13	201-186	verloren		verloren	
	215	23,2	8	0,13	5,5
	203-217	23,1	8	0,05	5,5
0,30	171-181	28,0	8	1,09	5,5
	203-186	26,6	8,5	0,60	5,5
0,35	251-244 ¹⁾	26,3	10	1,05	6
	238-199	22,8	8	0,28	5,5
	173-196	18,9	6	0,00	6
0,40	119-112	21,7	4	0,13	5,5
	93-91	23,6	4	0,08	5
	112-119	13,5	3	0,38	7

1) de roerder bleek te hebben stilgestaan.

Daar het voorraad-vat bijna leeg was werd de pomp op een lage stand gezet. Bepaling van f was niet meer mogelijk, f werd daarom geschat: 0,06.

Het monster wat werd genomen leverde een bijzonder hoge extinctie op bij de eiwit-bepaling. Er bleek dan ook een met het biureet-reagens onoplosbare component in te zitten, waarvan alleen vaststaat dat het geen zwavel was. Later bleek infectie te zijn opgetreden.

Tabel IV. Experiment 4.

D hr ⁻¹	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y _{pyr}	sulfaat mMol/l	P/S
0,22	226	19,7	7,5	0,38	4
	251-251	19,8	8,5	0,00	4
	222-224	25,8	9	0,00	5
0,28	230-224	24,7	9	0,13	5
0,32	224-232	24,6	9	0,00	5
	230-224	25,5	9	0,00	5
0,37	192-194	29,4	9	0,60	4,5
	177-183	30,2	9	0,40	4,5
0,42	190-196	28,8	9	0,60	5
	179-190	25,0	7,5	0,90	6
	169-163	22,5	6	0,90	6,5
0,06	272-253	7,0	6		8,5
	260-243	5,0	5,5		9
	226-205	3,8	4,5		9

Aangenomen kan worden dat het sulfaat bij D = 0,06 op was, daar de toevoeging van BaCl₂ geen troebeling optrad. Minder dan drie monsters werden alleen genomen wanneer uit de tijd die was verstreken na verandering van D werd afgeleid dat de cultuur in steady state was.

De cultuur werd vervolgens op D = 0,09 gebracht. Ook nu bleken de monsters niet geheel op te lossen in biureet-reagens. Tenslotte werd weer infectie gekonstateerd.

De Dx-kurves van experimenten 3 en 4 worden gegeven in Fig. 7.

In het traject van D = 0,3 naar D = 0,4 nemen de eiwit-konsentraties in beide gevallen sterk af. Deze afname verloopt geleidelijk (vgl. Fig. 5), hetgeen zou kunnen berusten op interactie van een andere beperkende factor naast sulfaat. Het eveneens geleidelijk toenemen van de sulfaat-konsentratie sluit hierop aan. De pyruvaat-konsumptie levert een onduidelijk beeld. Bij experiment 3 werd zelfs een toename van de konsumptie bij de afname van de eiwit-konsentratie gevonden.

Experimenten 5 en 6 betreffen twee culturen die naast elkaar werden opgesteld en op dezelfde pomp waren aangesloten. Bij experiment 6 bevatte het medium 15 mMol sulfaat per liter, zodat het sulfaat niet beperkend was.

Tabel V. Experiment 5.

D hr ⁻¹	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y _{pyr}	sulfaat mMol/l	P/S
0,02	156-163	6,2	3,5	0,70	10
	169-162	verloren		0,00	
	190-192	5,3		4,5	
0,06	239-217	12,8	6	0,00	7,5
	213	12,8	5,5	0,00	7,5
	232	9,2	5,5	0,04	8
0,13	266	14,6	7,5	0,00	7
	262-248	14,3	7	0,00	7
	243-260	12,8	7	0,00	7,5
0,21	243-239	15,1	7	0,20	7,5
	260-253	14,7	7,5	0,30	7,5
	262-262	14,1	7,5	0,00	7
0,29	226-217	22,3	8	0,20	6
	207-198	20,5	7	0,90	7
0,37	138	24,8	5,5	0,80	6
	92-95	31,5	3,5	3,00	10
0,13	208-218	15,9	6	0,00	7
	277-279	15,7	8	0,10	7

Tabel VI Experiment 6

D hr ⁻¹	eiwit mg/l	pyruvaat mMol/l	Y _{pyr}	sulfaat mMol/l	P/S
0,02	234-234	1,1	5	4,4	4,5
	249-249	2,4	5	4,8	4,5
	281-270	0,2	5,5	5,0	5
0,06	338-312	0,3	6,5	5,4	5
	328	1,0	6,5	5,5	5
	342-336	0,4	7	5,2	5
0,13	336-336	0,2	6,5	6,0	5,5
	310-325	0,5	6,5	5,4	5
	284-300	0,5	6	5,9	5,5
0,21	188-184 ¹⁾	12,5	5	10,1	7,5
	336-319	0,5	6,5	6,1	5,5
	353-372	0,3	7	5,7	5,5
0,29	285-295	4,4	6,5	7,6	6
	337-342	2,8	7	6,7	5,5

1) de stikstof-druk bleek te zijn weggevallen.

In Fig. 8 worden de Dx-kurves van experiment 6 tot $D = 0,2$ à $0,3$ volledig verbruikt, zodat kan worden aangenomen dat het hier beperkend was. Opvallend hierbij is dat de eiwit-konsentrasië niet zo hoog was als verwacht kon worden, daar hier vrijwel tweemaal zoveel sulfaat werd gekonsumeerd als bij de overige kulturen. Opvallend is verder de lagere eiwit-konsentrasië bij lage D, zowel bij experiment 5 als 6. Ook bij deze experimenten werd een geleidelijke afname van de eiwit-konsentrasiës bij hogere D gevonden, maar nu duidelijk gekorreleerd met een toename in de konsentrasiës van pyruvaat en sulfaat.

De groei in een aantal batchkulturen werd gevolgd in de Biofotometer. Hierbij werd geënt vanuit de chemostaat van experiment 5 met 1 ml in kuvetten van 10 ml. Ter beschikking stonden kuvetten met een weglengte van 3 cm en van 1 cm, zodat de extinktie-schaal van het apparaat zo goed mogelijk kon worden benut. Aangezien werd aangenomen dat de groei in het gebruikelijke medium met 50 mMol/l pyruvaat en 5 mMol/l sulfaat niet geheel gevolgd zou kunnen worden werd ook een medium met 25 en $2\frac{1}{2}$ mMol/l samengesteld. Daarnaast werd nog een medium samengesteld met 25 en $7\frac{1}{2}$ mMol/l ter vergelijking met experiment 6. In alle gevallen werd in duplo ingezet. De duplo's kwamen zo goed overeen dat in Fig. 9 met telkens één kurve wordt volstaan.

De groei is van de formele gedaante $x = x_0 \cdot e^{\mu t}$. Zolang de groei exponentieel is heeft μ de waarde μ_{max} , zodat μ_{max} berekend kan worden volgens

$$\mu_{max} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

De waarden die aldus werden verkregen waren voor het medium met 50 mMol/l pyruvaat en 5 mMol/l sulfaat : 0,60

25 $2\frac{1}{2}$: 0,45 en

25 $7\frac{1}{2}$: 0,58.

De produktie in medium 3 (zie Fig. 9) is ongeveer het dubbele van de produktie in medium 2, hetgeen aardig overeenkomt met de verwachting. Jammer genoeg kan weinig gezegd worden over de uiteindelijke produktie in medium 1, het is niet onwaarschijnlijk dat het gebruik van een 1 cm-kuvet dit wel zou hebben mogelijk gemaakt. Overigens rest nog de vraag in hoeverre er een lineair verband bestaat tussen optische dichtheid en cel-dichtheid. De krommingen in de kurves geven in dit opzicht te denken.

Bij een aantal gelegenheden werd getracht iets over de ATP-pool aan de weet te komen. Daar deze pogingen op niets uitliepen wordt hier slechts kort op ingegaan.

De instructie bij de test-kombinatie van Boehringer, welke is afgestemd op bloedonderzoek, schrijft het gebruik van ijskoud perchloorzuur voor bij de extractie van ATP. Later werd de verblijftijd in perchloorzuur gevarieerd, gekookt in perchloorzuur, gekookt in Tris-buffer en dat alles nog eens met gefractioneerde cellen. Indien standaard ATP werd toegevoegd verliep de reaktie overigens prachtig.

Ten slotte werd de luciferine-test uitgevoerd bij een aantal monsters van experimenten 5 en 6. Extractie vond plaats door gedurende vijf minuten te koken in Tris-buffer na toevoeging van standaard ATP. De monsters werden ingevroren en anderhalve maand later

geanalyseerd m.b.v. de vloeistof-scintillatieteller. Daar de concentratie van de standaard ATP aanleiding had gegeven tot misverstand konden de resultaten niet op hun waarde geschat worden.

De verkregen Dx-kurves variëren onderling sterk, zowel wat betreft de concentraties van eiwit en pyruvaat als de vorm. Enige overeenkomsten zijn echter de lage waarden van de eiwit-konzentraties bij lage D en het geleidelijk afnemen van de eiwit-konzentratie bij hogere D.

In Fig. 10 en 11 worden de relaties tussen Y_{pyr} en P/S tegen D beschouwd.

Uit deze figuren blijkt duidelijk dat een hoge waarde voor Y_{pyr} gepaard gaat met een lage waarde voor P/S, hetgeen overeenkomt met het feit dat bij anaerobe respiratie meer energie kan worden vrijgemaakt dan bij fermentatie. Het is dus ook gemakkelijk in te zien waarom Y_{pyr} en P/S bij experiment 6 vrijwel konstant blijven. De lagere eiwit-konzentraties bij lage en bij hoge D gaan beide gepaard met een lage waarde voor Y_{pyr} en een hoge waarde voor P/S, waaruit opgemaakt kan worden dat in beide gevallen een verschuiving naar fermentatie is opgetreden. Wanneer er vanuit gegaan wordt dat een cel per tijdseenheid een konstante hoeveelheid ATP moet vrijmaken om zich in stand te kunnen houden, betekent dit dat bij lage D naar verhouding meer koolstof aan de z.g. onderhouds-energie ten goede moet komen dan bij hogere D. Dit zou de verklaring kunnen zijn voor het verschijnsel dat de eiwit-konzentratie lager wordt naarmate D afneemt. Hiernaast staan nog een mogelijke vorming van reservestoffen en verhoging van de sterftekans bij lage D.

De experimenten betroffen kulturen waarbij D telkens werd opgevoerd. Groei op de wanden van het kultuur-vat zou dus van betekenis kunnen zijn bij de afname van de eiwit-konzentratie bij hogere D. Dit is echter zeer beperkt gebleven. Bovendien blijkt uit Fig. 10 en 11 duidelijk dat hier sprake was van onderdrukking van de anaerobe respiratie. Op een werkbepreking bracht VOSJAN het idee naar voren dat bij hogere D de snelheid van ijzer-opname geen gelijke tred meer zou kunnen houden met de voor anaerobe respiratie benodigde synthese van cytochromen, wegens concurrentie met de binding van ijzer door H_2S . In ieder geval kan het verschil tussen de waarden voor μ_{max} zoals verkregen met de batchcultuur: 0,60 en met de chemostaat: geëxtrapoleerd tot 0,40-0,45 verklaard worden uit het onderdrukken van de anaerobe respiratie.

De waarden voor eiwit-konzentratie en pyruvaat-konsumptie variëren aanzienlijk bij de verschillende experimenten. De resultaten wijzen op het bestaan van twee typen kulturen:

bij experimenten 3 en 4 is een vrij lage eiwit-konzentratie met een nogal geringe pyruvaat-konsumptie, hoge Y_{pyr} en lage waarde voor P/S gekorreleerd (Fig. 7 en 10). Dit alles in tegenstelling met de resultaten van experiment 5 (Fig. 8 en 11) en ook experimenten 1 en 2 (Tabel 1 en 2 en Fig. 6). Experimenten 3 en 4 betreffen dan kulturen die sterk op anaerobe respiratie zijn ingericht, waarbij een vrij vaste koppeling tussen sulfaat- en pyruvaat-opname bestaat, i.t.t. de kulturen van experimenten 1,2 en 5 welke ook ruimschoots fermenteren. Opvallend blijft wel de situatie bij experiment 6, waar bij een lage waarde van P/S toch geen hogere Y_{pyr} wordt gevonden dan bij experiment 5.

Samenvattend kan gesteld worden dat *Desulfovibrio* bij lage D een groter vermogen heeft de in het medium aanwezige pyruvaat op te nemen door inschakeling van fermentatie. Dat desondanks geen hogere eiwit-konsentratie wordt gevonden zou verklaard kunnen worden met de behoefte aan pyruvaat voor de onderhouds-energie. Bij een D van rond 0,1 tot 0,3 is sprake van een meer of minder uitgesproken anaerobe respiratie. Wordt D hoger dan heeft onderdrukking plaats van anaerobe respiratie, hetgeen verklaard moet worden met interactie van een dan optredende beperkende faktor en gepaard gaat met een geleidelijke afname van eiwit-konsentratie, pyruvaat- en sulfaat-konsumptie.

V. LITERATUUR

- Adam, H. 1962. In: Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse: 539. Weinheim.
- Fenchel, T. 1969. The ecology of marine microbenthos. Part IV. *Ophelia* 6: 1-182.
- Herbert, D., Elsworth, R., Telling, R.C. 1956. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14: 601-622.
- Kubitschek, H.E. 1970. Introduction to research with continuous cultures. Englewood Cliffs, N.J.
- Malek, I., Beran, K., Hospodka, J. 1964. Continuous cultivation of microorganisms. Proceedings of the Second Symposium held in Prague, June 18-23, 1962. New York.
- Postgate, J. 1965. Enrichment and isolation of sulphatereducing bacteria. In: Schlegel, H.G. Anreicherungskultur und Mutantenauslese. Göttingen.
- Schram, E. 1969. Bioluminescence assay of ATP. Precirculative essay to appear in: Proceedings of symposium on scintillation counting, Boston, 1969.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, E.A. 1970. The microbial world. Englewood Cliffs, N.J.
- Vosjan, J.H. 1970. ATP generation by electron transport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 36: 585 - 587.

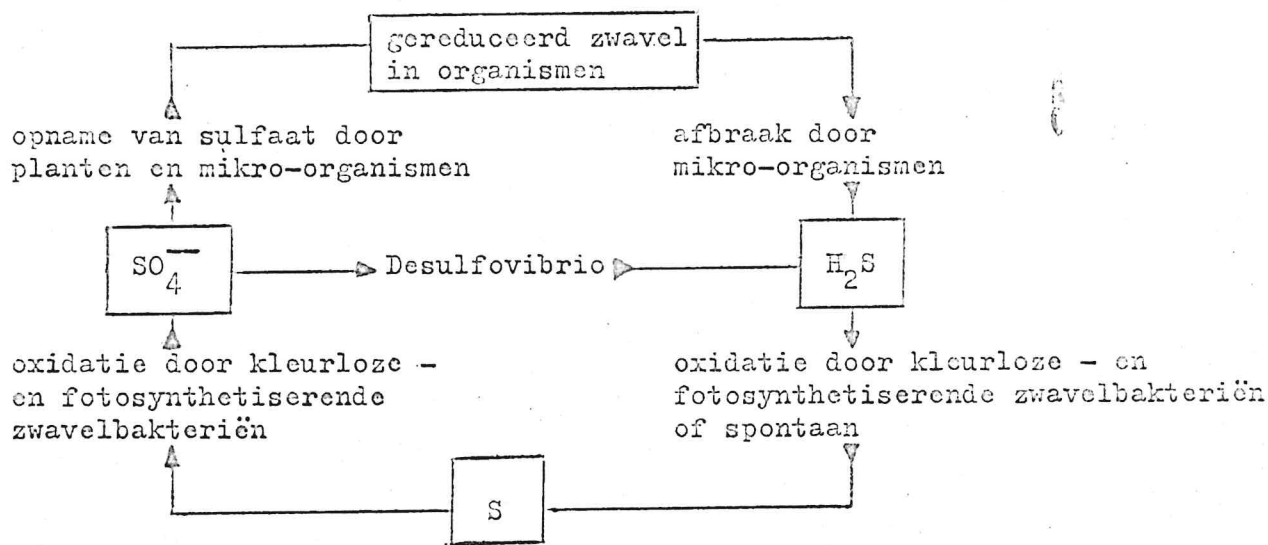


Fig. 1.

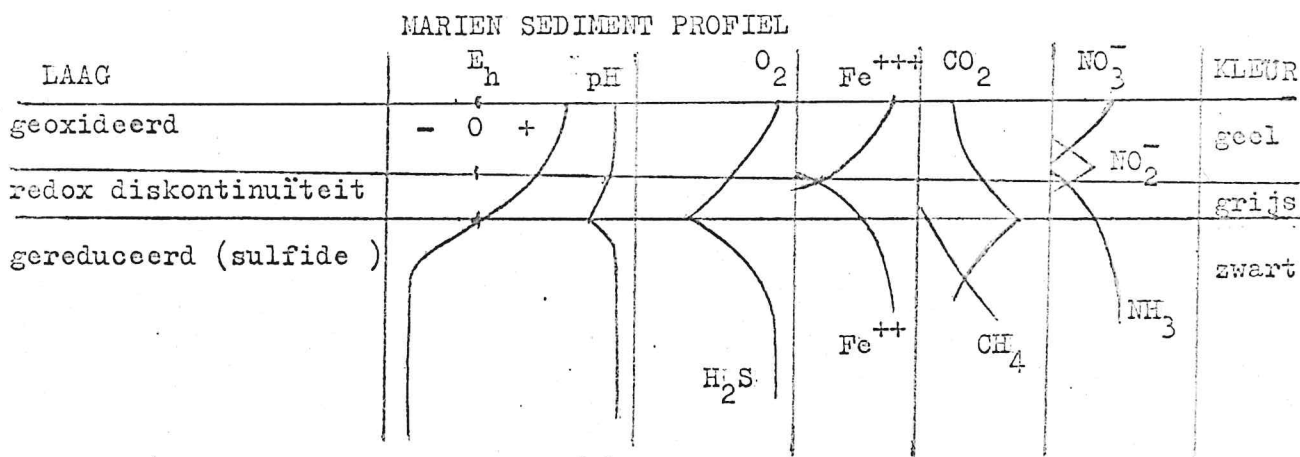


Fig. 2. (ontleend aan FENCHEL, 1969)

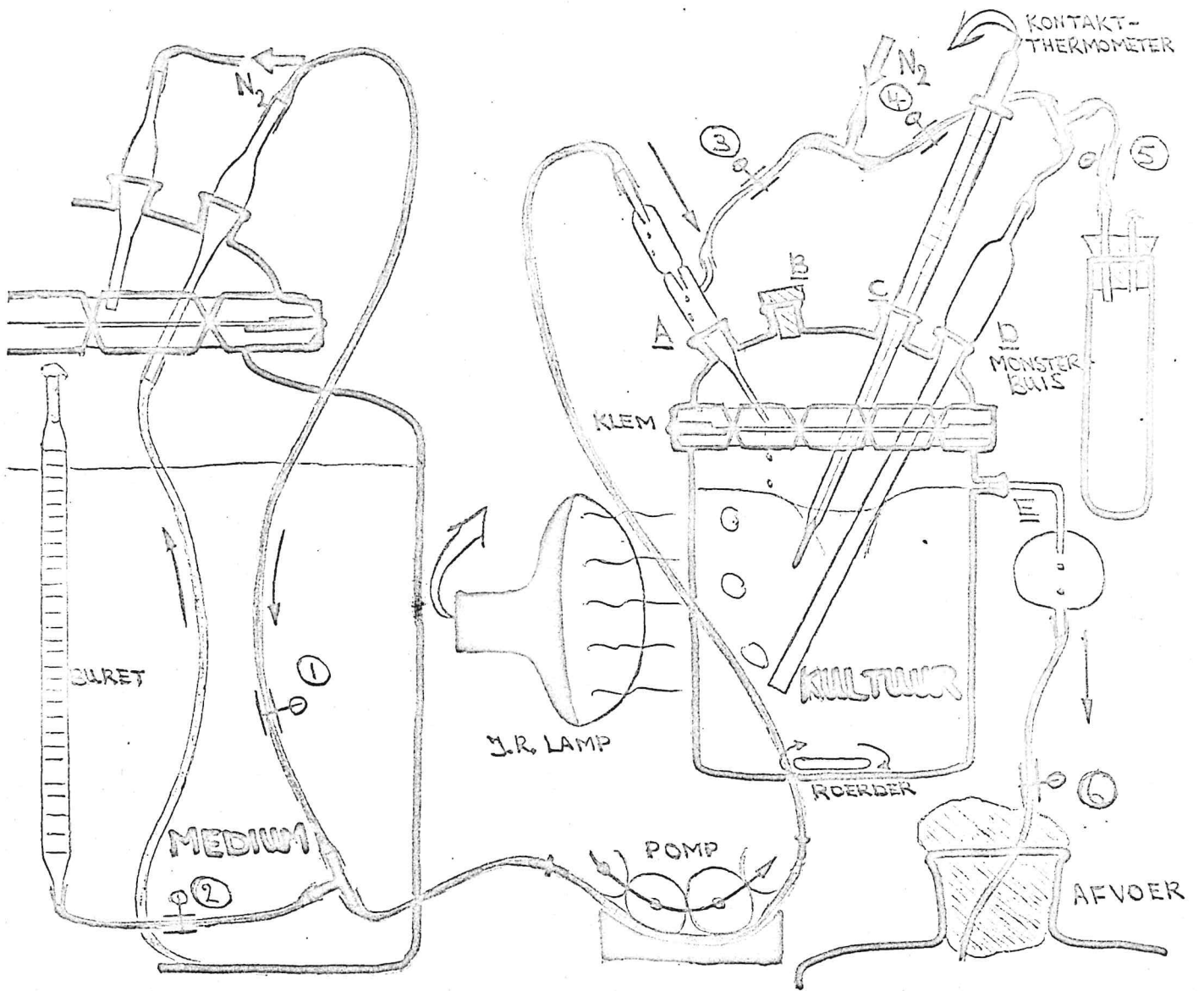


Fig. 3. De chemostaat. Zie p. 3.

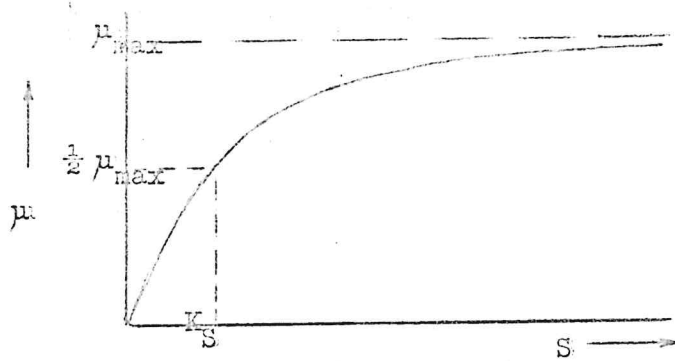


Fig. 4.

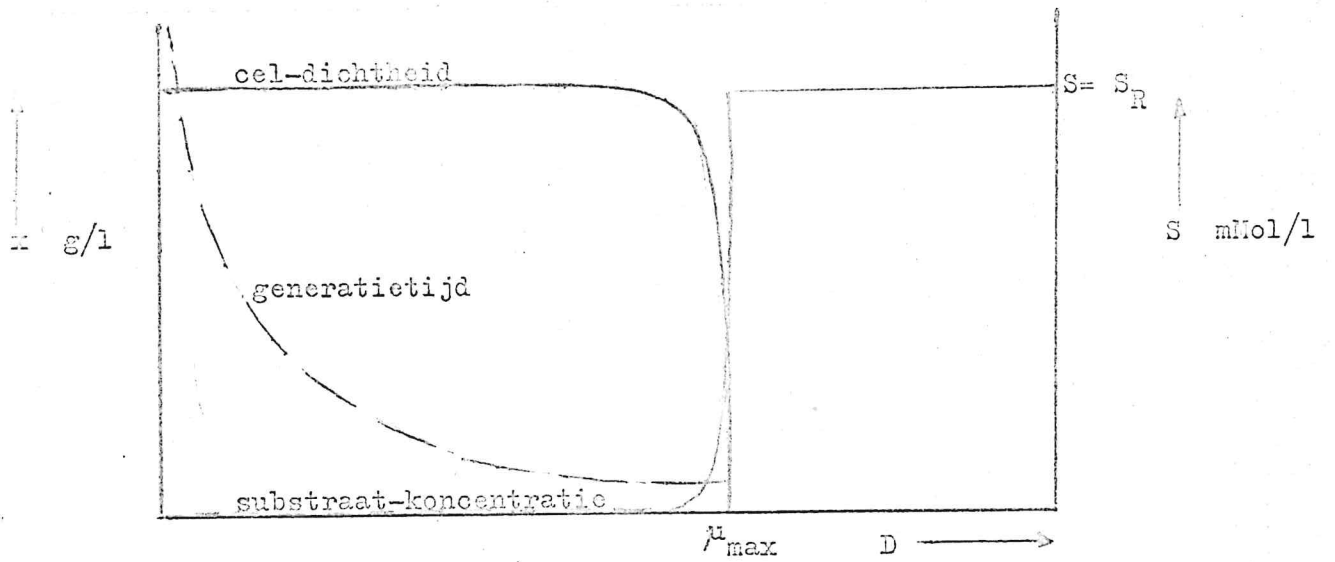


Fig. 5. (ontleend aan HERBERT ET AL., 1956.)

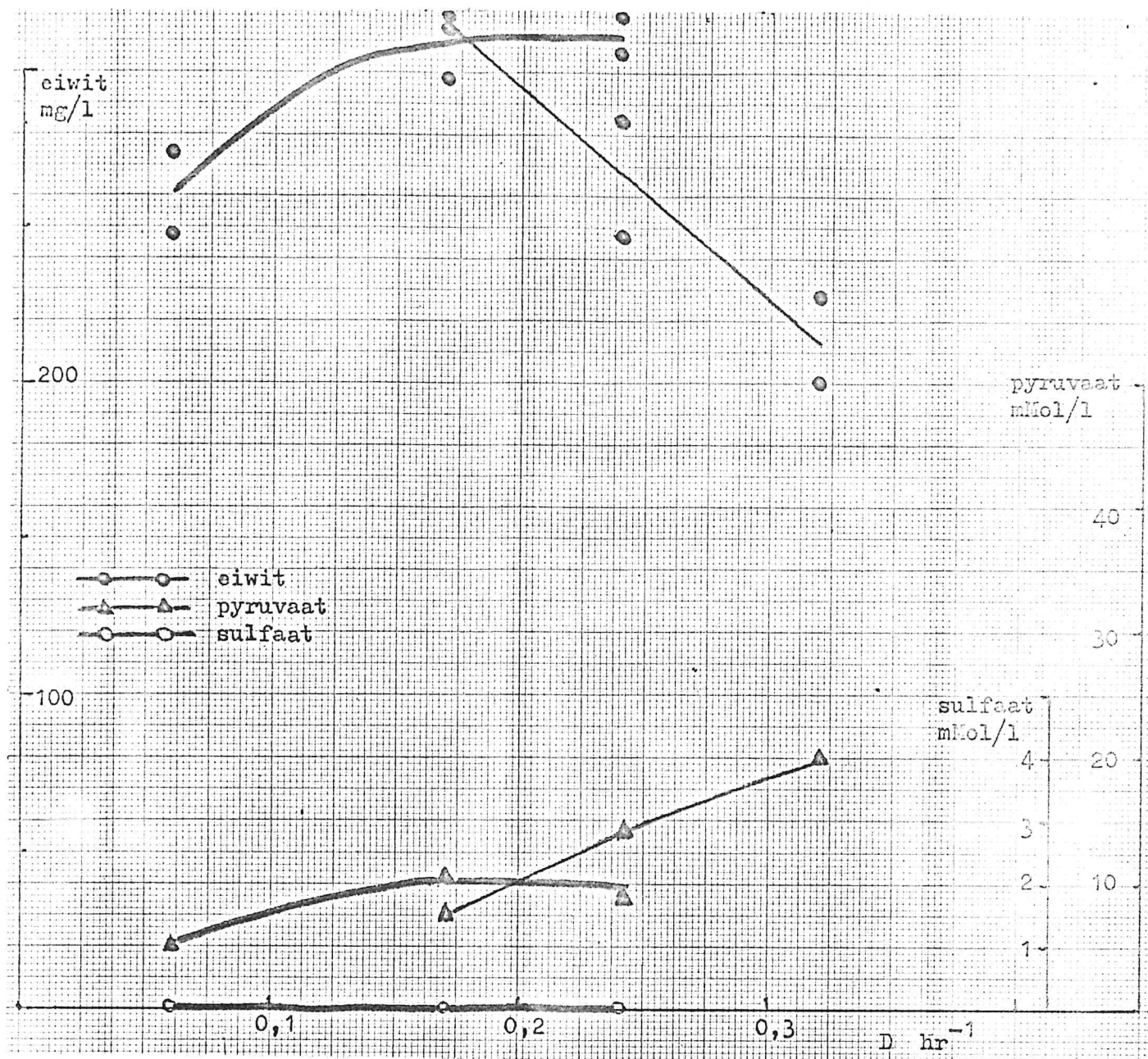


Fig. 6. Experimenten 1 en 2.

De gevonden waarden bij $D = 0,17$ van beide experimenten komen goed overeen. Boven deze D blijven de concentraties van eiwit en pyruvaat bij experiment 1 gelijk, maar nemen bij experiment 2 af resp. toe. Bij experiment 1 werd bij een lagere D een lagere eiwit-koncentratie gevonden.

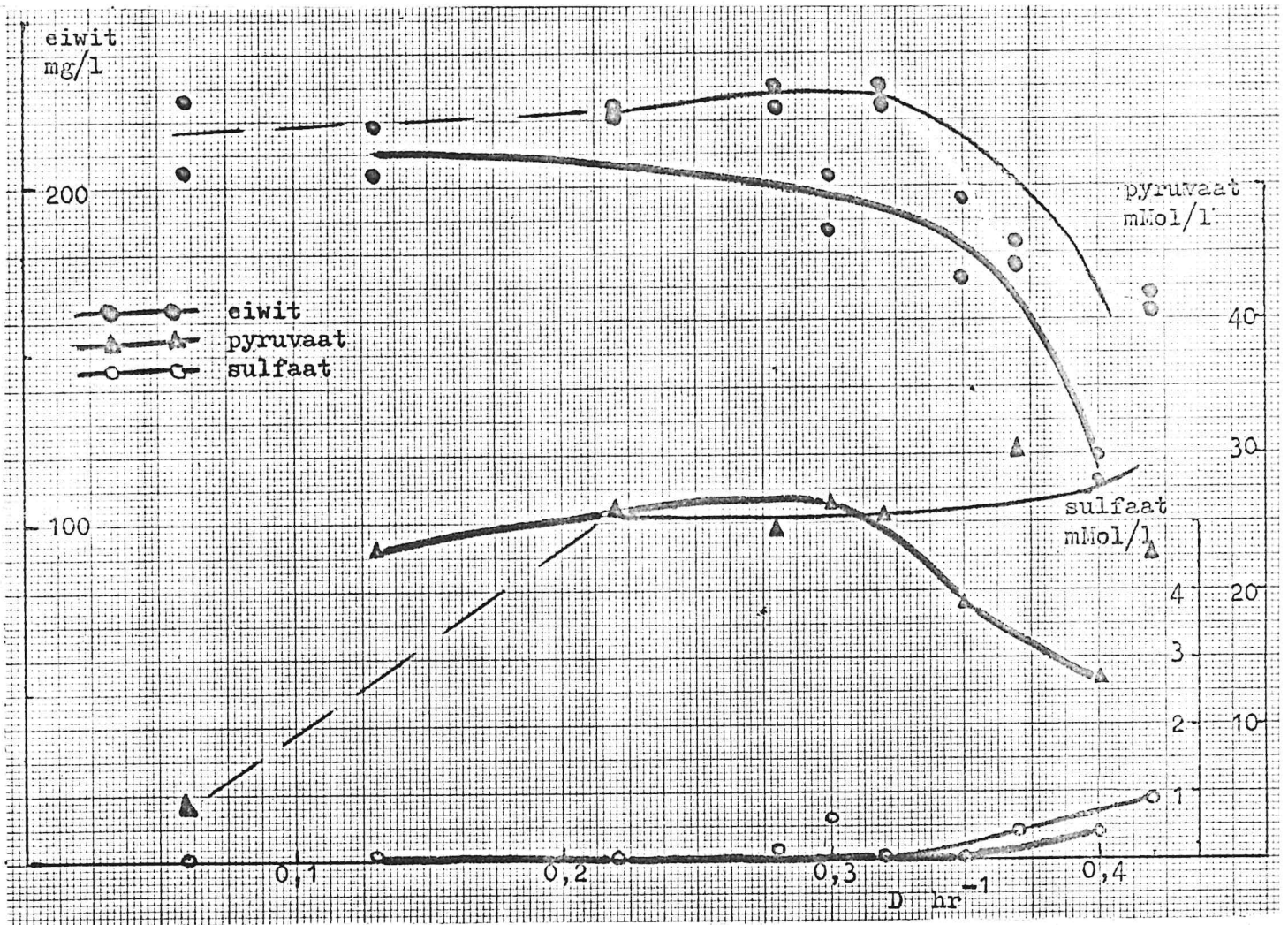


Fig. 7. Experimenten 3 en 4.

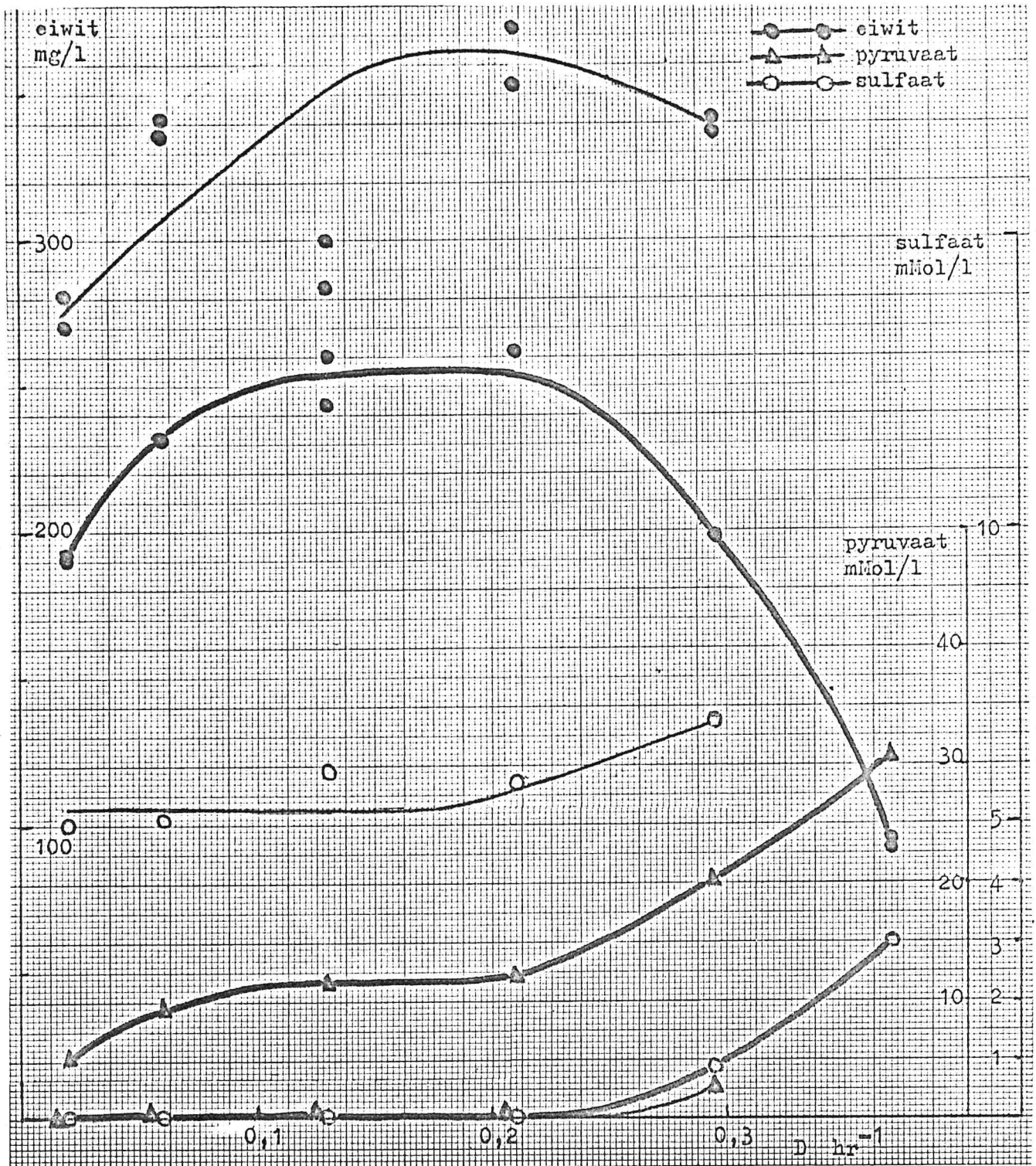


Fig. 8. Experimenten 5 en 6.

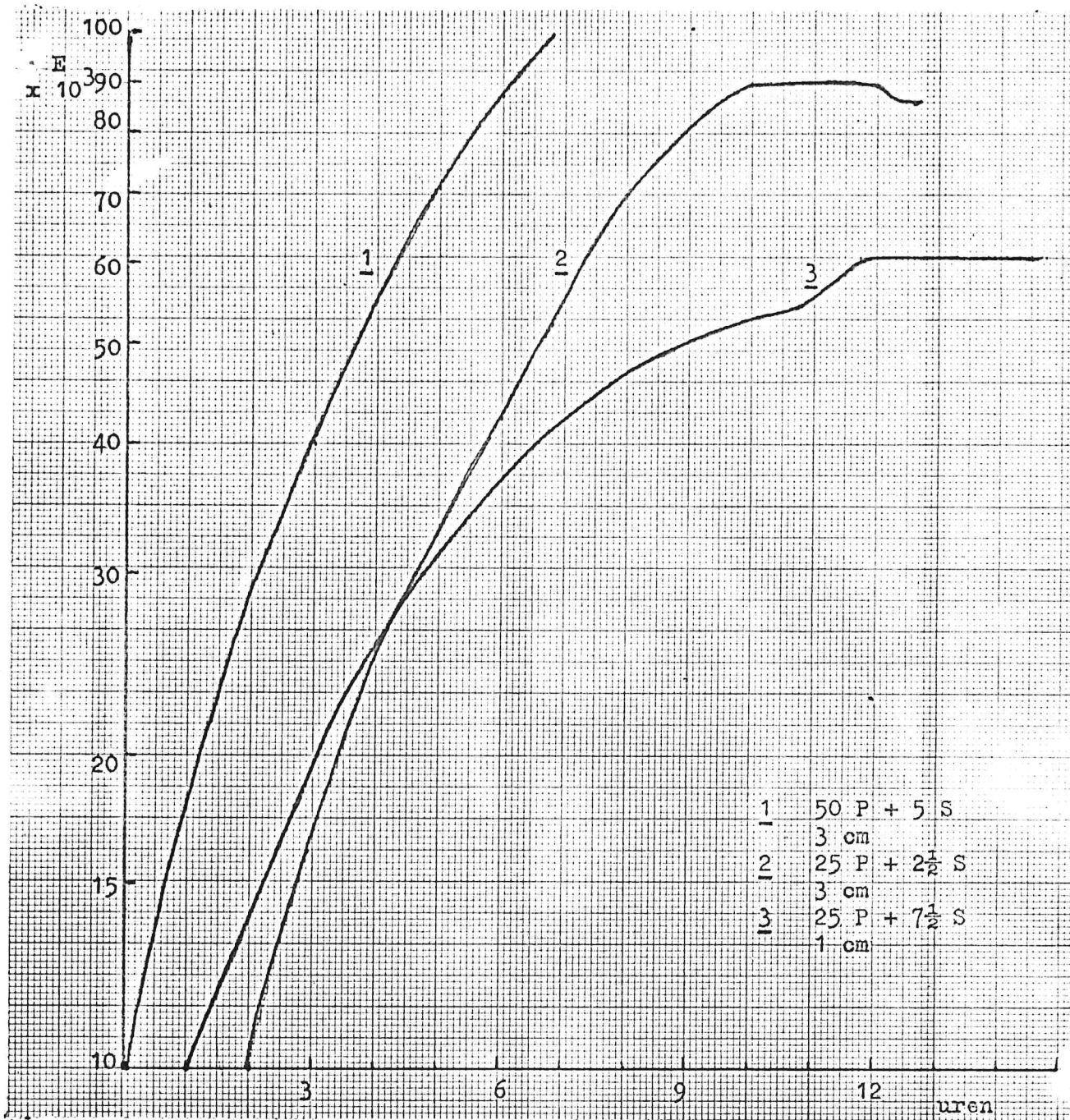


Fig. 9. De groei in batchkulturen.

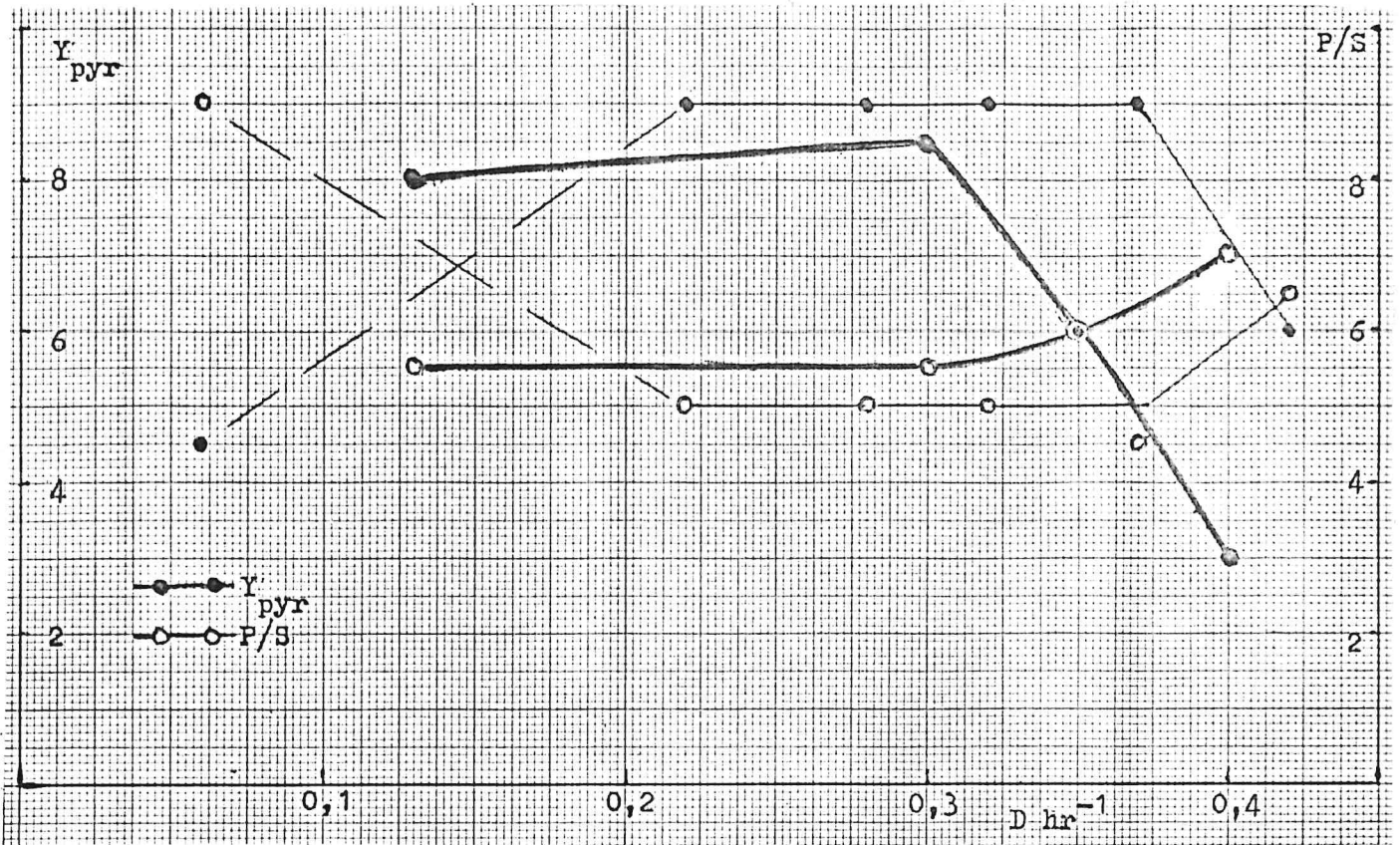


Fig. 10. Y_{pyr} en P/S van experimenten 3 en 4.

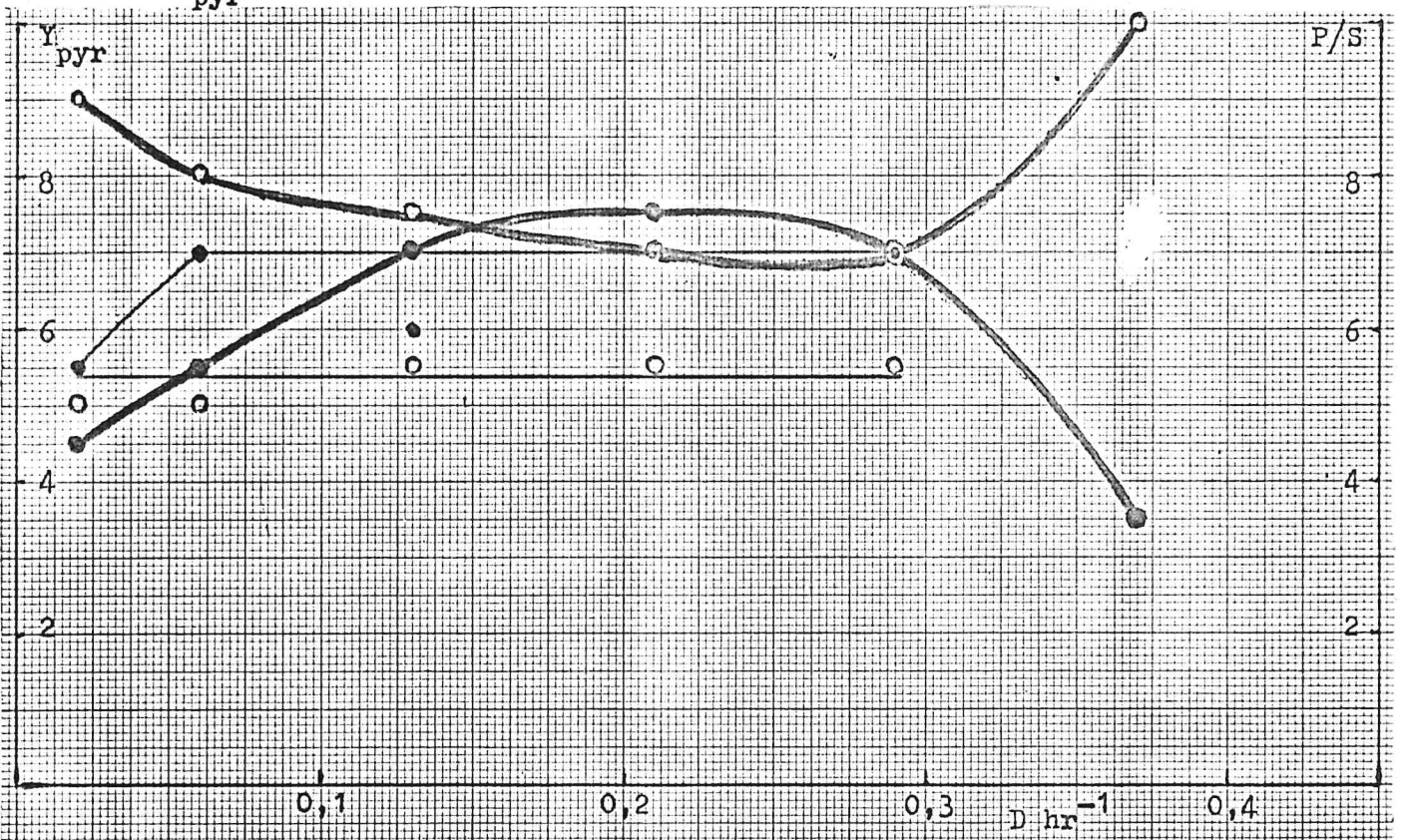


Fig. 11. Y_{pyr} en P/S van experimenten 5 en 6.