Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Reinkulturen uit één onder het mikroskoop geïsoleerde cel

https://hdl.handle.net/1874/254398

Utrecht
10 Juni 1901

REINKULTUREN UIT ÉÉN ONDER HET MIKROSKOOP GEÏSOLEERDE CEL.

S. L. SCHOUTEN.

A. qu.
192

Reinkulturen uit één onder het mikroskoop geïsoleerde cel.

Reinkulturen uit één onder het mikroskoop geïsoleerde cel.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

Doctor in de Plant- en Dierkunde,

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

Dr. W. KAPTEYN,

Hoogleeraar in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde,

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT,

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE

TE VERDEDIGEN

op Maandag 10 Juni 1901 des namiddags ten 1 ure,

DOOR

SAMUEL LEONARDUS SCHOUTEN,

geboren te ROTTERDAM.

UNIVERSITEITS BIBLIOTHEEK UTRECHT

UTRECHT. — F. WENTZEL & Co. — 1901.

Aan mijne Ouders en mijne Bruid.

Bij het einde van mijn studiejaren kan ik niet nalaten U, Hoogleeraren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn hartelijken dank te brengen voor het onderwijs dat ik van U mocht ontvangen.

De tijd, hooggeleerde HUBRECHT, *dien ik op het Zoölogisch Laboratorium doorbracht, zal bij mij steeds in dankbare herinnering blijven.*

U, hooggeachte RAUWENHOFF, *die sinds eenige jaren van Uw rust geniet, mag ik hier niet vergeten; ik ben U zeer erkentelijk voor de welwillendheid die ik, ook als assistent, van U heb mogen ondervinden.*

In 't bijzonder voel ik me echter gedrongen tot U, Hooggeachte Promotor WENT, *een woord van dank te richten. Zeer veel heb ik als assistent en ook daarna, geleerd door Uw methode van werken gade te slaan, en door Uw oordeel over het werk*

van anderen te vragen. De eischen, die een ernstig onderzoeker zich zelven moet stellen, de voorwaarden, waaraan degelijke wetenschappelijke arbeid moet voldoen en het verkeerde van een oppervlakkige werkmethode hebt Gij mij steeds voor oogen gehouden.

Daarvoor, alsook voor de raadgevingen die ik bij de samenstelling van dit proefschrift mocht ondervinden, zal ik U steeds dankbaar blijven.

Den heer PULLE, *assistent bij de Botanie, ben ik erkentelijk voor de hulp, mij verleend bij het verbeteren der drukproeven.*

INHOUD.

Pag.

Inleiding 1

Eerste Afdeeling. Technisch gedeelte.

Hoofdstuk I. Beschrijving van het isoleer-toestel 10

Hoofdstuk II. Het vervaardigen van de isoleer-naalden 15

Hoofdstuk III. Het isoleeren 37

Tweede Afdeeling. Toepassingen.

Hoofdstuk IV. Reinkultuur van Saprolegniaceeën 55

Hoofdstuk V. Proeven over Pleomorphie . 95

Hoofdstuk VI. Conclusie 114

INLEIDING.

Aan de plaatkultuur-methode van Koch is het te danken dat de studie der mikroörganismen, en speciaal de bakteriologie, in den laatsten tijd zulk een ontzettende vlucht heeft genomen. Toch is van veel mikroörganismen het maken van een reinkultuur nog een onopgelost vraagstuk. Veel onderzoekers zullen meenen, dat dit niet het gevolg kan zijn van een gebrek dat deze methode *in zich zelve* heeft, maar van het feit, dat de *juiste samenstelling van den voedingsbodem* in zulke gevallen nog onbekend is; zij meenen dat wanneer die gevonden is, het maken van een reinkultuur door middel van de plaatkultuur-methode ook per se gelukken zal.

Hoewel het verre van mij is, dat ik aan de geniale vinding van Koch ook maar het geringste zou willen afdoen, en ik ten volle hare belangrijkheid besef, geloof ik toch, dat bovengenoemde meening verkeerd is, dat m. a. w. de methode

op zich zelf de oorzaak is, dat zij tot hiertoe voor veel mikroörganismen zonder resultaat is beproefd.

Dit is b.v. het geval met verschillende grootere organismen, die in media voorkomen waarin zich tevens veel bakteriën bevinden, zooals Amoeben, Infusoriën, groote sporen van schimmels (b. v. van Saprolegniaceeën), sporen van Myxomyceten enz. Ik geloof, dat het mislukken van de reinkultuur van zulke organismen dikwijls hierin gelegen is, dat het zeer moeielijk is ze door schudden (de belangrijkste factor van de plaatkultuur-methode) te bevrijden van bakteriën, die er uitwendig op vastzitten; het gevolg is, dat er wel een kolonie ontstaat in de uitgegoten plaat, maar dat na korteren of langeren tijd zich de verontreinigingen door bakteriën vertoonen.

Ook kan het mogelijk zijn, dat de *chemische* eigenschappen van de gelatine als zoodanig schadelijk werken op de ontwikkeling. Dit is b. v. door WINOGRADSKY bewezen voor de nitriet- en nitraatvormende bakteriën in den bodem; deze kunnen de gelatine niet verdragen. 't Is volstrekt niet gewaagd te veronderstellen, dat dit met meer bakteriën, die men tot hiertoe niet rein heeft kunnen kweeken, het geval is.

Eindelijk kan misschien de *physische* natuur van

de gelatine, dus het feit dat zij een *vasten* voedingsbodem levert, de reden zijn van de negatieve resultaten die men tot hiertoe met sommige organismen heeft verkregen. Indien deze toch in de natuur alleen in vloeibare media voorkomen, en hun bouw (b.v. het bezit van cilien) en levensverrichtingen (b.v. snelle beweging) ook verraden dat zij voor die *vloeibare* media speciaal geschikt zijn, dan is het a priori niet te verwonderen dat er sommige zullen gevonden worden, die op een *vasten* voedingsbodem minder goed of in 't geheel niet kunnen groeien. Dit kan b.v., mèt de hierboven genoemde reden, de oorzaak zijn dat Amoeben en Myxomyceten, die in hun ontwikkeling een zwermstadium doorloopen, Infusoriën en vele bakteriën, die sterk bewegelijk zijn, nog niet rein konden gekweekt worden.

Doch, welke de redenen ook mogen zijn, een feit is het dat men van vele organismen op geenerlei wijze, en óók niet door middel van de plaatkultuur-methode, een reinkultuur heeft kunnen maken.

Het scheen mij daarom niet overbodig toe op het gebied van de reinkultuur-techniek eens een geheel nieuwen weg te beproeven, en te zien welke resultaten ik daardoor zou kunnen verkrijgen.

In 't kort komen die resultaten hierop neer dat men met behulp van fijne glazen naalden, welker beweging door middel van een bepaalde mechaniek volkomen geregeld is, uit een mengsel van verschillende mikroörganismen er één, welk men wil, kan isoleeren en overvoeren in een voedingsbodem. Daartoe brengt men van het materiaal, waaruit men een cel wil isoleeren, een druppel op een dekglas, en daarnaast, op eenigen afstand, een druppel van den voedingsbodem waarin de kultuur moet ontstaan. Dit dekglas wordt gelegd op een vochtige kamer, die zich op de objecttafel van het mikroskoop bevindt, en door welker zijwanden de genoemde naalden zóó gestoken zijn, dat men ze met de punt het dekglas kan doen aanraken. Door middel van die naalden kan men nu, met de sterkste vergrooting, één bakterie of een andere cel overvoeren uit den eenen druppel in den anderen. Daarna wordt het dekglas op een gewone vochtige kamer gelegd, die bij de vereischte temperatuur kan gezet worden. De groei van de kolonie kan, vanaf het eerste begin, dan ook met sterke vergrooting gevolgd worden.

Behalve voor het hierboven beschreven doel, het maken van reinkulturen in 't algemeen, kan

de nieuwe methode ook nog van nut zijn voor de oplossing van een ander vraagstuk. Ik bedoel dat van de variabiliteit en de pleomorphie. Ieder zal moeten toegeven dat op dit gebied nog veel *methodisch* moet gewerkt worden. Menigeen die een weinig dieper doordringt in de bakteriologie, en speciaal in de systematiek der bakteriën, zal tot de wanhopige conclusie komen, dat door het onmethodisch werken van vele onderzoekers in de laatste jaren, het materiaal als in een Augiasstal is opgestapeld. 't Is wenschelijk dat er eens een eind kome aan het dikwijls volkomen ongemotiveerd beschrijven van nieuwe soorten. Veel onderzoekers, die tegenwoordig op de een of andere plaats een bakterie aantreffen, gieten een plaatkultuur, kweeken de gevonden bakterie op enkele van de meest gebruikelijke voedingsbodems, en wachten af, of ze een gelijkenis kunnen ontdekken met een reeds bestaande species. Vinden ze die niet bij hun eerste pogingen, dan meenen ze der wetenschap een dienst te bewijzen door de »nieuwe soort«, begeleid van een diagnose die in veel opzichten duister is of voor 't grootste deel uit algemeene termen bestaat, de wereld in te zenden. Zij bekommeren er zich minder om, welken wijzigenden invloed de vroe-

gere levensomstandigheden op de gevonden bakterie kunnen gehad hebben, of welken invloed de voedingsbodems die ze zelf gebruiken, door hun afwijkende samenstelling, nog kunnen uitoefenen. En dit zijn, naast vele andere, toch factoren, die van groot belang zijn. Een gevolg is, dat vele soorten, die men eerst voor verschillende aanzag, naderhand dezelfde bleken te zijn, m. a. w. dat men met pleomorphe vormen had te doen gehad.

Aan den anderen kant weer tracht men sommige soorten, die men vroeger voor één geheel aanzag, te splitsen.

Hoe het zij, er heerscht, deels door de groote moeielijkheden, die het te bewerken materiaal zelfs voor de kundigste onderzoekers oplevert, deels door het slordig en vluchtig werken van anderen een ontzettende verwarring op het gebied van de bakteriologische systematiek. 't Is noodzakelijk, wil men aan die verwarring zooveel mogelijk paal en perk gaan stellen, dat er een grondige studie gemaakt worde van de variabiliteit en het pleomorphisme. En voor die studie is noodig een volkomen zekerheid dat men, bij het maken van een reinkultuur, van één cel is uitgegaan. Verder moet het mogelijk zijn om, indien men een bak-

terie zich laat deelen onder veranderde uitwendige omstandigheden, *iedere volgende generatie afzonderlijk* te kunnen onderzoeken, even goed als men bij hoogere planten alle opeenvolgende generaties op dit punt kan onderzoeken. Indien men b.v. wil nagaan welken wijzigenden invloed een zure voedingsvloeistof op een bepaalde bakterie a heeft, dan moet men in staat zijn om a zich in die zure vloeistof te laten deelen tot 2 cellen $a_1 + a_1$ en om de eene cel a_1 direkt te enten op een gewone voedingsbodem, de andere zich nogmaals te laten deelen tot $a_2 + a_2$. Daarna moet men weer de eene cel a_2 kunnen enten op denzelfden gewonen voedingsbodem, en de andere zich weer laten deelen tot $a_3 + a_3$, enz. Op die wijze krijgt men kulturen uit de opeenvolgende generaties a_1, a_2, a_3 enz., en kan men bestudeeren in hoeverre de gewijzigde vormen *langzamerhand* in elkaar overgaan, dan wel *sprongsgewijs* uit elkaar zijn ontstaan.

Natuurlijk moeten al deze proeven genomen worden onder de noodige voorzorgen, opdat de eens ontstane reinkultuur ook bij de opeenvolgende overentingen werkelijk rein blijve.

Door mijn spoedig vertrek naar Buitenzorg heb ik, behalve andere toepassingen van mijn

methode, óók die betreffende variabiliteit en pleomorphie moeten afbreken. Ik hoop ze echter later voort te zetten, vooral omdat ik meen dat mijn methode in veel opzichten zeer geschikt is voor een dergelijke bestudeering van die kwesties.

Dat die methode zelf geen verbeteringen meer behoeft, stel ik mij niet voor; ongetwijfeld zal het, vooral ook als andere onderzoekers haar beproeven, noodig blijken hier en daar wijzigingen in te voeren.

Nog minder stel ik mij voor, dat zij een middel zal zijn, waarmede alle mogelijke reinkulturen kunnen gemaakt worden, en dat zij de reeds bestaande methode van reinkultuur, de in vele opzichten voortreffelijke plaatkultuur-methode, geheel zal verdringen. 't Doel is, dat ze zal beproefd worden als langs een anderen, meer eenvoudigen weg, geen uitkomsten kunnen worden verkregen.

Laat mij ten slotte nog mededeelen, dat de grondleggers van de mykologie (DE BARY, BREFELD e. a.) hun kultüren van schimmels nooit anders gemaakt hebben dan door uit te gaan van één cel in een hangenden druppel. Hun methode was deze, dat ze een massa sporen of conidiën in een gesteriliseerde vloeistof verdeelden, waarna

ze op verschillende dekglaasjes een menigte hangende druppels aanbrachten en zóó lang zochten tot ze een druppel vonden waarin één spore of conidie voorkwam. De kultuurvloeistoffen werden een weinig zuur genomen, om bakteriën-ontwikkeling tegen te gaan. Voor morphologische studiën zijn dergelijke kulturen uitstekend geschikt; voor uitgangspunt van physiologische onderzoekingen echter niet, want de reinheid is volstrekt niet gewaarborgd.

Hun methode is echter niet bruikbaar voor kleinere cellen, en natuurlijk in 't geheel niet voor bakteriën.

Eerste afdeeling. Technisch gedeelte.

HOOFDSTUK I.

Beschrijving van het isoleertoestel.

In fig. 1 is een schematische voorstelling gegeven van het instrument dat voor de isolatie dient. De teekening stelt voor een vertikale doorsnede midden door het toestel, op de helft van de ware grootte.

A is een ijzeren plaat, die op vier pooten (in de fig. niet weergegeven) rust. Het mikroskoop is door middel van een ijzeren beugel bevestigd op een vierkante koperen plaat B, die weer op een toestel met schuifbeweging C rust. Door aan den schroef D te draaien kan men het mikroskoop met B naar links of rechts bewegen; door middel van een andere schroef, die in de fig. niet is geteekend, voor- of achterwaarts.

Van het mikroskoop is geteekend de voorwerptafel F, het verlichtingstoestel van Abbe G,

het irisdiaphragma H, de spiegel I, de voet J, en een objectief K. Op de voorwerptafel bevindt zich een vochtige kamer, de„isoleerkamer" L, die van een bijzondere constructie is. De linker- en rechterzijwand nl. zijn ieder voorzien van een horizontale spleet, die met een dikke olie kan worden afgesloten.

Door die spleten steken twee glazen naalden M, waarvan de vorm en de vervaardiging in het volgende hoofdstuk zullen worden beschreven. De glazen stukken L^1, die zich aan de bovenzijde van de spleten bevinden, kunnen worden weggenomen, wanneer men de naalden wil verwijderen of weer op hun plaats brengen. Wanneer men ze tot dat doel iedere keer *door* de spleet moest steken, zou men veel gevaar loopen de fijne punten, waarop alles aankomt, te breken.

Op de vochtige kamer, die met behulp van een bewegelijke object-tafel (ik gebruik die van Leitz) verschoven kan worden, brengt men het dekglas, aan welks onderzijde geïsoleerd zal worden.

De naalden zijn ieder bevestigd in 2 houders N, die zich bevinden op een koperen staaf O, die draaibaar is om een punt P. Aan het uiteinde van de staaf bevindt zich een rond koperen plaatje Q, waarmee zij rust op een vertikale

staaf R. R bevat van onderen een schroefdraad, en kan door middel van het rondsel S in de kolom T op en neer geschroefd worden. Een spiraalveertje W houdt O altijd tegen R aangedrukt.

't Is duidelijk dat wanneer R bovenwaarts geschroefd wordt, de punt van M in de vochtige kamer benedenwaarts zal gaan, en omgekeerd. De schroefdraad in R is betrekkelijk fijn, en de hefboomsarm P Q ongeveer 2 maal zoo lang als de afstand van P tot de punt van de glazen naald; men kan dus zeer geringe verplaatsingen teweeg brengen. Het draaipunt P wordt gedragen door een gebogen koperen stang V, die aan T is bevestigd.

De as bij P is zóó gemaakt dat men, als het glazen stukje L^1 is verwijderd en de spiraalveer U is losgemaakt, de staaf O met de glazen naald gemakkelijk van het toestel kan losmaken.

Het geheel is verder zóó ingericht dat de grootste mikroskopen (b.v. Zeiss statief I a, Leitz statief I) èn ook de meest gangbare kleinere statieven er bij gebruikt kunnen worden. Daartoe kan men C met de tafel B hooger en lager zetten door middel van 2 schroeven E. De afstand tusschen de steunpunten P is zóó gemaakt dat de objecttafels van de grootste statieven, en dus

van zelf ook die der kleinere, er tusschen passen.

De glazen naalden worden tegen stooten enz. beveiligd, door zinken kappen, die er over heen geplaatst en aan de dragers V bevestigd worden. Met opzet is er aan beide kanten tusschen V en het mikroskoop een groote ruimte open gelaten, waardoor men de handen kan steken als dit voor de verplaatsing van spiegel of irisdiaphragma noodig is.[1])

Met dit toestel is men dus in staat zeer fijne bewegingen onder het mikroskoop te maken, zoowel bij zwakke als bij de sterkste vergrooting. Tot nog toe zijn de toepassingen beperkt alleen tot het *isoleeren* van mikroörganismen. Ik ben er echter zeker van dat men er velerlei andere werkzaamheden mee zal kunnen verrichten of gemakkelijker maken, b.v. het sorteeren van fijn plankton-materiaal, het vervaardigen van duur-

---

[1]) Het hier beschreven instrument is op voortreffelijke wijze vervaardigd door den heer J.W. DE GROOT, amanuensis aan het Laboratorium voor anorganische scheikunde te Utrecht.

Mocht mijn methode ruimeren ingang vinden, dan zullen de volgende toestellen een aanmerkelijke vereenvoudiging ondergaan, vooral wat betreft de wijze waarop het mikroskoop wordt verplaatst. Tevens zal er dan een vaste prijs kunnen worden gesteld.

zame praeparaten van dergelijke mikroörganismen, enz. Ik mag ten minste, waar de moeielijkste experimenten (het isoleeren van bakterien) naar wensch geslaagd zijn, verwachten dat ook gemakkelijker toepassingen niet zullen mislukken.

Toen ik mijn methode al geheel had uitgewerkt en ik er reeds vele proeven mede had gedaan, bemerkte ik uit de historische aanteekeningen die Apathy geeft in zijn: „Die Mikrotechnik der thierischen Morphologie" dl I (Braunschweig. Bruhn 1896), dat er in vroeger jaren al reeds vele pogingen waren gedaan om een geschikte methode te vinden waarmede men kleine organismen (Diatomeeën, kleine Crustaceeën enz.) onder het mikroskoop zou kunnen verplaatsen of isoleeren.

Geen van die methoden heeft echter aan de verwachtingen beantwoord, omdat het gebruik groote moeielijkheden opleverde, en alleen bij zeer zwakke vergrooting kon plaats vinden.

Voor de curiositeit vermeld ik alleen dat de beste van die inrichtingen door HANKS in 1877 is geconstrueerd. Zij bestond uit een stuk van een borstelhaar, waarvan de punt in het midden van het gezichtsveld uitkwam. Door horizontale bewegingen van de objecttafel werden de voorwerpen verplaatst in horizontale richting, door een op en neer bewegen van het verlichtingsapparaat in vertikale richting. Men kon een organisme isoleeren door het aan de natte punt van het haar te doen vastkleven en het, wanneer het haar droog was geworden, op te vangen op een glaasje.

HOOFDSTUK II.

Het vervaardigen van de isoleernaalden.

Het is mij niet spoedig gelukt den meest bruikbaren vorm der glazen naalden vast te stellen, en de methode voor de vervaardiging te vinden; er waren verschillende technische moeielijkheden, die zich hierbij voordeden.

En nog zou ik niet durven beweren dat de verschillende vormen die ik thans gebruik, voor geene verbetering vatbaar zijn. Integendeel, ik ben er van overtuigd dat bij een uitgebreider gebruik van de methode, sommige veranderingen nog wenschelijk zullen blijken.

Voor het isoleeren van de verschillende organismen worden 3 soorten van naalden gebruikt. Voor de kleinste mikro-organismen (b.v. staaf- en kommavormige en ronde bakterien) gebruikt men eenvoudig rechte, puntig-uitloopende naalden (fig. 12) die $\pm$ 10 μ dik zijn; voor mikro-organismen van middelmatige grootte (b.v. *zeer kleine* spo-

ren, conidien of gistcellen) een dun gesloten oog (fig. 13), dat uitwendig een doorsnede heeft van ± 35 μ., terwijl de dikte van den draad ± 4 μ is; voor de grootste mikro-organismen (b.v. Myxomyceten, eencellige Algen, zwermsporen van Algen en Schimmels, *gewone* sporen en conidien, Gistcellen, Amoeben, Infusorien) worden omgebogen, dikke haken (fig. 14) gebruikt, die, uitwendig gemeten, ± 160 μ. wijd zijn, terwijl de dikte van den draad ± 28 μ. is.

Ik zal er thans toe overgaan de methode van de vervaardiging, die voor de 3 soorten verschillend is, te beschrijven. Deze beschrijving zal met eenige nauwkeurigheid moeten geschieden, hoewel ik er van overtuigd ben dat ze, vooral voor lezers die voor technische kwesties weinig voorliefde gevoelen, weinig aantrekkelijks bevat. Een vluchtige uiteenzetting zou het doel missen dat ik mij voorstel: het mogelijk te maken dat ieder, die het wil, de naald zelf zal kunnen vervaardigen of laten vervaardigen.

Men gebruikt *nieuwe* glazen staven, ter dikte van ± 3 mm. *Oud* glas, hetwelk men o.a. hieraan kan herkennen dat het in de gasvlam een wit, gescheurd voorkomen verkrijgt, is onbruikbaar. Het vervaardigen van de rechte naalden

voor de kleinste mikro-organismen is het eenvoudigst. Men neemt een stuk van ± 20 cm. lengte, houdt het op een afstand van ± 5 cm. van het uiteinde in de vlam van een Bunsenschen brander en trekt het daarna uit. Men mag hierbij niet zóó sterk verhitten dat het glas te slap is, en ook niet te snel uittrekken. In dat geval zou het uitgetrokken gedeelte, dat op zijn dunste plaats maar één mM dik mag zijn, te dun worden. Men krijgt dus een staaf ongeveer van den vorm van fig. 15. Men trekt nu boven de ± 2 mm. hooge vlam van een mikrobrander deze staaf uit op de plaats α, die ongeveer 6 cm. van het dikke gedeelte verwijderd is. Wanneer men dit plekje ook al weer niet te sterk verhit en niet te snel uittrekt, verkrijgt men een gedeelte dat nog geen halve mm. dik, en b.v. 5 mm. lang is (fig. 16). Nu draait men de vlam van den mikrobrander zoo laag mogelijk, zóó dat ze b.v. eene doorsnede heeft van 1—1½ mm. (de opening van den mikrobrander moet hiervoor natuurlijk zeer klein zijn), en trekt men boven dat vlammetje de glasstaaf op de plaats waar ze ½ mm. dik is, in tweeën. Wanneer men hierbij niet te lang verhit en met eenige kracht trekt, zal men niet een lang, draadvormig uiteinde krijgen,

maar een plotseling fijn-toeloopende punt, zooals in fig. 17 vergroot is voorgesteld.

Door eenige oefening is dit resultaat spoedig te verkrijgen. Men controleert gedurig onder het mikroskoop met zwakke vergrooting of de punt den gewenschten vorm heeft (v.r.nl. of ze wel scherp uitloopt), en ook of het uiteinde vlak bij de punt de juiste dikte heeft, die ± 10 μ. moet bedragen. Iedere keer dat dit niet het geval blijkt te zijn, smelt men boven den mikrobrander de uiteinden aan elkaar, en trekt dan weer uit.

De naald is echter, wanneer zij van het begin tot het eind rechtlijnig is, nog niet volkomen bruikbaar. Het uiteinde ter lengte van ongeveer 3 mm., dat in de isoleerkamer steekt, moet iets naar boven loopen (fig. 1). Wanneer men dit uiteinde boven een mikrobrander omboog, zou het kunnen gebeuren, zelfs al was de vlam zoo laag mogelijk, dat de scherpe punt wegsmolt. Daarom wordt dit gedeelte omgebogen onder het miskroskoop, door middel van een platinadraad die men laat gloeien, op een wijze die zoo aanstonds (pag. 33) zal behandeld worden, als het daarvoor benoodigde toestel, waarmede de andere naalden gemaakt worden, beschreven is.

Is het vervaardigen van dit soort naalden uit den aard der zaak gemakkelijk, de andere leveren meer moeielijkheden op.

Terwijl gewone bakterien in een zeer klein druppeltje kunnen worden overgevoerd, en het zelfs wenschelijk is dat dit druppeltje zoo klein mogelijk zij, moeten draadvormige bakterien en andere grootere mikro-organismen in grootere druppels worden vervoerd. Beproeft men dit in druppels die te klein zijn, dan gaat de cel gedurig tegen het dekglas vastzitten en blijft ze dus achter. Men kan de cel dan wel met de naald weer losmaken, maar een eind verder herhaalt zich het bezwaar en bovendien — een te sterke directe aanraking met de naald is, vooral bij dunwandige cellen, altijd nadeelig.

In 't algemeen moet een mikro-organisme dat men wil isoleeren, door het druppeltje, waarin het vervoerd wordt, a. h. w. geheel omhuld zijn, maar daarom heeft men voor grootere cellen ook grootere druppels noodig.

Nu zou men meenen dat men met eenvoudige rechte naalden van den vorm als in fig. 12, indien men ze maar dikker maakte, zijn doel zou kunnen bereiken. Dit is echter niet zoo. De druppel die men met dikkere rechte naalden

verkrijgt, is wel grooter, maar de dikte van de naald zou, vooral bij het werken met de sterke vergrootingen, hinderlijk worden, inzonderheid als men druppels wilde verkrijgen die groot genoeg zijn voor de grootste cellen.

Men moet daarom aan de naalden een vorm geven zóó, dat de waarneming er niet door gehinderd wordt, en ze toch in staat zijn om grootere druppels te vervoeren. Zulk een vorm vinden we afgebeeld in fig. 13 en 14.

Maar nog om een andere reden is deze vorm noodig. Grootere cellen worden, omdat in een grooten transportdruppel zoo licht bakterien meegaan, altijd eerst gevoerd door een reinigingsdruppel, waar men ze bij voorkeur dwars doorheen haalt. Dit zou haast niet mogelijk zijn met een rechte naald; wèl kan dit met een haak- of oogvormige gebeuren, omdat men daarmede een cel in een grooten druppel gemakkelijk kan voortduwen of meetrekken. Een directe aanraking van een cel is in zulke omstandigheden niet gevaarlijk, indien deze maar niet tegen het glas vast zit.

Het vervaardigen van haak- en oogvormige naalden, zóó klein, dat ze bij sterke vergrooting gebruikt kunnen worden, kan natuurlijk niet uit

de vrije hand en met ongewapend oog geschieden. Daarvoor is een inrichting noodig, waarvan hier de beschrijving volgt. (Zie fig. 18).

De figuur, die schematisch is, stelt het geheel voor, van boven gezien.

Het microscoop rust op een tafel, en de tubus A is 90° achterwaarts gedraaid, zoodat ze dus horizontaal staat. B is een zwak objectief (b.v. Leitz 3). C zijn de schroeven voor de verplaatsing van de tubus; de mikrometerschroef is in de fig. niet te zien. D is de voorwerptafel. Vóór het mikrometer-oculair bevindt zich een blauw glaasje E, dat door middel van een ronde veer F aan de tubus is bevestigd. De verlichtingslens van Abbe is verwijderd, en het irisdiaphragma G is met den spiegel H zooyer mogelijk van de voorwerptafel verwijderd. Door het gat in de objecttafel steken 2 stalen naalden I en K, die beide knievormig zijn gebogen en resp. in de houders L en M zijn geschroefd. Deze houders zijn door middel van veeren om den rand van de voorwerptafel geklemd, en kunnen langs dien rand met de vingers verplaatst worden. N is een gebogen platina-draadje, dat in een houder O is bevestigd. P is de glazen naald die bewerkt moet worden, en die in een houder Q is vast-

gemaakt. De houders O en Q zijn beide aan een voetstuk bevestigd, waarin ze door een schroefbeweging vertikaal op en neer kunnen bewogen worden. Die voetstukken zelf staan ieder met drie puntige pooten op een glazen plaat, die gewoon op de tafel ligt, en kunnen dus gemakkelijk in horizontale richting verschoven worden. Men kan derhalve de stalen naalden I en K, de platina-draad N en de glazen naald P in het gezichtsveld van het mikroskoop brengen, en op alle mogelijke manieren ten opzichte van elkaar bewegen.

Bij den houder Q behoort bovendien een los, knievormig gebogen stuk R, aan welks eene uiteinde een klem S is bevestigd. Men kan dit stuk met het ondereinde R^1 klemmen in den houder Q zóó, dat de klem S zich bevindt boven de uiteinden van de naalden I en K. Men kan dan in de klem S de glazen naald, die in bewerking is, bevestigen zoodat men die *vertikaal* in het gezichtsveld ziet. Als men de glazen naald direct in den houder Q klemt, ziet men haar *horizontaal* in het gezichtsveld.

De draad N staat door middel van een draadgeleiding (waarvan een klein deel in de fig. door stippellijnen is aangegeven) in verbinding met

een accumulator. In de geleiding zijn geschakeld een weerstandsbank (voor kleine weerstanden) en een stroomverbreker (een koperen beugel, die gemakkelijk draaibaar is en met beide uiteinden in kwik kan gedompeld worden.) Het geheel staat, zooals reeds gezegd is, op een tafel, en wel dicht bij den rand. Men zit op een laag bankje, en zorgt er voor, dat men den stoomverbreker zeer gemakkelijk met de linkerhand, die daarbij op de tafel rust, kan gebruiken.

Met deze inrichting is men in staat de oog- en haakvormige naalden te maken.

Om een oogvormige te vervaardigen, gaat men weer uit van een glasstaaf zooals men die voor de rechte naald (zie boven) noodig had. Men verwerkt die staaf op dezelfde wijze, totdat ze den vorm van fig. 16 heeft. Nu trekt men het gedeelte, dat ± ½ m.m. dik is, echter zoo uit dat er een ± 10 m.m. lang zeer fijn, draadvormig einde aan komt, zóó fijn, dat het in de lucht heen en weer gaat (fig. 19). Dit uiteinde houdt men ongeveer bij α boven de vlam van den mikrobrander, die men zoo laag mogelijk heeft gedraaid; het wordt, omdat het zoo dun is, naar *boven* toe omgebogen. Deze ombuiging mag niet te sterk zijn; de hoek dien het omgebogen deel

met de staaf maakt, mag niet minder dan $= 150^0$ bedragen. (fig. 20). Nu wordt de staaf bij β weer omgebogen, zoodat men fig. 21 krijgt. Bij dit ombuigen zorge men er voor, dat het rechte deel van de glazen staaf met de omgebogen gedeelten in één vlak ligt. Daarna zet men de glazen staaf in den houder Q zóó dat het dunne uiteinde in het gezichtsveld komt, en de geheele staaf, met de bochten die men er in gemaakt heeft, in één horizontaal vlak komt te liggen. Het dunne uiteinde moet naar het objectief toegekeerd zijn en *niet* naar de objecttafel (fig. 18). Men brengt nu de naald I, de platina-draad N en het uiteinde van de glazen staaf in het gezichtsveld van het mikroskoop, zoodat men ziet hetgeen in fig. 22 is voorgesteld. I^1 is de punt van de stalen naald I, waartegen het uiteinde van de glazen staaf is aangedrukt. In het gezichtsveld bevindt I^1 zich onder die glasdraad, in werkelijkheid natuurlijk er boven. 't Is wenschelijk dat men het mikroskoop instelt op een deel van de stalen naald dat zich zeer dicht bij de punt bevindt, en dat dus niet zoo dik is; anders toch heeft I^1 te groote afmetingen, iets wat de duidelijkheid van het beeld onnoodig zou verminderen. N^1 is de platina-draad, van welks ronden vorm

men natuurlijk maar een klein gedeelte ziet. Men zorgt er voor dat de glasdraad precies boven het midden van de bocht van de platina-draad zich bevindt; van boven gezien dus zooals in fig. 18. Het deel van de glasdraad, dat zich in het midden tusschen I^1 en N^1 bevindt, moet ongeveer vier μ dik zijn.

Men heeft van te voren in de electrische stroomgeleiding zóóveel weerstand ingevoegd dat de platina-draad N^1 die 0,25 mm. dik is, kan gloeien zonder dat hij smelt.

Nu doet men N^1 plotseling een zeer kort moment gloeien. Het gevolg is dat de glasdraad ombuigt ongeveer op de plaats waar hij vier μ dik is, en wel met een vrij scherpe bocht (fig. 23) Thans blijkt tegelijk het nut van de stalen naald I^1 Deze dient nl. om de warmte van den glasdraad weg te voeren en dus om te verhinderen dat die op een plek meer naar links in het gezichts-veld zou ombuigen, een plaats die dikker zou zijn dan vier μ Bovendien zou de glasdraad, zonder dat de stalen naald er tegen aan was ge-drukt, niet in een scherpe, maar in een groote bocht ombuigen, zooals bijv. in fig. 24.

Men schroeft daarna den houder Q voorzichtig naar boven; het dikkere deel van den glasdraad

zal dus in het gezichtsveld naar beneden gaan. Natuurlijk mag men dit niet te ver doen, daar anders de elasticiteitsgrens wordt overschreden N^1 wordt verplaatst tot vlak boven de scherpe bocht in den glasdraad. Men krijgt dus fig. 25. Nu gloeit men weer even, waardoor men krijgt fig. 26. Men schroeft den houder weer naar beneden; het dikkere gedeelte van den glasdraad krijgt dus weer zijn rechten vorm, fig. 27.

Het gebeurt zelden dat het omgebogen deel bc *volkomen* in hetzelfde vertikale vlak terecht komt als ab; meestal buigt bc een weinig hetzij naar den eenen, hetzij naar den anderen kant van dat vlak. Als dit maar weinig scheelt, is het geen reden om de glazen naald af te keuren en een nieuwe te beginnen; wel moet men dit doen als het veel verschilt.

Men draait nu de glazen staaf in den houder Q 180^0 om; men krijgt dus in het gezichtsveld te zien fig. 28. (N heeft men een weinig verschoven.)

Nu beweegt men den houder Q voorzichtig naar beneden; men ziet daardoor in het gezichtsveld het dikke deel van den glasdraad naar boven gaan, en het dunne uiteinde naar beneden buigen; er ontstaat dus een oog. Het omge-

bogen deel bc moet vlak langs het dikkere deel ab gebogen worden en er een weinig tegenaan drukken (fig. 29); ook moet het zich aan de voorzijde van ab bevinden, zoodat men bij een hoogere instelling van het mikroskoop bc, bij een *iets* lagere instelling ab ziet. Nu doet men aan naald K, dicht bij de punt aan de onderzijde een weinig lijm. Men bepaalt van te voren de plaats waar het druppeltje lijm moet zitten opdat het, tegelijk met den glasdraad, in 't gezichtsveld duidelijk zichtbaar is. Men beweegt met de hand, terwijl men door het mikroskoop ziet, naald K naar het omgebogen deel bc zóó, dat de glasdraad met de lijm in aanraking komt en aan de naald vastkleeft (fig. 30.)

Als de lijm hard is beweegt men eerst I^1 in het gezichtsveld naar boven, en dan ab een weinig naar boven, en K^1 een weinig naar beneden. Het oog van den glasdraad wordt hierdoor kleiner; 't is echter door de bovenwaartsche beweging van a b en de benedenwaartsche van K^1 gespannen, en 't zou dus, als K^1 bv. los liet, weer in zijn vroegeren toestand van fig. 30 terugspringen. Men brengt echter I^1 aan tegen a b, en N^1 op eenigen afstand van het oog, (fig. 31,) en doet N^1 even gloeien. Daardoor zal de stand die kort

te voren door den glasdraad in gespannen toestand werd ingenomen, gefixeerd worden; het oog is kleiner geworden. Men brengt weer a b naar boven, K^1 naar beneden, I^1 tegen a b aan en gloeit daarna, en herhaalt deze handelwijze totdat het oog van den glazen draad een diameter heeft gekregen van $\pm$ 35 μ. I^1, tegen ab geplaatst, dient hier alweer om de warmte af te leiden; wanneer men I^1 wegliet zou de glasdraad door gloeiing van N^1 ook op een plaats meer naar links ombuigen, en zou men dus b.v. fig. 32 krijgen.

Nu moet men den glasdraad van K^1 losmaken. Men voert daartoe I^1 weg uit het gezichtsveld en beweegt a b een weinig naar boven, zoodat er eenige spanning in den glasdraad ontstaat. Men brengt N^1 vlak bij K^1 en gloeit bij tusschenpoozen eenige malen zeer kort. Daardoor verkoolt de lijm en bc springt los. Vervolgens moet het deel van bc, vanaf c tot d, verwijderd worden. Daartoe verwijdert men de naalden I en K, en de platinadraad N, en zet men het miscroscoop weer in verticale houding; men brengt op de voorwerptafel een objectglas, dat men vastzet met behulp van de bij ieder microscoop behoorenden stalen klemmen. In den houder O be-

vestigt men het losse stuk T (fig. 18) waaraan met behulp van klemmen, een scheermes is bevestigd. Het stuk T zelf kan om een horizontale as draaien; daardoor is het mogelijk het vlak van het mes een grootere of kleinere hoek t. o. v. de objecttafel te laten maken. Het scheermes moet een scherpen kant hebben die zoo weinig mogelijk schaarden bevat. Men brengt het vlak van het mes in een hoek van $\pm 45^0$ met de objecttafel.

Nu brengt men de scherpe kant van het scheermes in het gezichtsveld. Op het objectglas heeft men onder het objectief een weinig gewoon, fijn kamerstof gestrooid, en men beweegt nu het scheermes naar beneden totdat het 't objectglas raakt. Men verplaatst den houder O en het stuk T met het scheermes zelf zoolang, tot dat gedeelte van de scherpe kant het objectglas aanraakt, dat zich in het gezichtsveld bevindt. Echter zullen er, tenzij het mes ideaal geslepen is, altijd kleinere of grootere schaarden in de scherpe kant voorkomen. Men beweegt daarom het objectglas, terwijl het mes er op rust, heen en weer; alleen op die plaatsen waar het stof verschoven wordt, raakt de scherpe kant het glas. Men beweegt daarna het mes iets naar boven. Nu brengt men

het oog van den glasdraad op het objectglas, en zorgt men dat de plaats d, waar de draad moet worden afgeknapt, zich bevindt op een plaats waar de scherpe kant van het mes zooeven werkelijk het dekglas aanraakte. Die plaats is kenbaar, omdat men het micrometer-oculair gebruikt. Men beweegt dan het mes weer naar beneden en is daardoor in staat den glasdraad bij d door te hakken. 't Spreekt van zelf dat dit een werk is dat zeer voorzichtig moet gebeuren, omdat er altijd kans is dat de glasdraad eenigszins geforceerd wordt en dan bij b stuk springt. Is echter het doorhakken bij d gelukt, dan neemt men den glasdraad uit den houder Q, en buigt men hem zeer voorzichtig bij β (fig. 21) boven den mikrobrander recht.

Groote mikroörganismen isoleert men bij zwakke vergrooting. Daardoor is het mogelijk om een cel, als dat moet, ook uit het midden van een druppel te halen (bij sterke vergrooting kan men alleen cellen, die dicht bij den rand liggen, isoleeren). Wanneer men dit echter doet met een dikke *oog*vormige naald, vertoonen groote cellen, wanneer het oog zich geheel in den druppel bevindt, dikwijls neiging om zich te plaatsen op dat deel van het oog, waar de glasdraden elkan-

der kruisen, en ze blijven dan op die plaats vastzitten (fig. 34). Daarom gebruikt men voor het isoleeren van groote mikroörganismen een dikke *haak*vormige naald. Het buigen van zulk een naald gaat in sommige opzichten anders. De glazen staaf, waarvan men uitgaat, wordt uitgetrokken en omgebogen totdat men fig. 19 heeft, op dezelfde wijze als dit met de oogvormige naald gebeurde. Alleen moet het draadvormig uiteinde niet zóó dun zijn dat het van zelf in de lucht heen en weer gaat, maar iets dikker. Daarna brengt men de naald ook op dezelfde manier in het gezichtsveld, maar zorgt men dat het gedeelte midden tusschen I^1 en N^1, dat bij de vorige naald ± 4 μ dik was, hier ± 28 μ dik is. Het stuk vanaf dat gedeelte tot het uiteinde mag niet korter zijn dan 5 mm. Nu gloeit men N^1; de glasdraad buigt om, maar niet zoo ver als in fig. 23. Omdat hij dikker is, buigt hij tot een vorm als in fig. 35. Men zet daarna de naald in den houder R (fig. 18,) zoodat men haar *volkomen* vertikaal in het gezichtsveld ziet. Men verplaatst N^1 (fig 36) en gloeit bij tusschenpoozen. I^1 is hierbij niet noodig. Men krijgt dan fig. 37; de naald is dan wel reeds haakvormig, maar de haak is te wijd. Om hem smaller te

maken brengt men de naald weer in den houder Q, en plaatst men I^1 zooals in fig. 28. Daarna beweegt men, onder dezelfde voorzorgen als vroeger, de naald weer zóó dat men fig. 29 krijgt. Omdat hier de draad bij b dikker is als bij de oogvormige naald en het gevaar voor stukspringen grooter is, moet dit ombuigen zeer voorzichtig geschieden. Men bevestigt bc weer aan K^1 door middel van lijm (fig. 30), en beweegt K^1 *zeer voorzichtig* een weinig naar beneden. Dan gloeit men N^1 op dezelfde wijze als bij de andere naald, totdat de breedte van het oog dat men gekregen heeft (uitwendig gemeten) ± 160 μ. bedraagt. Men maakt, door verkoling van de lijm, K^1 weer los van den glasdraad, en brengt K^1 los tegen de onderzijde van bc aan; daarna beweegt men ab in het gezichtsveld een weinig naar beneden (fig. 38). Men gloeit even, brengt ab weer een weinig naar beneden, gloeit weer, enz. totdat de 2 beenen van de haak parallel loopen (fig. 39).

De glasdraad moet nu bij d doorgehakt worden. Dit kan niet met een scheermes gebeuren, omdat men altijd de draad op twee plaatsen zou raken. Men bevestigt daarom aan den houder O, in plaats van een scheermes, een praepareer-

naald met houten handvat. De punt is van deze naald afgebroken en daarna is zij van voren scherp, wigvormig gevijld (fig. 40). Men drukt nu met de punt van de wig op plaats d, op dezelfde wijze als men dit met de oogvormige naald deed. Alleen behoeft hier niet door middel van stof de plaats van aanraking met het objectglas bepaald te worden.

Ten slotte wordt uit de naald, boven den mikrobrander, de bocht bij β (fig. 21) weer verwijderd.

Op pag. 18 werd, bij de behandeling van het vervaardigen van de rechte naald voor bakterien, gezegd, dat de wijze waarop die naalden aan het einde worden omgebogen, later zou beschreven worden. 't Is duidelijk dat dit ombuigen ook geschiedt door middel van het toestel waarmede de andere naalden gemaakt zijn. Men bevestigt de glasstaaf in den houder Q en zorgt er voor dat de naald I^1 drukt tegen een plaats die 4 mm. van de punt is verwijderd. Dan gloeit men N^1 bij tusschenpoozen, totdat het omgebogen deel met het overige gedeelte een hoek maakt van $\pm$ 150°. Het zal van de dikte van de ombuigingsplaats afhangen of het uiteinde naar boven dan wel naar beneden zal ombuigen. Is de draad op den afstand van 3 mm. te dik, dan zal hij door

gloeiing van N^1 in 't geheel niet buigen, en zal men, indien dit mogelijk is, dichter bij de punt moeten buigen, waar de draad dunner is.

Het spreekt van zelf, dat het onmogelijk is om de naalden altijd van volkomen denzelfden vorm of dezelfde dikte te vervaardigen. Daarom gaf ik ook altijd de gemiddelde afmetingen. De dikte van de rechte naalden mag varieeren tusschen 9 en 12 μ; de dikte van de oogvormige tusschen $3^1/_2$ en 5 μ, terwijl de wijdte of doorsnede van het oog (buitenmaat) van 30—40 μ mag bedragen. De dikte van de haakvormige naald eindelijk kan 25—30 μ, de wijdte van de haak (buitenmaat) 130—190 μ zijn.

Als het blijken mocht, dat het dikke gedeelte van de naald, na de vervaardiging, te lang is voor het isoleer-toestel, mag men ze niet op de gewone manier invijlen en doorbreken; door de schok zou tegelijk de fijne punt er af kunnen springen. Men verwijdert daarom het overtollige gedeelte door uittrekken in de vlam en daarop volgend rondsmelten.

Het bevestigen van de isoleernaalden in het toestel geschiedt op de volgende wijze.

Men zet het mikroskoop in het isoleer-toestel en wel in zijn gemiddelden stand, d. w. z. zóó,

dat het door middel van de schuifbeweging C ongeveer even ver naar rechts als naar links, even ver naar voren als naar achteren kan verplaatst worden. De isoleerkamer is ook midden onder het objectief geplaatst; men heeft er de losse stukken, die de zijspleten bedekken afgenomen.

Nu doet men in de naaldhouders N (fig. 1) stopverf, en legt daar de naalden op, zóó dat de punten naar boven wijzen, elkander bijna midden onder het objectief raken, en zich iets lager dan de bovenrand van de isoleerkamer bevinden. Daarna legt men de losse stukken weer op de zijspleten, en een dekglas op de isoleerkamer. Nu drukt men de naalden zóó diep in de stopverf, dat de uiteinden bij een ongeveer horizontalen stand, door beweging van de rondsels S (fig. 1) de onderzijde van het dekglas kunnen aanraken, èn ook minstens 2 m.m. naar beneden kunnen bewogen worden. Men moet deze bewegingen kunnen maken niet alleen als de isoleerkamer zich bevindt midden onder de tubus van het mikroskoop, maar ook als zij zóó ver naar links of naar rechts is verschoven, als dit voor het isoleeren noodig is. Verder mogen de punten, als ze het dekglas aanraken, niet verder

dan 150 μ van elkander verwijderd zijn; ze moeten nl. bij gebruik van de sterke vergrooting ook beide in één gezichtsveld vallen.

Hebben de naalden den gewenschten stand, dan laat men daar, waar ze in de stopverf rusten, eenige druppels zegellak of lutum vallen, waardoor ze voor goed bevestigd zijn.

Omdat er 3 stellen naalden gebruikt worden, behooren bij het isolatie-toestel ook 6 losse naald houders O (fig. 1).

HOOFDSTUK III.

Het Isoleeren.

De dekglaasjes die hierbij gebruikt worden zijn 18 × 18 mm. groot. Ze moeten natuurlijk goed schoon zijn; daartoe worden ze eerst eenigen tijd in het bekende mengsel van Kal. bichrom. en zwavelzuur gelegd, of zoo noodig in dat mengsel opgekookt, en na flinke afspoeling in alkohol bewaard.

Als men wil isoleeren, begint men met eenige dekglazen in te wrijven met een zacht linnen lapje, waarop men zeer weinig vaseline heeft gedaan. Met een ander schoon lapje wrijft men de vaseline er weer zóó ver uit, dat het dekglaasje er blauwachtig beslagen uitziet. Ook zorgt men voor een voldoend aantal vochtige kamers. Hiervoor wordt niet de meest voorkomende vorm, n.l. een ring op een voorwerpglas, gebruikt, maar een vierkant glazen raam op een voorwerpglas. De zijwanden van de kamer zijn 2—3 m.m. hoog, 5 m.m. breed; de inwendige ruimte is 14 × 14

m.m. Men kan deze kamers, indien men het glazen raam uit 4 losse stukken maakt, gemakkelijk zelf vervaardigen. Men wrijft ze, evenals de isoleerkamer, van binnen in met een watje met vaseline, die de stofdeeltjes, die er in mochten vallen, zal vasthouden.

Ook worden zoowel de zijwanden van de vochtige kamers als van de isoleerkamer van te voren aan de bovenzijde voorzien van de vaseline, die voor de afsluiting met de dekglaasjes, noodig is. Daarna wordt het eerste dekglaasje waarop geïsoleerd zal worden, in gereedheid gebracht. Van te voren heeft men het materiaal waaruit een organisme zal worden afgezonderd, zóó sterk verdund, dat er zich, wanneer men er een druppel van op het dekglas brengt, niet al te veel cellen langs den rand bevinden. 't Moet n.l. mogelijk zijn om één cel uit den druppel te trekken, zonder dat er andere, die er te dicht bij liggen, meegaan. Dit verdunnen geschiedt op de volgende manier. Men zorgt er voor dat men steeds in voorraad heeft een menigte reageerbuisjes met ± 5 ccm. voedingsbouillon, glucosepepton, in 't algemeen met vloeistoffen waarin de verschillende mikro-organismen kunnen gekweekt worden. Deze buisjes moeten volkomen

gereinigd, en de vloeistoffen door hard filtreerpapier gefiltreerd zijn, opdat er zich zoo weinig mogelijk zwevende deeltjes in bevinden. Hierin wordt zooveel van het materiaal, waaruit geïsoleerd zal worden, gebracht, dat ongeveer de juiste verdunning verkregen is. Bevindt dit materiaal zich in een vloeibaren voedingsbodem, dan haalt men dit daaruit met een uitgegloeid platina lepeltje, omdat men daarmede sneller klaar is dan met een gewoon entoog, dat te weinig materiaal kan bevatten. Vóór men gaat isoleeren, controleert men op een met vaseline ingewreven en daarna geflambeerd dekglas (wij zullen dit voortaan kortweg een *geprepareerd* dekglas noemen) of de juiste verdunning verkregen is.

Stel dat men uit een vloeistof, waarin verschillende bakteriën voorkomen, 2 bakteriën van soort a, 2 van soort b en 2 van soort c wil isoleeren, dan gaat men op de volgende wijze te werk. Men klemt een met vaseline ingewreven dekglaasje tusschen een dekglaspincet, en haalt het 3 maal door de vlam. Daarna legt men het pincet zóó neer, dat de zijde van het dekglas die bij het flambeeren naar beneden was gekeerd, zich aan de onderzijde bevindt. Nu flambeert men een platina-entoog, en zet men onder elkan-

der, even naast het midden van het dekglas, en wel aan de linkerzijde 2 druppels af van de gesteriliseerde vloeistof, waarin de kultuur moet ontstaan (deze druppels zullen voortaan *voedings*-druppels genoemt worden). Daarnaast, dus rechts van het midden, zet men, op ± 2 m.m. afstand van iederen druppel, óók onder elkander, van het verdunde materiaal 2 druppels af, die voortaan *materiaal*druppels zullen heeten. (fig. 4.)

Men brengt altijd eerst de voedingsdruppels op het glaasje, en daarna de materiaaldruppels, omdat er dan de minste kans bestaat dat het glaasje niet voldoende zou zijn afgekoeld. Men legt daarna het dekglaasje op een vochtige kamer, om infectie te voorkomen, en tegelijk ook om het aan de randen van vaseline te voorzien.

Nu legt men op den bodem van de isoleerkamer, tegen den voor- of tegen den achterwand aan (niet in het midden, wat de waarneming zou kunnen hinderen) een druppel water, en gaat men over tot het steriliseeren van de naalden. Daartoe neemt men de losse zijstukken, die de spleten bedekken (fig. 1 L^1) van de kamer af, en smeert men er al vast de vaseline op die later voor de bevestiging zal moeten dienen. Door een schroef los te draaien bij het steunpunt P (fig. 1) en

het losmaken van de spiraalveren U haalt men nu de staven O voorzichtig uit het toestel, en houdt men de punten van de glazen naalden eerst in een klein bakje met sterk zwavelzuur, en daarna iets dieper (c.f. pag. 113) in een dito met ammonia, die men beiden van te voren heeft klaargezet. Men brengt daarna weer alles op zijn plaats, en legt de losse zijstukken op de spleten. Vóór deze worden dichtgemaakt, legt men het dekglaasje, waarop geïsoleerd zal worden al op de isoleerkamer; hoe eerder n.l. de naalden tegen luchtinfectie zijn beschermd, des te beter. Het dichtmaken zelf geschiedt met ricinus-olie of met olijf-olie, die door diapalm ongeveer even dik-vloeibaar als ricinus-olie is gemaakt. De laatste wordt vóór het gebruik geschud; men laat ze van een platten metalen spatel in de spleet vloeien.

Nu gaat men over tot het eigenlijke isoleeren. Men wacht eerst even tot het dekglas geheel beslagen is met kleine afgeronde druppeltjes. Is dit zoo, en is dus de isoleerkamer verzadigd van waterdamp, dan plaatst men door middel van de schuifbeweging van C (fig. 1) het microscoop zoo, dat de punt van de linkernaald ongeveer in het midden van het gezichtsveld komt. Daarna plaatst men, door middel van de bewegelijke

objecttafel, de isoleerkamer zoo, dat die punt bijna den rand van een materiaaldruppel (en wel den rand die naar den er tegenover liggenden voedingsdruppel is toegekeerd) aanraakt (fig. 5.) Natuurlijk moet men er voor zorgen dat bij deze verplaatsingen de linkernaald niet met een der druppels in aanraking komt; de rechternaald kan dit niet omdat die zoover mogelijk naar beneden is gedraaid. In 't algemeen moet men, wat den stand van de twee naalden t. o. v. elkaar betreft er voor zorgen, dat òf beide naalden tegelijk het dekglas aanraken, òf één van de twee. Nooit mogen beide naalden tegelijk omlaag zijn gedraaid, of mag men bijv. gelijktijdig de eene naar beneden, de andere naar boven draaien. Tegen het dekglas aangedrukt, bevinden de punten zich nl. naast elkaar; als men ze beide naar beneden beweegt kunnen de punten, omdat de beweging die van een cirkelboog is, elkander raken en breken (vooral is dit met de oog- en haakvormige het geval.)

Nu gaat men de sterkste vergrooting gebruiken; om alles op de juiste plaats (fig. 6) in het gezichtsveld te krijgen, zal er meestal nog een kleine verplaatsing noodig zijn van het microskoop of de naald, die men maar flauw ziet, omdat zij het

dekglas niet aanraakt. Men zoekt nu langs den rand van den druppel tot men een bakterie van soort a ziet. Heeft men die gevonden dan brengt men de punt van de naald tegen het dekglas, en raakt men er den druppelrand even mede aan. De naald zal een weinig vloeistof uit den druppel trekken (fig. 7.) Blijkt het dat de bewuste bakterie meegegaan is, dan verschuift men de isoleerkamer een weinig, waardoor een klein druppeltje met die bakterie er in, loslaat van den grooten druppel (fig. 8.) Hiervoor zijn zeer kleine bewegingen noodig; men kan die, nog beter dan door het verplaatsen van de isoleerkamer, óók verkrijgen door zijdelings tegen de micrometerschroef van het mikroskoop of tegen de naaldhouders te duwen.

Wanneer men nu, terwijl alleen de uiterste punt van de naald het dekglas aanraakt, een zeer dunne bakterie met het druppeltje wilde vervoeren, zou men er last van hebben dat deze a. h. w. langs de punt afgleed en achterbleef. (Bij dikkere en bolvormige bakterien heeft men daar nooit last van.) De meniscus is n.l. bij de punt niet bol genoeg, om zulk een bakterie binnen den druppel te houden. Fig. 9 stelt dezen toestand op doorsnede voor; ab is het dekglas, c is de

naald, het geharceerde is de druppel. Men drukt daarom de naald iets meer tegen het dekglas aan; dit kan gebeuren, doordat zij veerkrachtig is. Fig. 10 stelt voor hetgeen men dan krijgt, n.l. een bolle meniscus, terwijl de punt van de naald het dekglas in 't geheel niet aanraakt. Als men zoo een dunne bakterie overvoert, blijft hij in den druppel.

Men vervoert het druppeltje met de bakterie er in (den „transportdruppel") met de linkernaald, totdat deze ongeveer de helft van den afstand tusschen de twee druppels heeft afgelegd. Bij dit vervoeren blijkt het tevens waartoe het dekglaasje met vaseline moest worden ingewreven. Was dit niet gebeurd, dan zou de waterdamp op het dekglaasje gecondenseerd zijn in den vorm van onregelmatig-begrensde, met elkaar vervloeiende druppels. Als men door die druppels den transportdruppel wilde vervoeren, zou deze laatste er ook mede vervloeien, en de bakterie zou niet meegaan.

Nu het glaasje met vaseline is ingewreven, is er een beslag ontstaan van kleine, ronde, scherpbegrensde druppeltjes, die niet met elkaar vervloeien en waarmede de transportdruppel ook niet vervloeit.

De vochtige kamer moet natuurlijk met waterdamp verzadigd zijn, om te voorkomen dat de transportdruppel verdampt onder het overvoeren.

Is men nu op ongeveer de helft van den afstand gekomen, dan overtuigt men er zich van dat men niet meer dan de ééne bakterie in kwestie heeft geïsoleerd. Blijkt dit werkelijk, dan beweegt men de linkernaald zoo ver mogelijk naar rechts in het gezichtsveld. Nu beweegt men de rechternaald naar omhoog; deze moet (zie pag. 36) zóó geplaatst zijn, dat de punt bij sterke vergrooting in alle geval in hetzelfde gezichtsveld kan komen als de linkernaald. Natuurlijk zal die punt niet preciés op de juiste plaats terechtkomen; een kleine verplaatsing zal meestal noodig zijn. Eerst als beide naalden in het gezichtsveld zijn, beweegt men de linkernaald naar omlaag. [1]) Met de rechternaald, die men nu *niet*,

---

[1]) Men bepaalt eens voor altijd voor iedere naald hoeveel keeren men het rondsel van de naaldhouders moet ronddraaien, opdat de naald zóó laag gesteld is dat de punt niet met de onderkant van de hangende druppels in aanraking kan komen. Doet men dit niet, dan zou men iedere keer bij het omlaag-draaien de sterke vergrooting met de zwakke moeten verwisselen, om te controleeren of de naald ver genoeg naar beneden is gedraaid.

evenals de linker-, plat tegen het dekglas behoeft aan te drukken, als men een dunne bakterie isoleert, omdat de bewegingsrichting van het dekglas t.o. van den stand van de naald een andere is (zie fig. 11), voert men den transportdruppel tot vlak bij den voedingsdruppel. De rand van den voedingsdruppel komt bij het overvoeren natuurlijk plotseling aan de rechterkant van het gezichtsveld te voorschijn. Wanneer de transportdruppel nu ook in de rechterhelft vervoerd werd, zou het bij ongeluk kunnen gebeuren dat men niet bij tijds met de beweging ophield, en dat deze, vóór men die nog eenmaal gecontroleerd had, in den voedingsdruppel terecht kwam. Men voert daarom den transportdruppel over zoo ver mogelijk *links* in het gezichtsveld, dan kan men altijd op den juisten tijd met de beweging ophouden, als de voedingsdruppel *rechts* in het gezichtsveld verschijnt. Men voert eindelijk den transportdruppel in den voedingsdruppel over, doch niet dan na er zich nog voor het laatst van overtuigd te hebben, dat de bewuste bakterie er in voorkomt.

Een enkele keer (maar zeer zelden) zal het kunnen gebeuren dat men, behalve de bakterie, ook nog een of ander zwevend deeltje in den trans-

portdruppel vindt. Dit kan echter nooit een levende bakterie of een spore wezen, want men heeft den druppel gecontroleerd *nadat* men de linkernaald had omlaag gedraaid, en hem daarna met de *rechternaald*, die steriel was, overgevoerd. Wat er dus onderweg is bijgekomen, kan niet anders zijn dan een onverbrandbaar stofdeeltje dat door het flambeeren van het geprepareerd dekglaasje, door de een of andere oorzaak, niet op het glas gefixeerd was. Doch zooals we reeds zeiden, het gebeurt hoogst zelden dat men, behalve de bakterie, nog iets anders in den transportdruppel aantreft. Mocht het gebeuren, en vertrouwt men de zaak toch niet, dan kan men altijd den druppel weer een eind terugvoeren, en een andere bakterie isoleeren.

Op dezelfde wijze isoleert men uit de andere materiaaldruppel één bakterie van soort a, en voert die over in den bijbehoorenden voedingsdruppel.

Hierbij draagt men er steeds zorg voor dat de naald die *niet* gebruikt wordt, omlaag gedraaid is.

De naalden behoeven natuurlijk niet na het isoleeren van iedere cel gesteriliseerd te worden. Dit geschiedt alleen als ze gedurende eenigen tijd niet gebruikt zijn geworden, en ook als men

bij het isoleeren een fout heeft begaan die het waarschijnlijk maakt dat ze door bakterien zijn verontreinigd (b.v. als de rechternaald, waarop ten slotte alles aankomt, bij ongeluk in den materiaaldruppel is terecht gekomen).

Is deze tweede bakterie overgevoerd, dan laat men het dekglas nog op de isoleerkamer liggen, totdat een tweede dekglaasje, voor de isolatie van de bakteriën van soort b, in gereedheid is gebracht.

Het verwijderen van een dekglaasje van de isoleerkamer moet met veel voorzichtigheid geschieden. Licht men het te *snel* op, dan zal door de zuiging de olie, die de zijspleten afsluit, in de isoleerkamer gezogen worden en de onderzijde van het dekglas verontreinigen. Men steekt daarom een plat, fijnpuntig pincet tusschen dekglas en kamerwand, en maakt eerst een opening in de vaseline die voor de afsluiting dient. Eerst daarna licht men het dekglas voorzichtig op.

Ieder dekglas, waarop geïsoleerd is, wordt op een vochtige kamer gelegd. Men kan op den bodem een klein waterdruppeltje aanbrengen, doch dan altijd tegen den wand die zich bij de materiaaldruppels bevindt. De waterdamp die zich uit dat druppeltje, vooral in een broedstoof, ont-

wikkelt, wordt n.l. gecondenseerd op dat gedeelte van het dekglas dat zich er boven bevindt, i. c. tusschen de materiaaldruppels. Geschiedde dit tusschen de kultuurdruppels, dan zouden deze kunnen vervloeien, en de kultuur dus mislukken. De vochtige kamers in kwestie worden bij de vereischte temperatuur neergezet. Indien als kultuurdruppel een vaste voedingsbodem is genomen, kan de ontwikkeling van de kolonie, omdat die aan den rand plaats grijpt, met sterke vergrooting worden gevolgd.

De reden waarom twee naalden gebruikt worden, is de volgende.

Het geval zou zich kunnen voordoen, (hoewel het zeer zelden, bijna nooit, voorkomt, als er met schoone, goed gesteriliseerde naalden gewerkt wordt, en als men er maar voor zorgt dat men de linkernaald nooit te diep in den materiaaldruppel steekt), dat aan de het eerst gebruikte linkernaald een bakterie bleef vastkleven. Dan zou die bakterie wel eens kunnen loslaten juist op het moment dat de transportdruppel in den voedingsdruppel gebracht werd, en zoodoende zou deze niet met één, maar met twee bacterien tegelijk geënt zijn. Daarom heb ik er de voorkeur aangegeven, hoewel dat geval zich zelden

zou voordoen, om met twee naalden te werken. Heeft men werkelijk gezien dat men, na den halven afstand met de linkernaald te hebben afgelegd, maar één cel heeft geïsoleerd, dan wordt die verder overgebracht met de *rechter*naald, waarvan het zeker is dat ze volkomen rein is. Daarbij komt het bovengenoemde voordeel, dat eventueel bijkomende deeltjes dan ook nooit bakteriën kunnen zijn.

Gaan we nu na hoe men groote mikröorganismen, bv. zwermsporen, isoleert. We nemen aan dat de vloeistof waarin deze voorkomen, sterk verontreinigd is met bakteriën. Men brengt nu midden op het dekglas, onder elkander, 3 druppels van dezelfde vloeistof als waarin men het materiaal heeft verdund, en die voortaan *reinigings*druppels zullen heeten. Links daarvan brengt men 3 voedingsdruppels, rechts 3 druppels van het verdunde materiaal.

Voor het isoleeren gebruikt men de grove naalden. Bij zwakke vergrooting (bv. Leitz obj. 3, oc. 1) haalt men met de linkernaald een zwermspore uit den materiaaldruppel. Men zorgt er voor dat het druppeltje waarin deze spore geïsoleerd wordt, zoo klein mogelijk is. Daarna onderzoekt men dat druppeltje en de zwermspoor met zeer sterke

vergrooting (ik gebruikte een apochromaat-olie immersie 2 m. m. apert. 1.30 en compensatie-oculair 4 of 6). Blijkt het al dadelijk dat op de spore bakterien vastzitten (en om de spore aan alle kanten hierop te onderzoeken, is het noodig, het druppeltje met de naald gedurig wat te verschuiven, waardoor zij om haar as draait), òf blijkt het dat er in te sterke mate ook losse bakterien in het druppeltje zitten, dan isoleert men een andere zwermspore. Enkele weinige bakterien in het druppeltje kunnen niet schaden, want die blijven toch in den reinigingsdruppel achter.

Heeft men nu een goede zwermspore geïsoleerd, dan voert men die over met zwakke vergrooting naar den reinigingsdruppel, en daarna dwars door dien heen, zóó dat zij dien aan de andere zijde weer verlaat. In dien druppel blijven dan de bakterien achter; mocht er ook een enkele zijn meegegaan (wat bij de contrôle met de sterkste vergrooting blijkt), dan voert men de spore weer even terug in den reinigingsdruppel, en isoleert haar daar weer uit. Blijken nu de zwermspore en het druppeltje volkomen rein te zijn, dan voert men de spore met zwakke vergrooting en met de rechternaald over tot dicht bij den kultuurdruppel, controleert daar nogmaals

voor het laatst met sterke vergrooting, en brengt haar eindelijk in den kultuurdruppel.

Sommige sporen, b.v. de zwermsporen van Saprolegniaceeën, zijn betrekkelijk groot; indien men ze *langzaam* met de naald overvoert, kan men er gedurig last van hebben dat ze op het dekglas blijven vastzitten, en dus niet met de naald meegaan. Daarom doet men het beste zulke sporen in het druppeltje zoo snel mogelijk te vervoeren, in welk geval ze niet gedurig achterblijven. Ook moet men bij groote mikroörganismen, die een zeer zachten membraan hebben, oppassen dat ze niet te sterk door de naald worden aangeraakt, waardoor ze kunnen barsten.

In 't algemeen vereischt het eenige oefening om groote cellen, als ze teer zijn, over te voeren; de verschillende bijzonderheden die daarbij te pas komen, moet ieder uit zich zelf leeren kennen. Door eenige oefening zijn de moeielijkheden spoedig overwonnen.

Eén soort van cellen is er, waarvan het isoleeren volgens mijn methode groote moeielijkheden geeft, ja zelfs in sommige gevallen onmogelijk is. Het zijn dezulke die lang, draadvormig, en tegelijk zeer dun zijn. Deze blijven bij het overvoeren zeer licht aan het dekglas vastzitten. Toch

bieden ze aan mijn methode geen bezwaar, als men voor de isolatie maar *jonge* individuen uitkiest. Ook kan men in zulke gevallen de grove naalden gebruiken, die een *grooteren* druppel voor het overvoeren leveren. Mij is b.v. het isoleeren van Beggiatoa, zelfs met fijne naalden, steeds zonder veel moeite gelukt, indien ik slechts jonge cellen uitkoos.

Wanneer het na eenigen tijd blijkt, dat de geïsoleerde cel zich in den voedingsdruppel heeft vermenigvuldigd, moet er natuurlijk worden overgeënt in een gewoon buisje. Indien men een vasten voedingsdruppel heeft gebruikt wacht men totdat de kolonie met het bloote oog zichtbaar is. Voor dit overenten kan men gebruik maken van een eenvoudig toestelletje, dat schematisch en op doorsnede is afgebeeld in fig. 2.

Op een voetstuk a, dat met lood verzwaard is, staan twee kolommen b, die 10 cm. hoog zijn. Op deze kolommen is met lak bevestigd een voorwerpglas met vochtige kamer c, die in het midden een opening d heeft, waarvan de diameter 15 mm. bedraagt. Die opening kan worden afgesloten door er een glazen plaatje e, dat geheel met vaseline is bestreken, onder te schuiven. Op de vochtige kamer, die van binnen

ook met vaseline is bestreken, om geen last te hebben van infectie door stofdeeltjes, legt men het dekglas f, waarop geïsoleerd is. Men kan nu zeer gemakkelijk, als men e heeft weggeschoven, met een platina-naald, van onderen, door de opening heen, uit den kultuurdruppel overenten in een buisje. Dit toestelletje biedt het voordeel aan dat het dekglaasje volkomen vast ligt en infectie van buiten af gedurende deze manipulatie wordt tegengegaan.

Mocht het soms voor sommige mikroörganismen om de een of andere reden gewenscht zijn dat ze, na de isolatie, zich niet in een vochtige kamer, maar direct in een buisje of een kolf verder ontwikkelen, dan kan men als volgt doen. Men isoleert in een vloeibaren kultuurdruppel, en brengt direct daarna het glaasje op het zoo juist beschreven toestelletje. Om daarin de geringste verdamping tegen te gaan heeft men in de hoeken van de vochtige kamer waterdruppeltjes aangebracht. In een gesteriliseerd capillair glazen buisje (± 1 cm. lang, inwendige ruimte ± ½ m.m.), waarvan men er steeds in voorraad heeft, wordt dan, met een geflambeerd pincet, de kultuurdruppel opgezogen en terstond in het buisje of in de kolf gebracht.

Tweede afdeeling. Toepassingen.

HOOFDSTUK IV.

Reinkultuur van Saprolegniaceeën.

De Saprolegniaceeën komen, doordat het meerendeel een saprophytische levenswijze voert, meestal voor in water dat van bakteriën wemelt. Wil men een reinkultuur van een Saprolegniacee maken, dan kan men twee wegen volgen. Men kan een stuk van het mycelium of een zwermspore, met de bakteriën die er op vastzitten, op een vasten voedingsbodem brengen. Dan zal het mycelium zich straalsgewijs verspreiden, en dit in sommige gevallen sneller doen dan de bakterien. Wanneer men dan na eenigen tijd van den omtrek van het mycelium een gedeelte wegneemt, zal dit weinige, misschien zelfs geene bakteriën, bevatten. Als men dit mycelium dan op een nieuwen vasten voedingsbodem brengt, kan men na eenigen tijd weer van den omtrek een deel wegnemen, en deze handelwijze herhalen, totdat men een reinkultuur heeft gekregen.

Op deze wijze heeft KLEBS op bouillon-gelatine reinkulturen gemaakt van Saprolegnia mixta De Bary. [1])

't Spreekt echter van zelf dat deze methode, welke uitstekende resultaten ze ook al heeft gegeven, en nog kan geven, niet steeds kan worden toegepast.

Als er aan het eerste stuk mycelium bakterien zitten, die even snel of nog sneller zich over de oppervlakte verspreiden als de schimmel, of steeds met de jongste groeiende toppen van het mycelium zich mee laten voeren; als de schimmel of de bakteriën de gelatine doen vervloeien, of, gesteld dat men agar gebruikt, als de bakteriën zich in het condensatie-water kunnen verspreiden, dan levert in al deze gevallen genoemde methode geen resultaten. De tweede weg is deze, dat men uitgaat van een zwermspore, waarop geen bakterien zitten (stukken van het mycelium, hoe klein ook, kan men hiervoor niet gebruiken, want ze zijn altijd verontreinigd.) Ook hiervoor zal men misschien de plaatkultuur-methode van KOCH kunnen gebruiken. Daartoe moet men dan een plaat met zwermsporen uitgieten, en zoeken

[1]) KLEBS. Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. Jahrb. für wiss. Botanik. XXXIII pag. 514.

onder de kolonies, totdat men er een heeft gevonden waarin geen bakterien voorkomen. Ik heb hierbij echter mijn methode gebruikt, niet omdat ik geloof dat ze in dit geval *noodzakelijk* was, maar wèl omdat ze den *gemakkelijksten* en een *zekeren* weg aanbood. Men isoleert daartoe een zwermspore die volkomen rein is; deze moet men zoeken onder diegene, die niet lang geleden uit het sporangium zijn getreden, daar ze door een eenigszins lang verblijf in het water door bakteriën kunnen worden bezet.

't Uitgangsmateriaal verschaft men zich op de bekende wijze, door nl. insecten, liefst meelwormen, op slootwater te laten drijven. 't Is mij gebleken dat men de mooiste ontwikkeling met meelwormen krijgt, als deze werkelijk op de oppervlakte van het water blijven liggen, en niet wanneer ze na verloop van eenigen tijd zinken, hetgeen geschiedt als men ze levend op het slootwater legt, door de vele bewegingen die den dood voorafgaan. Daarom moet men de dieren eerst dooden, door ze eenvoudig eenigen tijd in een reageerbuisje met water onder te dompelen, om ze daarna voorzichtig op de oppervlakte van het slootwater te leggen. Ook is het 't beste om slootwater te nemen zonder groote

vlokken van algen, daar die meestal in het water stijgen en de vrije ontwikkeling van de hyphen kunnen in den weg staan.

Men spoelt nu een meelworm, die dicht bezet is met een mycelium, waaraan ook sporangien voorkomen, uit in $^3/_4$ % NaCl of een andere vloeistof, die isotonisch is met het celvocht, en legt hem daarna, ook in een dergelijke vloeistof, op een horlogeglas. Na een of meer uren zal men op de oppervlakte een menigte zwermsporen zien liggen, die in dien tijd uit verschillende sporangien zijn vrijgekomen. Met een platina-oog neemt men van de oppervlakte wat vloeistof met zwermsporen weg, en brengt men daarmede 2 materiaaldruppels op het isoleerdekglaasje, en daarnaast de andere druppels, zooals dat in hoofdstuk III is beschreven. Voor kultuurdruppels nam ik water, waarin een erwt was gekookt [1]), meelworm-bouillon, meelworm-bouillon-gelatine of dito -agar. Meelworm-bouillon maakt men door een zeker gewicht gedoode, fijngehakte meelwormen aan te mengen met het dubbele gewicht aan water, dit dan eenigen tijd in een broedstoof te laten trekken en daarna, in reageerbuisjes, in

---

1) KLEBS. l. c. pag. 516.

de autoclaaf te steriliseeren. Hierbij kan men dan 10 % gelatine of 2 % agar doen.

Een zwermspore van Achlya sp., die ik in meelworm-bouillon had geïsoleerd, bleek na 24 uur ontkiemd te zijn tot een zóó sterk mycelium, dat dit zich over den geheelen kultuurdruppel uitstrekte. Die druppel werd, met het mycelium, overgebracht in een buisje met meelworm-bouillon. Van uit deze kultuur werd later overgeënt op meelworm-bouillon-gelatine, dito-agar, erwtenwater, glucose-pepton (glucose 5 %, pepton witte $^1/_2$ %, kal. fosfaat $^1/_{10}$ %, magn. sulfaat $^1/_{20}$ %), dito-gelatine, eiwit (5 gr. gedroogd kippeneiwit in 100 ccm. water) en rijst (1 vol. rijst op 3 vol. water). Al deze voedingsbodems bleken voor de schimmel uitstekend te zijn. Minder geschikt waren Löffler's bouillon-gelatine en dito-agar.

Over het algemeen is er zeer weinig bekend over de voedingsphysiologie van schimmels, die op dierlijke substraten leven. Ik besloot daarom bij Achlya een en ander van die kwestie te onderzoeken, te meer daar ik de methode die Klebs [1]) voor de bestudeering van ditzelfde vraagstuk bij Saprolegnia mixta gebruikte, niet voor de beste houd.

---

1) Klebs. l. c. pag. 518 e.v.

Op het eerste gezicht schijnt 't een gemakkelijke taak om na te gaan welke voedingswaarde een bepaalde stof voor een of ander organisme heeft; in werkelijkheid zal ieder, die zich met deze kwestie bezig houdt, bemerken dat er zich zeer veel moeielijkheden bij voordoen. Volgens PFEFFER b.v. [1]) kan een stof, die op zich zelf geen goed voedsel is, dit wèl zijn, wanneer ze te zamen met een andere stof wordt gebruikt. Al meent men dus te hebben gevonden dat een bepaalde stof goed wordt opgenomen, dan weet men nog niet of dit óók het geval zou zijn als men naast die stof eens *ander* voedsel gaf dan in het eerste geval. Een andere moeielijkheid is b.v. nog deze: na hoeveel tijd moet men den groei controleeren, om daaruit de voedingswaarde van een bepaald medium te beoordeelen. Als men dit na te korten tijd doet, weet men niet of men het maximum van groei al voor zich ziet; als men er te lang mee wacht kan dit maximum al voorbij zijn, en de schimmel al ten deele zijn afgestorven.

---

[1]) PFEFFER. Ueber Election organischer Nährstoffe. Jahrb. für wiss. Bot. XXVIII, pag. 205.

De eerste onderzoekingen hierover zijn van RAULIN. Ann. d. sc. nat. Botanique. V serie 1869, pag. 93.

Ik zou thans nog niet durven beslissen, welke de beste methode is om dit vraagstuk te onderzoeken; met die van KLEBS kan ik me echter niet vereenigen. In zijn uitvoerige en overigens voortreffelijke studie, waarnaar ik reeds eenige malen heb verwezen, gaat hij op pag. 518 e.v. na, in welke stoffen Saprolegnia terstond of na eenigen tijd sporangien vormt, en wanneer het mycelium zich alleen vegetatief voortplant. Worden er terstond sporangien gevormd, dan is dit een bewijs voor een slechte voedings-vloeistof; naarmate ze later gevormd worden is dit een bewijs voor een betere; worden ze in het geheel niet gevormd, dan is het voedsel het beste. Dit criterium berust op voorafgaande onderzoekingen, waarbij het hem o.a. was gebleken dat bij plotselinge voedselonttrekking altijd sporangien ontstonden, terwijl bij overvloed van voedsel alleen vegetatieve voortplanting plaats greep.

Het materiaal was altijd van dezelfde kwaliteit, n.l. afkomstig van een versche bouillon-gelatine-kultuur, òf van een kultuur in erwt-aftreksel. De verschillende vloeistoffen, die met elkaar moesten worden vergeleken, konden natuurlijk niet altijd met volkomen dezelfde hoeveelheid mycelium worden geënt; fouten zijn (vooral bij schimmels,

wier mycelium ééne, meestal taaie massa vormt) hierbij niet te vermijden. Ik meen daarom dat een contrôle reeds na 24 uur, zooals KLEBS dat deed, juist omdat die fouten onvermijdelijk zijn, wel wat te vroeg is. Als men iets langer wacht, zullen de verschillen meer vereffend en het maximum van groei toch nog niet overschreden zijn. Maar dit is een kleine bedenking in verhouding tot een andere, n.l. dat KLEBS om de voedingswaarde van een stof te onderzoeken, de schimmel laat groeien in die stof *alleen*, opgelost in water. Hierdoor moet de schimmel gebrek lijden aan vele, voor de voeding noodige elementen; zij wordt dus in *abnormale omstandigheden* geplaatst, die ons niet veroorloven conclusie's aangaande de voedingswaarde van de onderzochte stoffen te maken.

KLEBS beroept zich op de reeds hierboven genoemde resultaten van PFEFFER, dat n.l. een organische stof, alléén genomen, een slecht voedsel kan zijn, maar in verbinding met andere stoffen, verschillende levensfunctien zooals b.v. de ademhaling en de stofwisseling zeer goed zou kunnen helpen, en hij zegt dat hij *zulke* fouten dus niet kan maken. Dat is zeker waar; het komt mij echter niet onwaarschijnlijk voor dat de andere

fouten, die met bovengenoemde methode gemaakt worden, grooter zijn.

In één geval [1]), waar hij Saprolegniaceeën in koolhydraten kweekt, erkent hij zelf dat zijn proeven niet geheel correct zijn, omdat de voedingsbodem geen N-verbindingen bevat. Hij zegt echter dat het mycelium in de eerste 24 uur op zijn N-voorraad wel kan leven. Of dit waar is, zou ik niet durven beslissen; zeker is het echter dat KLEBS, wat dit teren op reservevoedsel aangaat, het ook niet geheel met zich zelven eens is, want op pag. 537, waar hij de voedingswaarde van N-houdende anorganische zouten bespreekt, moet het mycelium weer op zijn C-voorraad teren. Bovendien, hoe kan er ooit sprake zijn van *geheele* onttrekking van voedsel, wanneer een mycelium altijd in de eerste 24 uur op zijn eigen protoplasma kan teren? En toch zegt KLEBS dat, wanneer men een mycelium na afspoeling in gewoon water brengt, er sporangien ontstaan juist door de *plotselinge onttrekking van al het voedsel.* Dat komt niet geheel uit.

Een feit is het dat geen enkele tot hiertoe gebruikte methode om de voedingswaarde van een stof na te gaan, volkomen correct is. Zoolang

---

[1]) KLEBS. l. c. pag. 529—531.

we echter geen volmaakte methode hebben, moeten we die kiezen, welke de *minste* fouten heeft. In alle geval moet aan deze voorwaarde worden voldaan, dat de proefobjecten over alle elementen *die ze voor hun voeding noodig* hebben, kunnen beschikken. Eerst dan zijn de omstandigheden normaal.

Laat ons een voorbeeld nemen. Men wil nagaan welk N-voedsel het best is voor een organisme. Het komt mij voor dat men dan een vrij goede manier volgt, wanneer men verschillende kolven gereed maakt die alle elementen bevatten, behalve N. Nu doet men bij kolf 1 een soort N-voedsel, bij kolf 2 weer een andere soort enz., en men vergelijkt den groei in de verschillende kolven. Tot volkomen controle kweekt men óók in één kolf waarin men geen N-voedsel heeft gebracht. Op deze manier, die door vele onderzoekers wordt toegepast, heb ik eenige proeven genomen om na te gaan welk N- en welk C-voedsel voor de schimmel het beste was. Om het eerste na te gaan nam ik 7 kolven, die ik ieder voorzag van 100 ccm. water, waarin 5 % glucose techn., $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat. Bij kolf 1 deed ik verder niets, bij 2 nog $^1/_2$ % pepton witte, bij

3 ½ % amm. sulfaat, bij 4 ½ % kal. nitraat, bij 5 ½ % natr. nitriet, bij 6 ½ % asparagine, bij 7 ½ % ureum.

Al deze kolven werden discontinu gesteriliseerd, terwijl alle stoffen er in zaten, behalve 7. Het ureum nl. wordt bij vochtige sterilisatie ontleed, en daarom werd het afzonderlijk in de droogstoof 1 uur lang op 150° verhit. Doet men dit op een horlogeglas of in een kroesje, dan heeft men er later, daar het bij die hitte smelt, moeite mede om het los te maken, en bovendien loopt men dan nog gevaar voor verontreiniging. Daarom werd het in een klein buisje gedaan. Dit buisje werd in een gewoon reageerbuisje, dat met een watteprop was afgesloten, gesteriliseerd; daarna werd het buisje met het ureum in kolf 7 geworpen, waarin het ureum spoedig oploste. In ieder der kolven werd een nagenoeg even groote hoeveelheid mycelium gebracht. Dit levert bij Phycomyceten, indien deze niet fructificeeren, eenige moeielijkheid, doordat het mycelium één taaie samenhangende massa vormt, waaruit men zelfs met een omgebogen platinahaak niet altijd gemakkelijk stukken kan lostrekken, in geen geval steeds even groote stukken. KLEBS [1]) legde een vlok mycelium in een

[1]) L. c. pag. 518.

bak met water, en trok die daarin in gelijke stukken; het overtollige water nam hij met filtreerpapier weg. Als hij die stukken moest overbrengen in vloeistoffen, die gemakkelijk door bakteriën worden aangetast, steriliseerde hij den bak met water eerst, en liet hij het afdrogen met filtreerpapier achterwege. Ik volgde een andere methode.

Er werd een kultuur aangelegd in een buisje met schuin-gestolde glucose-pepton-gelatine. Als er aan weerszijden mycelium-draden tegen het glas waren opgegroeid, werden met behulp van een geflambeerd platina-mesje eenige van die draden afgesneden, en deze werden dan in de kolven overgebracht. Zoo'n platina-mesje kan men zich gemakkelijk zelf vervaardigen door uit te gaan van een dikke platina-naald, die men ombuigt zooals in fig. 3. Het gedeelte bij a wordt plat gehamerd en met een fijn vijltje van een scherpen kant voorzien. Daarmede kan men dan zeer gemakkelijk nagenoeg even groote hoeveelheden mycelium, indien dit tegen een glazen wand zit, afsnijden.

De kolven werden, na geënt te zijn, bij 24° C. in de broedstoof gezet.

Van den aanvang af groeide het mycelium in

de kolf met glucose-pepton verreweg het sterkste, Na 3 dagen was de verhouding :

2 >>> 3 > 6 > 1, 7 > 4 > 5 [1].

Deze verhouding bleef dezelfde tot na 16 dagen, toen ik de serie voor het laatst controleerde. Het resultaat is dus : natr. nitriet, kal. nitraat en ureum vormen geen voedsel ; het eerste is zelfs een vergift, want het mycelium-klompje in de kolf met natr. nitriet was het eenige waarbij niet de minste ontwikkeling, zelfs niet in het begin, was waar te nemen, terwijl het, toen ik het na 20 dagen overbracht in glucose-pepton, zich niet meer ontwikkelde. Asparagine is slecht voedsel, amm. sulfaat is beter, maar pepton is het ideale voedsel.

Tijdens de proef entte ik uit de kolf met glucose-pepton in kolf 8 met $^1/_2$ % pepton witte + $^1/_{10}$ % kal. fosfaat + $^1/_{20}$ % magn. sulfaat. In het begin was de ontwikkeling zeer sterk, later werd ze iets minder, maar ten slotte bleef ze staan in het midden tusschen die van glucose-pepton en glucose-amm. sulfaat. Pepton alleen levert dus zoowel N- als C-voedsel.

[1]) Indien de ontwikkeling in de eene kolf eenvoudig sterker is als in de andere, duid ik dit aan door het teeken >. Indien het verschil echter groot is of zeer groot, gebruik ik resp. de teekens >> en >>>.

Om na te gaan welk C-voedsel voor de schimmel het beste is, wanneer als N. voedsel een NH_3-verbinding gegeven wordt deed ik in 13 kolven 100 ccm water, $^1/_2$ % amm. sulfaat (het pepton kon hiervoor natuurlijk in geen geval gebruikt worden), $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat. Bij dit mengsel werden gevoegd de te onderzoeken C-bronnen, en wel:

bij kolf 9 5 gr. aardappelmeel.
» » 10 » saccharose.
» » 11 » laevulose-stroop.
» » 12 » maltose.
» » 13 » melksuiker.
» » 14 » glucose.
» » 15 » cellulose (zetmeelvrij filtreerpapier)
» » 16 $2^1/_2$ gr. natr. benzöaat.
» » 17 » kal. tartraat.
» » 18 » kal. acetaat.
» » 19 » kal. citraat.
» » 20 » natr. butyraat.
» » 21 deed ik niets.

Na 7 dagen was het resultaat aldus:

9 >> 12 > 13 > 14 > 11, 10 > 21 > 19, 17, 15, 16, 20, 18.

Aardappelmeel is dus het beste C-voedsel, dan volgt maltose, dan melksuiker, dan glucose, en

ten slotte laevulose-stroop en saccharose, waarin de groei gering was. In kolf 19 en 17 was in in het begin nog een minimale groei zichtbaar geweest; in de laatste vier kolven in het geheel geen groei.

Een verblijf van 24 dagen in de kolven met natr.-benzöaat, natr.-butyraat en kal. acetaat was voor het mycelium doodelijk, terwijl het even lange verblijf in de kolven met kal. citraat en kal. tartraat niet doodelijk was. Althans, toen ik uit al die kolven het stukje mycelium entte in glucose-pepton, kwamen de kulturen afkomstig uit de 3 eerstgenoemde kolven niet, uit de 2 laatstgenoemde wèl op.

Werd in plaats van aardappelmeel rijstemeel genomen, dan was de groei even sterk; ik heb met opzet echter niet rijstemeel gebruikt voor de vergelijkende proef over het C-voedsel, omdat er zich dikwijls restanten van de aleuron-laag die om de rijstekorrels zit, in bevinden.

De groote hoeveelheid vet, die ik steeds aantrof bij meelwormen, waarop men (zie pag. 57) de schimmel zeer goed kan doen groeien, deed bij mij de vraag ontstaan of vetten in 't algemeen als voedsel zouden kunnen gebruikt worden. Ik nam een proef met Arachis-olie, waarvan door

andere onderzoekers [1]) reeds was aangetoond dat ze tot voedsel kon dienen. Er werden 6 kolven klaar gemaakt:

1a en 1b bevatten $^1/_2$ % amm. sulfaat, $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat.

2a en 2b bevatten $^1/_2$ % pepton witte, $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat.

3a en 3b bevatten 2 % glycerine, $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat.

In alle 6 werd Arachis-olie gedaan.

In 1a greep een zeer geringe ontwikkeling plaats, ongeveer een even sterke als in een oplossing van amm. sulfaat alleen; dus was die ontwikkeling zeker ten koste van het amm. sulfaat. In 3a was geen ontwikkeling te bespeuren, in 2a wel, maar hier weer om dezelfde reden, ten koste van de pepton.

Arachis-olie werd dus niet als voedsel gebruikt. De schimmel vormt onder sommige omstandigheden zuren. In een buisje met glucose-pepton, dat sterk alkalisch reageerde, werd de schimmel gebracht; na 10 dagen was de reactie duidelijk

---

[1]) B.v. WENT. Over den invloed van de voeding op de afscheiding van enzymen door Monilia Sitophila (Mont.) Sacc. Kon. Ak. van Wetensch. 26 Jan. 1901 pag. 490.

zuur. Dit zuur wordt niet gevormd als pepton alleen als voedsel gegeven wordt, want kolf 8 (zie boven), die alleen pepton bevatte, reageerde bij het enten zeer zwak alkalisch, en na 27 dagen nog neutraal. Die zeer geringe verandering in reactie schrijf ik toe aan het feit dat alle voedingsbodems, ook zonder dat ze geënt zijn, na verloop van tijd minder alkalisch, dikwijls zelfs zuur worden. Ook wordt er geen zuur gevormd als glucose met amm. sulfaat als voedsel gegeven wordt. De kwestie zelf heb ik niet verder onderzocht; evenmin welk zuur hier gevormd wordt.

De schimmel kan ook zonder O leven, en vormt daarbij alkohol [1]). Het mycelium vormde, met glucose-pepton als voedsel, in een O-vrije ruimte (verkregen volgens de methode van BUCHNER, n. l. door middel van pyrogalluszuur en KOH) een dikke, stijve massa. De vloeistof werd gedistilleerd, en hetgeen het eerst overging werd met KOH en J verwarmd; de zeer duidelijk waarneembare jodoform-lucht liet weinig twijfel over aan de aanwezigheid van alkohol.

Ook heb ik een en ander onderzocht aangaande de vorming van suiker uit zetmeel. Dat er suiker

[1]) Althans zeer waarschijnlijk, want *geheel* betrouwbaar is de hier volgende reactie op alkohol niet

gevormd werd, was mij al gebleken toen ik de rijst uit een kolf, waarin na 15 dagen een flinke kultuur was ontstaan, met FEHLING's proefvocht onderzocht. Om te vinden welke suiker dit was, nam ik een klompje van den voedingsbodem, en maakte er het ozazon uit, dat bleek te bestaan uit bundels van lange naalden, zooals die bij aanwezigheid van d-glucose ontstaan. Ten overvloede werd nog eens met opzet een oplossing van d-glucose op de hierboven beschreven wijze behandeld; de ontstane naalden bleken identisch te wezen.

Daar in het algemeen schimmels uit zetmeel niet direct d-glucose, maar eerst dextrine als tusschenproduct maken, kon ik hier verwachten, dat er ook niet alleen d-glucose in den voedingsbodem zou zitten, maar, omdat de kultuur nog niet zeer oud was, ook een hoeveelheid dextrine. Om dit na te gaan, polariseerde ik de vloeistof, waarin een gedeelte van de rijst was uitgetrokken, na filtratie; de uitkomst was een rechtsdraaiing van 1.58°. Bij titratie vond ik dat 9 ccm. 10 ccm. FEHLING reduceerden. Volgens de koper-reductie zou er dus 0.55 % d-glucose geweest zijn; deze zou echter een rechtsdraaiing gegeven hebben van 0.5.

Er kon dus niet alleen d-glucose aanwezig zijn.

Dat de andere stof, die zulk een sterke R-draaiing veroorzaakte, dextrine moest zijn, werd zeer waarschijnlijk toen ik een deel van de vloeistof met alkohol behandelde. Hierdoor slaat n.l. de dextrine neer. Toen ik daarna polariseerde, vond ik een rechtsdraaiing van 0,32; bij titratie vond ik dat 17,5 ccm. van de vloeistof 10 ccm. FEHLING reduceerden, wat op een d-glucose-gehalte van 0,29 % wijst. Zulk een oplossing geeft ook een rechtsdraaiing van 0,3.

Volkomen duidelijk zijn deze uitkomsten echter nog niet, want we vinden in het eene geval een gehalte van 0,55 %, in het andere geval van 0,29 % d-glucose. Als het laatste juist is, moeten we tot de conclusie komen, dat we bij de andere titratie 0,55 % vonden, doordat de nog aanwezige dextrine dan óók koperproefvocht zou reduceeren; als het eerste juist is, moeten we aannemen dat we het geringe gehalte van 0,29 % vonden, omdat door de alcohol, behalve dextrine, ook wat d-glucose is gepraecipiteerd. Voor beide mogelijkheden bestaat kans; ik durf echter niet beslissen, wat hier het geval is; 't is mogelijk dat beide factoren het hunne hebben bijgedragen tot de verschillende uitkomsten.

Zeer duidelijk is de omzetting van zetmeel na

te gaan met de auxanograpische methode van BEYERINCK-WIJSMAN.[1]) Men maakt een oplossing van $^1/_2$ % amm. sulfaat, $^1/_2$ % oplosbaar zetmeel en 2 % agar. Daarvan giet men een dunne plaat in een gewone kultuurdoos. Ment ent de plaat in het midden met de schimmel. Na een of 2 dagen, als de schimmel tot op ongeveer een cm. van den omtrek de plaat overwoekerd heeft, overgiet men die met een verdunde J-oplossing, die men even laat inwerken, waarna men haar afgiet, en de plaat met water afspoelt.

Een groot gedeelte in het midden is dan kleurloos; daaromheen vindt men een roode zone (dextrine) en geheel in de rondte, waar de schimmel nog niet is gegroeid, wordt de plaat blauw. Als de mycelium-draden niet te dicht op elkaar zitten, kan men zien dat de draden, die juist in de blauwe zone zijn doorgedrongen, met rood omlijnd zijn.

Uit het feit dat de schimmel gelatine doet vervloeien, vermoedde ik dat er een proteolytisch enzym werd afgescheiden. De snelheid waarmede

---

1) BEYERINK. Die Bacteriën der Papilionaceen-knöllchen. Bot. Zeit. 1888 pag. 762.

WIJSMAN. De diastase, beschouwd als mengsel van maltase en dextrinase. Akad. proefschr. Amst^m. 1889.

dit enzym werkt, en de omstandigheden waaronder het ontstaat, heb ik iets nauwkeuriger onderzocht.

In het begin gebruikte ik hiervoor de methode zooals die door FERMI [1]) is aangegeven. Hiertoe giet men in gewone reageerbuisjes 5—10 ccm. van een mengsel dat uit 100 ccm. water, 7 gr. gelatine en 1 gr. carbolzuur bestaat, en daarop giet men, na afkoeling, de vloeistof die men op haar proteolytisch enzym wil onderzoeken, voorzien van 2 % carbolzuur. In plaats van carbolzuur worden ook andere antiseptica, b.v. thymol voorgeschreven. Men gaat nu na of de gelatine vloeibaar wordt, en hoe snel dit geschiedt. Bij niet zeer snel werkende enzymen kan het echter vele dagen, soms weken lang duren vóór men eenige uitwerking ziet. Daarom heb ik de methode van FERMI zóó gewijzigd, dat de resultaten zoo spoedig mogelijk zichtbaar zijn.

Men neemt water dat met thymol verzadigd is, en doet daarbij $7^1/_2$ % gelatine en zóóveel fijngewreven vermiljoen, dat de vloeistof flink rood ziet. Terwijl men door roeren zorgt dat het vermiljoen niet bezinkt, giet men van dit mengsel in reageerbuisjes, in ieder ± 5 ccm. Dit

1) Arch. f. Hyg. XII, 240.

geschiedt het beste door middel van een trechter, waaraan men een glazen buis heeft bevestigd die tot op den bodem van de buisjes reikt. Als de gelatine hard is geworden, zet men de buisjes in een bekerglas met water dat op 40° C wordt gehouden. Is de gelatine gesmolten, dan houdt men de buisjes in een schuine houding gedurende 10 sec. onder de kraan van de waterleiding, waaraan men een of ander waaier-vormig apparaat heeft bevestigd, zoodat de straal zeer breed en dun wordt en tegelijkertijd al de gelatine omspoelt. (Men kan hiervoor een vleermuis-gasbrander gebruiken, zooals die boven op Bunsensche branders geplaatst worden voor het verkrijgen van een platte vlam,) Door die bespoeling van 10 sec. wordt de gelatine niet vast, maar wel dikvloeibaar. Als men dan daarna het buisje vertikaal neerzet, zal er tegen de wand, boven de oppervlakte van de gelatine, een dunne laag, in den vorm ongeveer van een halve ellips achterblijven. Na bekoeling kan men in deze buisjes verder op de gewone wijze de vloeistoffen gieten, die men wil onderzoeken, voorzien van een stukje thymol.

Het doel van deze methode is dit, dat het enzym in aanraking komt met een zoo groot

mogelijke oppervlakte van de gelatine, die, omdat ze ook in een zeer dunne laag is uitgespreid, spoedig kan worden opgelost. Door de roode kleur ziet men die oplossing des te sneller. Om bij vergelijkend onderzoek er zeker van te zijn dat de gelatine-laag even dik is in alle buisjes, worden deze eerst alle op een even hooge temperatuur verwarmd, en daarna even lang afgekoeld. Bij een langere afkoeling toch zou er meer gelatine tegen den wand blijven zitten, bij een kortere minder.

Met deze buisjes kan men dus 1° aan de laag die tegen den binnenwand zit in *korten* tijd zien of er een enzym aanwezig is en hoe snel dit werkt, en 2° aan de massa die onderin zit, de werking over een *langer* tijdsverloop controleeren.

Ik onderzocht met deze gewijzigde, èn tegelijkertijd ook met de oude methode ter vergelijking, of de schimmel in een voedingsbodem van 5 % eiwit in water en in een van glucose-pepton proteolytische enzymen afscheidt. In beide gevallen gebruikte ik eenvoudig de vloeistof uit de kultuurkolf, na filtratie, maar ook een gefiltreerd aftreksel in water van het fijngewreven mycelium. Dit fijnwrijven geschiedde met glaspoeder. Ik had dus:

A. de vloeistof uit de kultuur op eiwit.
B. het aftreksel van de fijngewreven schimmel uit de kultuur op eiwit.
C. de vloeistof uit de kultuur op glucose-pepton.
D. het aftreksel van de fijngewreven schimmel uit de kultuur op glucose-pepton.

's Avonds ten 9 ure deed ik bovengenoemde vloeistoffen in buisjes, op de hierboven beschreven wijze voorzien van vermiljoen-thymol-gelatine. Het resultaat was den volgenden morgen, dus na 12 uren, reeds duidelijk te zien: de dunne laag was door het enzym in A en B bijna geheel verdwenen en door C en D nog niet zeer merkbaar aangetast. Na 2 dagen was de dunne laag in C en D bijna verdwenen en pas na 3 dagen in D verdwenen, terwijl ze toen in C nog niet geheel weg was. Het enzym was dus in veel sterkere mate gevormd op den voedingsbodem van eiwit als op dien van glucose-pepton.

Dit zou in overeenstemming zijn met de bekende theorie dat een cel een enzym zal afscheiden naarmate zij dit noodig heeft, om de saamgestelde voedingsstoffen te splitsen in meer eenvoudige en assimileerbare. In dit geval zou men ook volgens die theorie verwachten dat in een voedingsbodem met eiwit meer enzym, althans

een dat krachtiger werkt, zal worden afgescheiden als in een voedingsbodem met glucose-pepton. Aan den anderen kant is er echter [1]) gewaarschuwd tegen het te snel trekken van algemeene conclusiën op dit gebied.

Ook vergeleek ik de bruikbaarheid van deze gewijzigde methode met de oude, waarbij men de gelatine gewoon in vertikaal-staande buisjes laat stollen, dus zonder een dunne laag tegen den wand. Daarbij was na 3 dagen nog geen uitwerking van het enzym zichtbaar.

Eveneens ging ik nog door een enkele proef na, welken invloed de aanwezigheid van zuur of alkali op de werking van het enzym heeft. Van ieder der 4 bovengenoemde vloeistoffen werden twee hoeveelheden genomen, en van deze de eene zwak alkalisch, de andere zwak zuur gemaakt (met behulp van HCl en van Na OH). Het bleek dat het enzym zoowel bij aanwezigheid van zuur als van alkali, werkt. Na 3 dagen was in iedere buis de dunne laag verdwenen. Volgens de thans heerschende nomenclatuur zou

---

[1]) Went. Over den invloed van de voeding op de afscheiding van enzymen door Monilia sitophila (Mont.) Sacc. Kon. Akad. van Wetensch. 26 Jan. 1901, pag. 499.

men dit dus een tryptisch enzym kunnen noemen. Ook ging ik nog na of de schimmel een enzym afscheidt dat in staat is vet te splitsen. In een kolfje deed ik 100 ccm water, $^1/_2$ gr. pepton witte, $^1/_{10}$ % kal. fosfaat en $^1/_{20}$ % magn. sulfaat. Daarbij deed ik Arachis-olie, en zooveel lakmoesoplossing dat het geheel de neutrale paarse tint had. Het kolfje werd met de schimmel geënt. Als de olie gesplitst werd, zouden er vrije vetzuren en glycerine moeten ontstaan. Deze zuren zouden niet geneutraliseerd kunnen worden, want bij een voeding met pepton ontstaat (zie pag. 71) geen alkalische reactie. De lakmoes-oplossing zou dus, als vetten gesplitst werden, rood moeten worden. Dit gebeurde echter niet; de schimmel scheidt dus geen vetsplitsend enzym af. Natuurlijk diende een soortgelijk ongeënt kolfje tot contrôle.

Dit onderzoek naar de werking van het enzym is tevens voor mij een aanleiding geweest om na te gaan of er in de methode voor de bestudeering van deze kwestie niet eenige veranderingen waren te brengen.

Er staan voor het enzym onderzoek twee wegen open: de antiseptische en de aseptische methode.

De eerste, waarvan we zoo juist een toepassing hebben gezien, is gebaseerd op het feit dat de enzymen over het algemeen betrekkelijk ongevoelig zijn voor veel stoffen, die voor levende cellen doodelijk zijn, o.a. voor verschillende antiseptica.

Deze dienen natuurlijk om de ontwikkeling van bakterien, die al in de kultuur mochten zitten, of er naderhand door infectie bij zouden kunnen komen, tegen te houden.

Een bezwaar van deze methode is en blijft echter dit, dat men er nooit zeker van is het enzym in zijn *ware* uitwerking voor zich te zien. Want al mag het *over 't algemeen* waar zijn dat de enzymen, in verhouding tot de levende cellen, *betrekkelijk* ongevoelig zijn voor veel protoplasmavergiften, *geheel* ongevoelig zijn ze er bijna nooit voor. In vele gevallen oefenen zij zelfs een vrij sterken invloed uit. De antiseptica, die het meest bij deze methode gebruikt worden, zijn: thymol, chloroform, phenol, toluol, aether, aetherische olien, sterke alkohol, salicylzuur, natriumfluoride, calomel, sublimaat, natrium-arseniet en natrium-azoïmid [1]). Van verscheidene van deze stoffen

[1]) Van dit lijstje zou ik ten minste thymol en chloroform willen schrappen, en wel omdat het geen

nu is het bekend geworden dat ze zich tegenover de enzymwerking volstrekt niet neutraal gedragen. Vooral is dit het geval met salicylzuur, phenol, thymol, chloroform en natriumfluoride. Verdunde alkohol werkt zwak in op pepsine, vrij schadelijk op diastase en invertase, vernietigend op maltase in tegenwoordigheid van water. Phenol werkt storend in op pepsine en misschien ook op diastase.

Van andere, nog niet genoemde protoplasmavergiften, is het bekend dat natriumarsenaat, borax en kininesulfaat zeer schadelijk zijn voor de werking van invertase, dat zilvernitraat in een kleine dosis, wintergreen-olie en kaneel nogal, en kaliumcyanide zeer sterk nadeelig is voor

---

vertrouwbare antiseptica zijn. SMITH demonstreerde op een congres van bakteriologen 12 verschillende bakterien, die groeiden in een voedingsbodem waarbij een gelijk vol. chloroform was gevoegd, en 2 soorten die in bouillon met thymol groeiden. (Zie Centralbl. für Bakt. und. Par. Knd. I. XXIX pag. 445). ALBERT vond in gistsap met 10 % rietsuiker en 1 % thymol een rijke bakterien-ontwikkeling (zie Centralbl. f. B. u. P. II. VII pag. 74). Ik zelf vond ook in een buisje met $7^1/_2$ ccm. glucose-pepton en een stuk thymol ter grootte van 1 ccm. een sterke bakterien-ontwikkeling. Ik kweekte dezelfde bakterie in bouillon en in bouillon + thymol, en vond in het laatste (waarschijnlijk toevallig) zelfs een iets sterkeren groei!

dezelfde stof. Ook veel alkaloïden en looistof werken vertragend in op enzymen, terwijl formaldehyd ze geheel onwerkzaam maakt.

In andere gevallen kunnen sommige protoplasma-vergiften weer bevorderend werken voor de enzymen; dit is b.v. met sommige alkaloïden en met zilvernitraat, in een sterke dosis toegediend, het geval.[1])

We zien dus dat enzymen in 't algemeen gevoeliger zijn gebleken voor antiseptica dan men in 't begin meende. En dit is geen wonder, want zelfs voor neutrale zouten zijn zij gevoelig; de meeste van deze werken in verdunden toestand bevorderend. In enkele gevallen meenen sommige onderzoekers (b.v. Duclaux) wel een verklaring te hebben voor die verschillende uitwerking. Van een zout b.v., dat de caseïne, welke in de melk gesuspendeerd is, oplost, zou men wel van te voren kunnen verwachten dat het schadelijk zal werken op het lebenzym. Daar het verder vrij zeker is dat zeer verdunde zuren

---

[1]) Ik ontleen de meeste van deze feiten aan: Die Fermente und ihre Wirkungen, von Carl Oppenheimer. Leipzig, Verlag von F. C. W. Vogel, 1900. pag. 41 e.v., alwaar ook uitgebreide litteratuur-opgave, en aan: Traité de Microbiologie, par E. Duclaux, Paris. Masson et Cie 1899. Dl. II pag. 371, e.v.

over 't algemeen voordeelig werken, en zeer verdunde alkalien nadeelig, zou men ook kunnen verwachten dat stoffen die een zwak zure reactie doen ontstaan bevorderend, en die, welke een alkalische reactie zullen teweegbrengen, schadelijk zullen werken.

Maar dit zijn slechts enkele gevallen, waarin eene verklaring met eenige waarschijnlijkheid kan gegeven worden; meestal weet men van te voren in 't geheel niet in hoeverre, en nog minder waarom een antisepticum een voordeeligen of een schadelijken invloed op het te onderzoeken enzym zal hebben. Dit is zeker, bijna altijd hebben ze een grooteren of kleineren invloed, en dat alleen reeds maakt dat de antiseptische methode van enzym-onderzoek nooit te vertrouwen is.

De tweede methode, de aseptische, kan men op 2 manieren toepassen. Men kan in een glazen doos een vasten voedingsbodem uitgieten waarop het mikroörganisme in kwestie moet groeien, en daar bij voegen de stof waarop het enzym moet inwerken; alles natuurlijk onder de noodige voorzorgen van steriliteit. Daarna wordt het mikroörganisme er op gebracht, en als het zich ontwikkeld heeft wordt met verschillende

hulpmiddelen nagegaan hoever het enzym door de gelatine of agar is gediffundeerd en welke veranderingen het heeft teweeggebracht. Van deze methode zagen we reeds een toepassing op pag. 74.

De andere manier is deze, dat men de kultuur, ook onder de noodige voorzorgen tegen infectie, filtreert door een bakterienfilter, en daarmede een scheiding tusschen het enzym en de levende cellen teweegbrengt.

De eerste manier, die tot hiertoe reeds veel resultaten heeft gegeven, is intusschen niet te gebruiken als men het enzym afzonderlijk aan verschillende proeven wil onderwerpen. Ook houden de gelatine en de agar, als colloïde lichamen, de enzymen, die er doorheen moeten diffundeeren, min of meer tegen. Hetzelfde is het geval met de bakterienfilters, die door moleculaire adhaesie sommige bestanddeelen van de te filtreeren vloeistof in meerdere of mindere mate tegenhouden. Soms komen stoffen geheel veranderd, dan weer zoo, dat enkele producten er uit vernietigd zijn, uit het filter te voorschijn. Misschien speelt ook de zuurstof, die in de porien zit, hierbij een rol.

Vooral ook schijnt de slijmachtige laag, die zich na eenigen tijd op den filter afzet, verschillende bestanddeelen tegen te houden.

In de antiseptische methode heb ik geen andere wijzigingen pogen te brengen dan de hierboven op pag. 75—77 beschrevene.

Wat de aseptische betreft, heb ik getracht een filter te vinden dat gemakkelijker is aan te wenden dan de porceleinen, dat absolute zekerheid geeft wat de steriliteit betreft, en dat de vloeistoffen, althans de enzymen meer onveranderd doorlaat. Ik meen dat ik, althans voor het onderzoek van sommige schimmels, naar wensch ben geslaagd, en wil het apparaatje dat daarbij dienst doet, hier nog mededeelen. Het is afgebeeld in fig. 41, en zóó eenvoudig gebouwd dat er niet een afzonderlijke beschrijving behoeft vooraf te gaan. Alleen zij hier medegedeeld dat het apparaat van glas is vervaardigd, en dat de gestippelde deelen in de figuur watteproppen, en de geharceerde deelen caoutchouc-buisjes voorstellen.

Men doet onder in de dikwandige buis A een hoeveelheid glaspoeder of diatomeeën-aarde. Daarboven giet men een voedingsvloeistof, waarin de schimmel moet gekweekt worden. In de buizen F, G, F^1 en G^1 doet men de stoffen, waarop men het enzym wil laten inwerken. In het fleschje C doet men water. Dan wordt het geheel ge-

steriliseerd, waarna in A de schimmel wordt geënt.

We willen eens een gecompliceerd geval nemen, n.l. dat men van de schimmel de vloeistof wil afgieten, om het enzym dat er in zit, te onderzoeken, en dat men óók de schimmel wil fijnwrijven om het enzym uit de cellen zelf te verkrijgen. In beide gevallen willen we de inwerking op 2 verschillende stoffen a en b nagaan.

Als de schimmel in A zich goed ontwikkeld heeft, giet men uit C zooveel water op de watteprop E, dat die er mee verzadigd is. Daarna giet men de vloeistof uit de kultuur in A op de watteprop E, waarbij men natuurlijk het glazen T stuk, dat tusschen A en D is ingeschakeld, zóó houdt dat die vloeistof niet in C kan loopen. De natte watteprop E, die 5 c.m. hoog is, dient als filter, en houdt als zoodanig eventueele losse stukken van het mycelium terug. Men laat de eene helft van het filtraat loopen in F, waarin de stof a zit, de andere helft in G, waarin de stof b zit. Het buisje dat door de watteprop E is gestoken, dient om de lucht die door het filtraat verplaatst wordt, te doen ontwijken. Na het filtreeren sluit men de caoutchouc-buizen die F en G met D verbinden, door klemkranen af; men kan

daarna F en G van D losmaken en afzonderlijk bewaren.

Nu gaat men over tot het uitpersen van het mycelium. Van te voren moet dit echter flink worden afgespoeld. Daartoe giet men uit C water op het mycelium, en spoelt men dit door schudden, waarbij men B op en neer beweegt, af. Daarna giet men het water weg in de rechter buis D, die nu toch niet meer noodig is. Men herhaalt dit eenige malen, giet het laatste spoelwater niet door D weg, maar gebruikt dit om de watteprop E^1 te bevochtigen, en wrijft vervolgens met behulp van B de schimmel met het glas of de diatomeeënaarde fijn. Voor alle zekerheid wrijft men het deel van B dat boven de watteprop uitsteekt, met vaseline in; dan kunnen er nooit bakteriën bij de beweging van B naar binnen komen.

Is het mycelium goed fijngewreven, dan giet men er nog wat water uit C op, en filtreert men door de watteprop E^1 in de linkerbuis D^1 op dezelfde wijze als men dit in de rechterbuis D deed.

Door voorloopige proeven had ik geconstateerd dat myceliumdraden en stukken daarvan door een watteprop worden tegengehouden, wanneer die ten minste vochtig is.

Met dit toestel ging ik nog na, of Achlya een enzym afscheidt dat zetmeel ontleedt. Ik wilde alleen maar de afgegoten vloeistof van de kultuur gebruiken, en bevestigde aan A dus alleen de buis D met toebehooren. In de buisjes F en G deed ik water waarin een weinig oplosbaar zetmeel was opgelost, zóó dat het met jodium zich nog even blauw kleurde. De schimmel zelf werd in A op 5 % rijstemeel gekweekt.

De eene helft van het filtraat werd in het buisje F met de zetmeeloplossing even gekookt. Het andere buisje G werd niet gekookt. Na 3 dagen kleurde het gekookte buisje zich met jodium duidelijk blauw, en het ongekookte niet meer.

Ook heb ik nog onderzocht of het filtreeren door watten een bepaalden invloed kon hebben, dien b.v. het filtreeren door hard of zacht filtreerpapier niet zou vertoonen. Het enzym was in alle gevallen echter even werkzaam.

Voor bakterien en kleine gistcellen is een watteprop echter niet een voldoende filter; verschillende proeven toonden aan, wat trouwens reeds bekend was, dat dergelijke kleine cellen door natte watten heengaan. Men kan dus alleen een wattenfilter gebruiken, wanneer zooals in het zoo-

even beschreven toestelletje, geen bakteriën in het spel kunnen komen.

De hierboven beschreven methode, om bij het onderzoek van proteolytische enzymen vermiljoen te gebruiken, kan ook bij het aseptisch enzymonderzoek toegepast worden. Het bleek mij n.l. dat vermiljoen, hoewel het een kwikverbinding is, toch geen antiseptische waarde heeft. Op eenige buisjes vermiljoen-gelatine (zonder thymol), die ik open had laten staan, groeide n.l. na eenigen tijd vrij welig Penicillium glaucum. Om volkomen zekerheid te hebben heb ik, naast elkaar, Aspergillus niger, Monilia javanica, Cladothrix dichotoma en Bacillus megatherium gekweekt op gewone vleesch-gelatine en op idem + vermiljoen. De laatste had ik, om ze eenigszins te zuiveren, fijngewreven in 10 % zoutzuur, en daarna flink uitgewasschen. Deze organismen groeiden op beide voedingsbodems even goed.

Wanneer men de litteratuur over Saprolegniaceeën opslaat, zal men bijna overal de meening vinden dat ze voor hun saprophytische levenswijze bij voorkeur dierlijke stoffen verkiezen. Uit bovenstaande onderzoekingen betreffende de voedingsphysiologie, vooral b.v. uit het krachtig versuikeren van zetmeel is het echter gebleken

dat substraten van zuiver plantaardigen oorsprong minstens even gunstig zijn als dierlijke. Het feit dat Arachis-olie, en dus misschien ook andere vetten, niet worden opgenomen, pleit ook wel eenigszins tegen een groote voorliefde voor dierlijke substraten. Ik vermoed dat de gewone methode die altijd gevolgd wordt om materiaal van Saprolegniaceeën te krijgen, n.l. het werpen van insecten in een bak met slootwater[1]), de oorzaak is van die meening. Dat men juist dieren heeft gekozen om er deze schimmels zich op te laten ontwikkelen vindt zijn grond waarschijnlijk hierin dat er maar betrekkelijk weinig schimmels zijn die op dierlijke substraten saprophytisch voorkomen, zoodat er weinig kans bestaat dat er ook andere, niet gewenschte Fungi op die dieren zullen ontstaan, die de Saprolegniaceeën min of meer zouden kunnen verdringen.

Vele malen had ik geprobeerd het vegetatieve mycelium van de schimmel, waarmede al de hierboven beschreven proeven zijn verricht, tot sporangienvorming te dwingen volgens de methode van KLEBS. [2]) Deze bestaat hierin dat men

[1]) Zie b.v. STRASBURGER. Das botanische Practicum Dritte umgearbeitete Auflage, pag. 451.

[2]) Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. Jahrb. für Wiss. Bot. XXXIII pag. 518.

een kultuur aanlegt in een goede voedingsvloeistof, b.v. erwtenwater ; als het mycelium zich flink ontwikkeld heeft, spoelt men het af in water en laat het daarin gedurende een uur liggen om er al de voedings-vloeistof goed uit te trekken. Daarna wordt het in zuiver water overgebracht, waarin het na ongeveer 24 uur, ten gevolge van de plotselinge voedselonttrekking, sporangien vormt, terwijl later oögonien en antheridiën ontstaan [1]).

Al mijn pogingen om goede sporangien te krijgen, mislukten echter ; ik kreeg er slechts met rudimentaire sporen, van kleine gedaante, enz. KLEBS geeft alleen aan dat het mycelium in *zuiver water* moet gebracht worden ; ik gebruikte daartoe altijd leidingwater, en schreef het mislukken van mijn proeven toe aan het feit dat indertijd misschien de een of andere voedingsvloeistof een zóódanig nadeeligen invloed op het mycelium zou hebben gehad, dat er een asporogeen ras zou zijn ontstaan. Ik staakte dus deze proefnemingen, in de meening dat ze toch nutteloos waren.

Tijdens het afdrukken van dit proefschrift waagde ik echter nog een laatste kans, en nam geen leiding-, maar regenwater. Het resultaat

[1]) l.c. pag. 554 e.v.

was, dat ik na 1½ dag de lang begeerde sporangien, normaal gevormd en gevuld met sporen te zien kreeg. Het leidingwater had dus een nadeeligen invloed gehad; 't is natuurlijk best mogelijk, dat water van andere leidingen de sporangien-vorming niet zou hebben tegengehouden. Een mooie antheridien- en oögonien-vorming vertoonde het mycelium niet, waarschijnlijk doordat het grootste deel van de reservestoffen voor de sporangien verbruikt waren; volgens KLEBS [1]) gebeurt dat in deze omstandigheden dikwijls. De tijd om ze op andere manieren, die KLEBS aangeeft, te doen ontstaan, ontbrak mij. Ik moet het nauwkeurig determineeren, waarvoor men de geslachtelijke organen noodig heeft, dus tot later uitstellen. Naar hetgeen ik echter reeds gezien heb, schijnt het mij 't meest waarschijnlijk, dat ik heb te doen gehad met Achlya oblongata de Bary, waarbij gladde, peervormige oögonien voorkomen, terwijl de antheridien niet uit dezelfde myceliumdraden ontspringen als de oögonien.

Intusschen, al is de soort nog niet bekend, dit doet niets af aan de waarde van de bovenstaande onderzoekingen. Van *alle* 9 Achlyasoorten

[1]) l. c. pag. 555.

toch, die in RABENHORST's Kryptogamen-Flora [1]) voorkomen, staat aangegeven, dat ze alleen of bij voorkeur op *dierlijke* substraten saprophytisch voorkomen. Biologisch komen ze alle met elkaar overeen; daarom doet het er betrekkelijk weinig toe, welke soort voor mijne proeven diende.

---

[1]) Hiervan Bnd. I, afd. IV: Phycomycetes, bewerkt door A. FISCHER 1892, pag. 346 e. v.

HOOFDSTUK V.

Proeven over pleomorphie.

Een uiteenzetting van hetgeen over deze belangrijke kwestie geschreven is, en een opsomming van de verschillende waarnemingen die er mede in verband staan, zouden zeker de stof kunnen leveren van eenige boekdeelen. Ik zal in dit korte bestek mij dan ook van een uitvoerige bespreking van dit vraagstuk onthouden, te meer daar ik later mijn onderzoekingen op dit gebied op breeder schaal hoop voort te zetten.

Men kan bij hoogere planten verschillende soorten van veranderlijkheid onderscheiden. Er treden variatie's op waarbij de veranderde vormen t. o. v. de een of andere eigenschap slechts een *quantitatief* verschil toonen met den normalen, en er komen ook variaties voor waarbij het verschil met den normalen vorm *qualitatief* is. De eerste worden in het meesterwerk van DE VRIES »Die Mutationstheorie« *fluctueerende*, de laatste

sprongvariaties genoemd. De eerste zijn erfelijk *niet* constant, de laatste meestal wèl.

En wat zou, nu dit boek algemeen een voorwerp van studie is, meer voor de hand liggen dan dat we de terminologie die daarin voorkomt, ook overnemen, en op de bakterien toepassen! Toch zou ik voor mij dit thans nog niet willen doen, en wel omdat er nog te weinig van die verschijnselen bij de bakterien is bestudeerd. Eén kwestie b.v., of waargenomen veranderingen langzamerhand dan wel sprongsgewijze ontstonden, *kon* niet geheel worden uitgemaakt en wel omdat men geen methode had om *alle* opeenvolgende generatie's afzonderlijk te onderzoeken. Den eersten stap in de richting van dat onderzoek heeft BEIJERINCK al gedaan in zijn belangwekkende studie »Over verschillende vormen van erfelijke variatie bij mikroben« [1]). Maar de laatste en beslissende stap zal pas gedaan zijn als de veranderingen niet alleen aan *subvarianten* [2]), die toch nog altijd verscheidene generatie's van elkander verwijderd zijn, kunnen worden nagegaan, maar aan alle *opeenvolgende* generaties. Zooals

---

[1]) Kon. Akad. van Wetenschappen. Verg. van 27 Oct. 1900.

[2]) Zie bovengenoemde verhandeling.

ik al in de inleiding zeide, meen ik dat mijn methode van bakterien-isolatie daar waarschijnlijk den weg toe zal kunnen banen.

Hoe het zij, ik geloof dat een bepaalde terminologie voor de verschijnselen van veranderlijkheid bij de bakterien, die in overeenstemming is met die der hoogere planten, nog niet moet worden vastgesteld vóór er wat dieper in deze kwestie is doorgedrongen.

Ik heb mij daarom voorshands nog tevreden gesteld met de klassieke benaming „pleomorphie" als titel boven dit hoofdstuk te plaatsen. Men moet het dus opvatten als een collectief begrip, waaronder *alle* soorten van variaties der bakterien vallen.

Als grondlegger van de leer der pleomorphie moet Nägeli beschouwd worden. Hij vond bij de meest verschillende ontledingsprocessen bakterien van denzelfden vorm, en omgekeerd bij een en hetzelfde rottingsproces bakterien van de meest uiteenloopende gedaante. Dit was voor hem een van de gewichtigste argumenten waarop hij zijn leer grondvestte, dat alle bakterien zouden zijn opgebouwd uit één of meer kleine bolvormige cellen; uit de verschillende rangschikking zouden dan gedurig staafvormige, gekromde, spiraalsgewijs-

gedraaide en draadvormige organismen ontstaan. Na Nägeli waren het o.a. Billroth, Cienkowski, Buchner, Zopf en Metschnikoff die de leer der pleomorphie, zij het ook in verschillende vormen, verkondigden. De meeste van hun onderzoekingen zijn echter gedaan met onzuivere kulturen; daaraan is het bv. toe te schrijven dat Zopf meende bij Cladothrix dichotoma uit de lange draadvormige bakterien spirillen te zien ontstaan. Ook andere onderzoekingen uit den lateren tijd waarbij bakterien uit schimmels zouden ontstaan, bleken naderhand geheel waardeloos te zijn, omdat het uitkwam dat ze niet met reinkulturen waren gedaan. Op het oogenblik is er dan ook geen enkele reden om *dergelijke geweldige* overgangen voor mogelijk te houden. Terecht zegt daarom Migula [1]) als hij het over soorten heeft die in reinkultuur zijn gekweekt, met het oog op de proeven van Zopf: „Gerade bei diesen arten ist aber eine *so* weitgehende Vielgestaltigkeit *niemals* beobachtet worden....."

Maar tusschen pleomorphie in dezen zin en een absoluut constant zijn van den vorm bestaat een groot verschil. Talloos zijn de onderzoekingen, gedaan door ernstige en bekwame waar-

[1]) W. Migula System der Bakterien. Bnd I pag. 221.

nemers met behulp van reinkulturen, waarbij de vormen van de bakterien in engeren zin wèl in elkaar overgingen. Men heeft kokken zien veranderen in staafjes, staafjes in vibrionen, deze weer in kokken enz., en dat onder veranderde omstandigheden die niet zóó abnormaal waren of ze konden in de natuur óók wel voorkomen. Wat moet men van die onderzoekingen denken? Veel onderzoekers nemen ze voor waar aan, maar schrikken terug voor een consekwente toepassing van die resultaten, die hierin moet bestaan, dat men de geheele indeeling van de bakteriën in kokken, staafjes, enz. laat varen. Maar daarmede zou een groot deel van het gebouw der bakteriologie staan of vallen.

Een gevolg is dat men in de meeste handboeken een zekere onbeslistheid aangaande deze kwesties aantreft. Men is bang ze aan te grijpen, praat er wat omheen en komt tot de conclusie dat de waarheid wel zoowat in het midden zal liggen. Maar met die machtspreuk komt men niets verder.

Toch zijn er enkele onderzoekers die beslist durven zeggen wat ze van de zaak gelooven, en die in scherp omlijnde trekken aangeven in hoeverre ze de pleomorphie aannemen of verwerpen.

Tot hen behooren o.a. MIGULA en DUCLAUX. De eerste, een tegenstander van pleomorphie, erkent b.v. ten opzichte van Microspira Comma[1]) dat deze kan voorkomen als echte, typische komma-, vormen, die ongeveer 3 maal zoo lang zijn als breed, en een duidelijke kromming vertoonen; verder in kortere afmetingen, waarbij de kromming sterker of zwakker kan zijn, en eindelijk als zeer lange vormen, 6—8 maal zoo lang als dik, met een zeer sterke of nauwelijks merkbare bocht. Hij neemt dus aan, zooals ieder bakterioloog dat tegenwoordig wel doet, dat de *grootte* van de cellen kan veranderen, en ook dat de *vorm* kan verschillen, maar het laatste toch binnen zekere grenzen die door het karakter van de soort bepaald zijn. Die grenzen trekt hij met beslistheid als hij zegt: »In dessen so verschiedenartig auch die einzelnen Formen einer Art sein mögen, sie halten sich dennoch immer innerhalb der Grenzen, welche ihnen durch den Charakter der Gatting gezogen sind; *niemals wird aus einer Microspira ein Spirillum oder ein Bacillus.*«

Een tegenovergesteld standpunt wordt met evenveel beslistheid door DUCLAUX ingenomen. Na verschillende onderzoekingen te hebben aan-

[1]) l. c. pag. 234.

gehaald waarbij de vormen der bakterien op allerlei wijze in elkander overgaan, zegt hij[1]); »une classification est impossible à faire; il est impossible de trouver pour chaque microbe *un petit nombre de propriétés assez nettes et assez constantes* pour pouvoir assurer sa diagnose.« Onder „soort" verstaat daarom Duclaux een bacil van typischen vorm mèt al de afwijkende bacillen die langs experimenteelen weg uit die bacil kunnen verkregen worden.

Bij eene methodische bestudeering van het vraagstuk van de pleomorphie zal er echter altijd wel één moeilijkheid blijven die niet geheel voor oplossing vatbaar is. 't Is deze: welke van de veranderde omstandigheden, waaronder men de vorm der bakterien ziet varieeren, zijn abnormaal, d.w.z. zóó dat ze in de natuur niet voorkomen, en welke zijn normaal. Sommige schrijvers b.v. willen volstrekt niet ontkennen dat één bakterie in den vorm van staafje, vibrio en coccus kan voorkomen, indien men de kultuur maar aan *abnormale* omstandigheden blootstelt. Macé[2]) zegt, sprekende over de Proteus van Hauser: »mais

[1]) Duclaux. Traité de microbiologie 1898. Tome I pag. 260.

[2]) Traité pratique de Bactériologie 3me éd. 1897, pag. 329.

pour obtenir des variations de formes, il faut placer la Bactérie dans des conditions *défavorables*, en particulier la faire vivre dans un milieu acide.« En later: »ces modifications ne se produisent que dans des conditions déterminées«, waaronder hij dan ook weer *abnormale* verstaat.

't Is waar dat veel gevallen van pleomorphie, die bekend zijn geworden, juist het gevolg waren van abnormale levensvoorwaarden. GUIGNARD en CHARRIN [1]) kregen uit Bac. pyocyaneus lange en korte staafjes en spirillen, door antiseptische stoffen in de bouillon te doen. SCHOTTELIUS [2]) kweekte Bac. prodigiosus op bouillon met wijnsteenzuur, en kreeg lange bacillen. WASSERZUG [3]) kreeg gelijke resultaten door de bouillon gedurende 5 min. op 50° te houden. In al die gevallen konden de onderzoekers de oorspronkelijke vormen weer terugkrijgen, als ze de bakterien ook weer in hun oorspronkelijke omgeving brachten. Wanneer zij daarmede te lang wachtten, bleken de veranderingen blijvend te zijn geworden.

Andere onderzoekingen echter, te veel om op

[1]) Sur les variations morphologiques des microbes. Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 5 Déc. 1887.

[2]) Kölliker's Festschrift. Leipzig 1887.

[3]) Annales de l'Institut Pasteur II en III.

te noemen, zijn er gedaan waarbij veranderingen optraden onder gewijzigde omstandigheden, die men niet anders dan door een blind vooroordeel abnormaal zou kunnen noemen. In zulke gevallen nemen de vurige tegenstanders van de veranderlijkheid hun toevlucht tot een ander wapen. De onderzoekers zijn dan bij hun vermeende reinkultuur niet van één cel uitgegaan, òf de kultuur is later door luchtinfectie verontreinigd.

Het is niet te loochenen dat beide gevallen, waarover ik hier een enkel woord wil zeggen, kunnen voorkomen. Ik zal bij de proeven van PASTEUR, MIQUEL en HESSE, die hebben aangetoond dat de kans voor luchtinfectie uiterst gering is, niet uitweiden, daar ze algemeen bekend zijn. Als men verder onder de noodige voorzorgen werkt, en de proeven waar het op aankomt, (zooals de hiervolgende betreffende pleomorphie) niet maar ééns doet, doch gelijktijdig in *verschillende seriën* en als men ze daarna nog eens herhaalt, dan is men er zeker van dat luchtinfectie geen aanleiding tot vergissingen kan hebben gegeven.

Het andere genoemde bezwaar, dat men bij de reinkultuur, verkregen volgens de KOCH'SCHE

methode niet van één cel is uitgegaan, acht ik van grooter beteekenis.

Van verschillende kanten is aangetoond, dat de plaatkultuur-methode, wanneer men slechts ééns een plaat uitgiet en uit de daarin ontstane kolonies kulturen aanlegt, niet te vertrouwen is. Holm [1]) heeft haar voor gistcellen gecontroleerd. Hij deed 23 proeven; slechts in één geval bleek het dat de 100 kolonie's uit 100 cellen ontstaan waren, terwijl bij de andere gemiddeld 100 kolonies uit 108 cellen waren gevormd. In het ongunstigste geval vond hij zelfs dat 100 kolonies uit 135 cellen waren ontstaan.

Miquel [2]) heeft een dergelijk onderzoek voor bakterien gedaan. Van een plaatkultuur werd uit 100 kolonies in 100 kolven met bouillon geënt. Het onderzoek van de kolven toonde 134 verschillende soorten mikro-organismen. De fout schuilt hierin, dat door schudden niet altijd de cellen goed van elkaar gescheiden worden.

Nu is het een feit dat veel onderzoekers de gewoonte hebben om slechts éénmaal een plaat

---

1) Uber die Methoden der Reinkultur und im besonderen über die Plattenkultur von Koch und über die Fehlergrenze dieser Methode. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Pag. 458 e.v. München 1891.

2) Dixième mémoire sur lès poussières organisées de l'air et des eaux. Ann. de Montsouris 1888.

uit te gieten en daaruit (natuurlijk als de kolonies niet te dicht op elkaar zitten) terstond hun kulturen aan te leggen. 't Is daarom in 't algemeen een volkomen gemotiveerde tegenwerping wanneer de bestrijders van de leer der pleomorphie het optreden van veranderde vormen toeschrijven juist aan de onbetrouwbaarheid van de plaatkultuurmethode. Maar ik betwijfel of *alle* onderzoekers Koch's methode zoo toepassen, en of daarom dit verwijt in *alle* gevallen mag gelden. Velen zullen ongetwijfeld niet uit de eerst ontstane kolonies direct hun kulturen hebben aangelegd, maar uit die kolonies eerst nogmaals een plaat hebben gegoten, en dit eenige malen herhaald hebben vóór zij hun eigenlijke proeven deden. En veranderlijkheid, gevonden bij *zulke* proeven, mag niet zoo maar geloochend worden. *Ik voor mij* geloof nl. dat, onder die voorzorgen, de methode van Koch in vertrouwbaarheid *veel* heeft gewonnen. [1]) En ongetwijfeld is dit ook de bedoeling

[1]) Dit geldt natuurlijk alleen, als men te doen heeft met kleine cellen, waarop niet licht andere gaan vastzitten. Voor *groote* cellen, die uit een sterk verontreinigd medium komen, en die dikwijls bezet zijn met bakteriën, *blijft* (zooals ik al in de inleiding zeide) het bezwaar bestaan dat ze door schudden niet geïsoleerd kunnen worden, zelfs als men de plaatkultuur-methode *meerdere* malen toepast.

geweest van den uitvinder, wiens methode niet in waarde mag verliezen, omdat anderen haar op verkeerde wijze toepassen.

Maar *absolute* betrouwbaarheid *kan* ze niet geven. JÖRGENSEN [1]) zegt daarom ook: „Wenn man auch die Plattenkulturen mehreremale wiederholt, so weiss man doch in Wirklichkeit nie, ob das Ziel erreicht ist oder nicht." Daarom heeft HANSEN [2]) de methode van KOCH in dien zin gewijzigd voor gistcellen, dat hij op een groot dekglas een gelatineplaat uitgiet die zóó dun is, dat men onder het mikroskoop kan controleeren of de cellen gescheiden zijn, en waar ze liggen. Die plaatsen worden aangeduid, en men kan de ontwikkeling van de kolonies van het eerste begin af nagaan. Voor bakteriën is dit principe natuurlijk niet door te voeren, daar men ze niet in een gelatine-laag, hoe dun die ook is, kan zien liggen en nog minder ze kan onderscheiden van kleine vaste bestanddeelen die er altijd in ontzettende massa in voorkomen.

Ik meen daarom dat mijn isolatie-methode noodig is voor een beslissend onderzoek over de

---

[1]) Die Mikro-organismen der Gärungsindustrie. Berlin. Paul Parey. 1898 pag 37.

[2]) Ibid. pag 35 (zie aldaar ook litteratuur.)

veranderlijkheidsverschijnselen bij bakteriën, en wel allereerst omdat men er hierbij zeker van is dat het uitgangspunt van de kultuur één cel is, vervolgens omdat men de variatie al bij de eerste cellen van de kolonie kan controleeren en niet het minst omdat ze den weg kan banen tot een vergelijkend onderzoek van *alle* opeenvolgende generaties.

De proeven die ik heb genomen zijn minder dan men na deze lange inleiding zou verwachten. De reden hiervan is, dat ik gedwongen werd ze af te breken. Wat ik echter heb gevonden, acht ik niet te onbelangrijk om hier mede te deelen.

Dr. KOHLBRUGGE [1]), privaatdocent in de klimatologie en tropische ziekten aan de Universiteit alhier, had voor een onderzoek van faeces gelatine-platen aangelegd, en uit de kolonies in buisjes met vleesch-gelatine overgeënt. Na eenigen tijd vond hij in 2 buisjes een mengsel van staafjes en vibrionen, en omdat hij toch met een onderzoek over vibrionen bezig was, wilde hij deze laatste isoleeren. Hij goot ten tweeden male een plaat, ditmaal van vleesch-agar. Van de ontstane kolonies vertoonde er echter geen enkele vibrionen,

[1]) Symbiose zweier pleomorpher Faeces-Bakteriën. Arch. für path. Anat. Bd. 163. Hft. 3.

maar alle bestonden uit korte staafjes. Hij entte over in buisjes met glycerine-gelatine en 't resultaat was weer: alleen zeer korte staafjes. Na eenigen tijd echter, toen deze buisjes vervloeid waren, onderzocht hij ze nogmaals, en — toen kwamen er naast de staafjes weer vibrionen voor. Hij goot toen uit die vervloeide buisjes nogmaals een agarplaat, en 't gevolg was dat hij *weer* niets dan korte staafjes vond. Uit dezelfde buisjes goot hij ook een gelatine-plaat en entte hij een steekkultuur in vleesch-gelatine. In 't begin trof hij niets dan korte staafjes aan, en later, als de gelatine vervloeid was, naast de staafjes ook vibrionen.

Op geenerlei wijze kon hij echter een reinkultuur van vibrionen krijgen; wèl van staafjes, als hij n.l. een kultuur in bouillon, waarin beide voorkwamen, bij 37° zette. Daarin schenen de vibrionen af te sterven, terwijl de staafjes overbleven.

De heer KOHLBRUGGE deelde mij eindelijk, nadat alle pogingen om de zaak op te lossen, waren mislukt, het raadselachtige geval mede, en verzocht mij of ik niet eens een vibrio uit een vervloeide kultuur voor hem zou willen isoleeren.

Ik isoleerde er eenige; de kultuurdruppels be-

stonden uit vleesch-gelatine. De dekglaasjes waarop geïsoleerd was, werden gelegd op vochtige kamers, waarin ik, op den bodem, nog een druppeltje water bracht. Den volgenden dag, 's morgens, waren de kolonies al opgekomen en konden wij met de sterkste vergrooting het krioelen van de vibrionen prachtig zien. Den daaropvolgenden dag waren de kolonies sterk in grootte toegenomen; ze besloegen ongeveer $^1/_4$ van de grootte van den kultuurdruppel. In alle zagen wij sterk bewegelijke vibrionen. Wij maakten er ook gekleurde praeparaten van, en zagen er niets dan vibrionen in. Daarna werd uit de kolonies geënt in 3 verschillende voedingsbodems, n.l. gewone vleesch-gelatine, id. die 10 × verdund, en dus vloeibaar was en pepton-water (1 % pepton).

Na twee dagen maakten we gekleurde praeparaten van deze kulturen. In de kulturen op gewone gelatine waren naast de vibrionen, ook staafjes te zien, van beide ongeveer evenveel. De kulturen in de *vloeibare* voedingsbodems vertoonden bijna alleen vibrionen.

Ook isoleerde ik 2 vibrionen in vleeschgelatine en legde ik het dekglaasje op een vochtige kamer waarin ik *geen* waterdruppel op den bodem bracht. De oppervlakte van de kultuurdruppels

was hier dus droog. In verband daarmede was er ook een verschil te zien in gedaante van de bakterien uit de kolonies. Terwijl in de vorige kolonies, die waren opgekomen in een met waterdamp verzadigde ruimte, alle bakterien na eenige dagen nog als sterk bewegelijke vibrionen dooreen krioelden in het condensatie-water dat op de kultuurdruppels was neergeslagen, ontstonden hier uit de geïsoleerde vibrio reeds in het begin dikke vibrionen, die onbeweeglijk waren (waarschijnlijk omdat ze volkomen droog lagen) terwijl een onderzoek van de kolonies, toen ze 3 dagen oud waren, naast de dikke vibrionen, reeds staafjes te zien gaf.

Alles resumeerende bleek dus in alle geval met *volkomen* zekerheid uit deze proeven, *dat een vibrio staafjes kan voortbrengen*. Wat de omstandigheden, waaronder dit plaats grijpt, betreft, was het zeer waarschijnlijk dat de physische natuur van den voedingsbodem hierbij een groote rol speelt, en wel in dien zin, dat op een vasten voedingsbodem staafjes, op een vloeibaren vibrionen ontstaan. *Waarom* in vloeibare voedingsbodems in het begin nog enkele staafjes naast de vibrionen voorkomen, zou ik niet durven zeggen. Bij cholera-kulturen is dit echter ook een gewoon

verschijnsel. Uit de kulturen met vibrionen kan men weer de staafjes terugkrijgen, door op vaste voedingsbodems te enten, en uit de kulturen met staafjes de vibrionen, door ze in vloeibare media over te brengen. We hebben hier dus een verschijnsel van een niet-erfelijke variatie. Het geval vormt een pendant van hetgeen BONNIER [1]) bij hoogere planten naging. Deze onderzoeker plaatste planten uit de vlakte op de bergen, zag daar veranderingen optreden, bracht ze daarna weer op de vlakte, en vond dat ze hun vorige gedaante weer aannemen.

Ik besloot later, hoewel deze proeven wel aanspraak konden maken op nauwkeurigheid, daar ze niet met één, maar met *meerdere* geïsoleerde vibrionen gedaan waren, deze kwestie nog eens na te gaan. Speciaal wilde ik nog eens zien binnen hoeveel tijd men uit een vibrio een staafje, en uit een staafje weer een vibrio kon maken.

Ik isoleerde 4 vibrionen in kultuurdruppels van vleesch-gelatine. Twee er van liet ik zich ontwikkelen in een vochtige kamer zonder water op den bodem, de andere mèt een waterdruppel. Na 2 dagen controleerde ik de kolonies. De

---

[1]) Recherches expérimentales sur l'anatomie des végétaux. Impr. typographique. Corbeil (S. et O.) 1896.

eerste bestonden uit dikke, onbewegelijke, de laatste uit dunnere, sterk bewegelijke vibrionen. Ik entte van de kolonies over op vleesch-agar, uit iedere kolonie in één buisje. Na 2 dagen bleek het, zoowel uit onderzoek van de levende cellen als uit gekleurde praeparaten, dat in alle buisjes niets dan zeer kleine bewegelijke staafjes (hoogstens 1 μ lang) voorkwamen, sommige zóó kort, dat het bijna kokken waren. Van uit ieder dezer agar-buisjes entte ik over in bouillon, bouillon-gelatine en 10 × verdunde bouillon-gelatine. Na twee dagen bleken alle vloeibare voedingsbodems niets dan groote, sterk bewegelijke en sterk gekromde vibrionen te bevatten, terwijl op de vleesch-gelatine alleen kleine, bewegelijke staafjes voorkwamen. Binnen 6 dagen was dus de overgang van vibrio tot staafje en van staafje weer terug tot vibrio afgeloopen.

Nog een enkel woord wil ik hieraan toevoegen naar aanleiding van een opmerking die de heer KOHLBRUGGE in de hierboven genoemde verhandeling maakt [1]). Hij zegt daarin dat het staafje uit het mengsel van de vibrionen en staaf-

[1]) l.c. pag. 375.

jes, dat ik óók voor hem isoleerde, na de isolatie de gelatine niet meer deed vervloeien, en daarvoor wèl. Dit was volkomen waar. De reden van dit verschijnsel en ook nog van een ander, dat n.l. geïsoleerde bakterien soms niet op kwamen, kon zooals mij later bleek, tweeërlei geweest zijn. Ik gebruikte in het begin voor het isoleeren dikwijls glaasjes die op het oog volkomen schoon waren, maar toch (waarschijnlijk door een voorafgaand verblijf in chloroform, die onder inwerking van het licht ontleed werd) een schadelijken invloed konden uitoefenen op de bakterien. Later koos ik met zorg mijn dekglaasjes uit, en nam ik bij voorkeur nieuwe. Een andere reden was dat ik bij het steriliseeren der naalden deze soms dieper in het zwavelzuur stak dan in de ammonia. Daardoor diffundeerde het overtollige zuur naar de punt van de naald, ten nadeele natuurlijk van de geïsoleerde bakterien. Toen ik, onder vermijding van deze fouten, het staafje nogmaals isoleerde, bleek zijn vervloeiingsvermogen na de isolatie even sterk te zijn. Van een niet-opkomen der kolonies had ik toen ook geen last meer.

HOOFDSTUK VI.

Conclusies.

I. De methode en haar toepassingen.

1. De nieuwe methode voor het maken van reinkulturen komt in 't kort hierop neer dat onder het microscoop, zoo noodig met de sterkste vergrooting, met behulp van fijne glazen naalden één cel uit een druppel met verschillende mikroorganismen wordt geïsoleerd, en overgebracht in een steriele druppel, waarin zij zich tot een reinkultuur vermenigvuldigt.

2. Het nadeel van de methode (indien ik dit een nadeel mag noemen) bestaat hierin dat zij aan hen die haar gebruiken hoogere eischen stelt dan die van Koch. Ik vermoed daarom dat zij voor beslist onhandige personen altijd min of meer een struikelblok zal blijven. Ook vordert zij wel wat meer tijd.

3. Het algemeene voordeel bestaat hierin dat men *volkomen zekerheid* heeft dat de reinkultuur in kwestie uit niet meer dan *één cel* is ontstaan,

en verder dat men de cel die men wil isoleeren, kan uitkiezen en na de isolatie nauwkeurig kan controleeren wat er met die cel gebeurt. De ontwikkeling van de reinkultuur kan men dan ook van het allereerste begin af met sterke vergrooting nagaan, vooral als de voedingsbodem vast is.

Dit zijn voordeelen die de methode van KOCH niet aanbiedt, daar zij nooit *volkomen* zekerheid kan geven dat alle kolonies uit één cel zijn ontstaan; daar het verder, als men een plaat uitgiet, altijd onbekend voor ons blijft welke cellen er sterven, welke zich verder ontwikkelen, en wat er in het begin met deze laatste gebeurt [1]); en eindelijk omdat men bij een plaatkultuur nooit de geschiedenis van de kolonies met de *sterkste* vergrooting kan controleeren.

4. Men kan met deze methode (behalve natuurlijk alle reinkulturen die men door middel van de plaatkultuur-methode óók kan maken) reinkulturen maken uit cellen die meestal door bakteriën zijn verontreinigd.

---

1) Er kunnen zich dan ook bij het gieten van plaatkulturen dikwijls zeer raadselachtige gevallen voordoen, waarbij KOCH's methode, zelfs bij herhaalde toepassing, ons in den steek laat (c.f. in hoofdstuk V de vibrionen van KOHLBRUGGE.)

5. De methode kan dienen voor een beslissend onderzoek van alle mogelijke kwesties betreffende pleomorphie. Men gaat hier n.l. van één cel uit, en kan terstond zien welke de vorm is van de cellen die er uit ontstaan. Ik betwijfel niet of men zal ook alle opeénvolgende generaties kunnen onderzoeken.

Zijn bovengenoemde toepassingen speciaal voor het maken van reinkulturen, er zijn echter nog andere. Men zal met behulp van deze methode allerlei mikröorganismen met elkander in aanraking kunnen brengen of aan verschillende omstandigheden blootstellen. Men zal er dus b.v.

6. de kwestie van de copulatie mede kunnen onderzoeken. Er zijn bij dierlijke en plantaardige organismen veel gevallen waarin men niet weet of men met copulatie te doen heeft. Dit is natuurlijk haast niet uit te maken wanneer zulke cellen, die dikwijls bewegelijk zijn, zich in groote druppels bevinden tegelijk met andere organismen. Thans is men in staat om, op één dekglas, in verscheidene kleine druppeltjes twee cellen te zamen te brengen, en kan men dus veel gemakkelijker nagaan of er copulatie plaats grijpt. Kon men dit vroeger alleen bij toeval zien, thans heeft men een *zekere* methode.

7. Men zal onder het mikroskoop verschillende experimenten over symbiose en parasitisme van lagere organismen kunnen doen, en deze van den aanvang af kunnen controleeren.

8. Ten slotte wil ik er nog op wijzen dat voor zuiver technische doeleinden het isolatietoestel nuttig kan wezen. Het sorteeren van zeer fijn plankton-materiaal en het maken van duurzame praeparaten daarvan, (vooral van afzonderlijke organen) zal er gemakkelijker en met meer dere juistheid mede kunnen geschieden dan onder de loupe of het praepareermikroskoop uit de vrije hand. Het onderzoek of het teekenen van levende mikroörganismen, die sterk bewegelijk zijn (b.v. Infusorien, zwermsporen) is dikwijls niet mogelijk, daar zij gedurig buiten het gezichtsveld van het mikroskoop verdwijnen. Met behulp van het isolatie-toestel kan men ze echter in een klein druppeltje isoleeren, desnoods zóó klein, dat ze er juist in passen, en dus niet kunnen ronddraaien.

II. De methode toegepast op de reinkultuur van een saprophytischen schimmel.

1. Met behulp van deze methode is geïsoleerd een zwermspore van Achlya sp. Het

mycelium werd gekweekt op meelworm-voedingsbodems, glucose-pepton, eiwit en rijst. In al deze bleef het vegetatief.

2. Sporangiën werden verkregen door plotselinge voedselonttrekking.

Omdat er weinig bekend was over de voedingsphysiologie van schimmels die op dieren saprophytisch leven, is er over deze kwestie een en ander onderzocht.

3. Het beste N-voedsel was, wanneer glucose als C-voedsel diende, pepton. Veel minder goed was amm. sulfaat, en dan kwamen in afnemende volgorde: asparagine, ureum, kal. nitraat en natr. nitriet. Het laatste werkte als vergift.

4. Wanneer amm. sulfaat als N-voedsel werd gegeven, was het beste C-voedsel aardappelmeel, en dan kwamen in afnemende volgorde: maltose, melksuiker, glucose, laevulose-stroop en saccharose. Cellulose, kal. citraat en kal. tartraat werden niet opgenomen. Natr. benzöaat, natr. butyraat en kal. acetaat werkten als vergift.

5. Pepton is zoowel C- als N-voedsel.

6. Vetten worden als C-bron niet opgenomen.

7. De schimmel kan ook anaëroob gekweekt worden. Daarbij wordt er alkohol gevormd.

8. Onder sommige omstandigheden ontstaan

er zuren (b.v. bij voeding met glucose-pepton, en dan vermoedelijk uit de glucose).

9. De schimmel zet amylum om in dextrine, en daarna in d-glucose. Dit geschiedt door een amylolytisch enzym.

10. Verder scheidt de schimmel nog een proteolytisch enzym af, dat o.a. de gelatine vloeibaar maakt. Dit werkt in alkalische en in zure oplossingen (is dus tryptisch).

11. Een vetsplitsend enzym wordt niet afgescheiden.

III. De methode toegepast voor het onderzoek van het vraagstuk der pleomorphie.

1 Met volkomen zekerheid is het bewezen dat een vibrio in een staafje en een staafje in een vibrio kan veranderen.

2. De bacil die voor deze proeven diende, vertoonde den vorm van een groote vibrio op een gewonen vloeibaren voedingsbodem en den vorm van een kort staafje op denzelfden voedingsbodem wanneer die met gelatine was vast gemaakt.

3. De overgang van vibrio tot staafje en van staafje weer tot vibrio kan binnen 6 dagen afloopen.

IV. Aanhangsel, bevattende een gewijzigde en een nieuwe methode voor enzym-onderzoek.

1. De bekende methode voor het onderzoek van proteolytische enzymen werd zóó gewijzigd dat het enzym niet alleen inwerkt op een dikke laag gelatine op den bodem van een reageerbuisje, maar óók op een zeer dunne laag tegen den wand, waarvan men het oplossen (óók doordat de laag met vermiljoen is roodgekleurd) zeer spoedig kan zien.

2. Er werd geëxperimenteerd met een nieuw toestel dat in staat stelt de enzymen van schimmels te onderzoeken, zonder den nadeeligen invloed van antiseptica of van een bakteriënfilter. In dit apparaat wordt de schimmel rein gekweekt en daarna wordt de kultuur, *terwijl het toestel gesloten blijft*, gefiltreerd door een watteprop, waarna men de kultuurvloeistof en het mycelium (het laatste na fijnwrijving) op hun enzym kan onderzoeken.

PLAAT I.

FIG. 1. Schematische voorstelling van het isolatie-toestel, op doorsnede (pag. 10—13).
» 2. id. van het toestel waarmede uit den kultuur-druppel in voedingsbodems wordt geënt. (pag. 53).
» 3. Platina-draad, waaruit een dito-mesje wordt vervaardigd. (pag. 66).
» 4. Isoleer-dekglaasje met materiaal- en kultuur-druppels. (pag. 40).
» 5. Materiaal- en kultuurdruppel, bij zwakke vergr. (pag. 42).
» 6—8. Het isoleeren van een bakterie uit den materiaaldruppel, bij sterke vergr. (pag. 42/43).
» 9—11. Het overvoeren van een bakterie, op doorsnede. (pag. 43—46).
» 12—14. De 3 soorten van isoleernaalden. (pag. 15/16).
» 15—17 en 19—21. Isoleernaalden, in bewerking. (pag. 17—24).

PLAAT II.

FIG. 18. Schematische voorstelling van het toestel waarmede de isoleernaalden worden vervaardigd. (pag. 21—23).
» 22—33 en 35—39. Isoleernaalden in bewerking onder het mikroskoop van bovengenoemd toestel. (pag. 24—32).
» 34. Onbruikbare dikke, oogvormige isoleernaald. (pag. 31).
» 40. Wig voor het afknappen der dikke naalden. (pag. 33).
» 41. Apparaat voor aseptisch enzym-onderzoek van schimmels. (pag. 86—88).

STELLINGEN.

I.

Het is wetenschappelijk onjuist twee geslachten Bacillus en Vibrio te onderscheiden.

II.

Er bestaat geen betrouwbare methode voor het onderzoek van bakteriën-enzymen.

III.

Het is wenschelijk dat het woord »ferment« vervalle.

IV.

Er bestaat geen enkele reden om met BEIJERINCK aan te nemen dat heterogene celdeeling minder waarschijnlijk is door »epigenesis" dan door »evolutie". (Zie: BEIJERINCK. Over verschillende vormen van erfelijke variatie bij mikroben. Kon. Akad. van Wetensch. 27 Oct. 1900 pag. 320.)

V.

Het verdient geen aanbeveling een verschil te maken tusschen rotatie en circulatie.

VI.

De imbibitie-theorie van SACHS mag niet *geheel* worden verworpen.

VII.

De methode volgens welke tegenwoordig bij bakteriën bijna algemeen de diagnose van een

soort gesteld wordt, is niet alleen in de meeste gevallen waardeloos, maar ook nadeelig voor den vooruitgang der bakteriologie.

VIII.

Het moet nog bewezen worden dat de nitrifikatie-bakteriën niet in staat zijn organische N-houdende verbindingen als voedsel te gebruiken.

IX.

De gewone verklaring van het discontinu steriliseeren, als zouden de 2e en 3e verhitting dienen om de bakteriën te dooden welke zich ontwikkeld hebben uit sporen die bij de 1e en 2e verhitting blijven leven, is onjuist.

X.

De uitwerking van het gistsap van BUCHNER berust op de aanwezigheid van een enzym, niet van levende protoplasmadeeltjes.

XI.

Het is wenschelijk dat de naam „endothelium" vervalle.

XII.

De waarde van den ductus pneumaticus als systematisch kenmerk dient nog eens uitvoerig onderzocht te worden.

XIII.

Ten onrechte zegt O. HERTWIG (Die Zelle und die Gewebe. Bnd. II pag. 64 1898): „Bei allen einzelligen Lebewesen ist erbgleiche Theilung ihres

Zellenorganismus die einzige die vorkommt und vorkommen kann."

XIV.

Het verdient aanbeveling, om met Kleinenberg (Zeitschr. für Wiss. Zoöl. 1886) geen middelste kiemblad te onderscheiden.

XV.

Huwelijken tusschen bloedverwanten zijn slechts zelden af te keuren.

XVI.

De verklaring die HOLLEMAN (Leerboek der org. Chemie. 1896 pag. 412) geeft van de waarden der dissociatieconstanten van de 3 monochloorbenzoëzuren, is onjuist.

XVII.

Het is (althans in de Philosophische faculteit) wenschelijk, dat er vóór het eerste examen geregelde responsie-colleges worden gegeven.

XVIII.

Bij het candidaats-examen in de Plant- en Dierkunde worde geen Wiskunde geëischt.

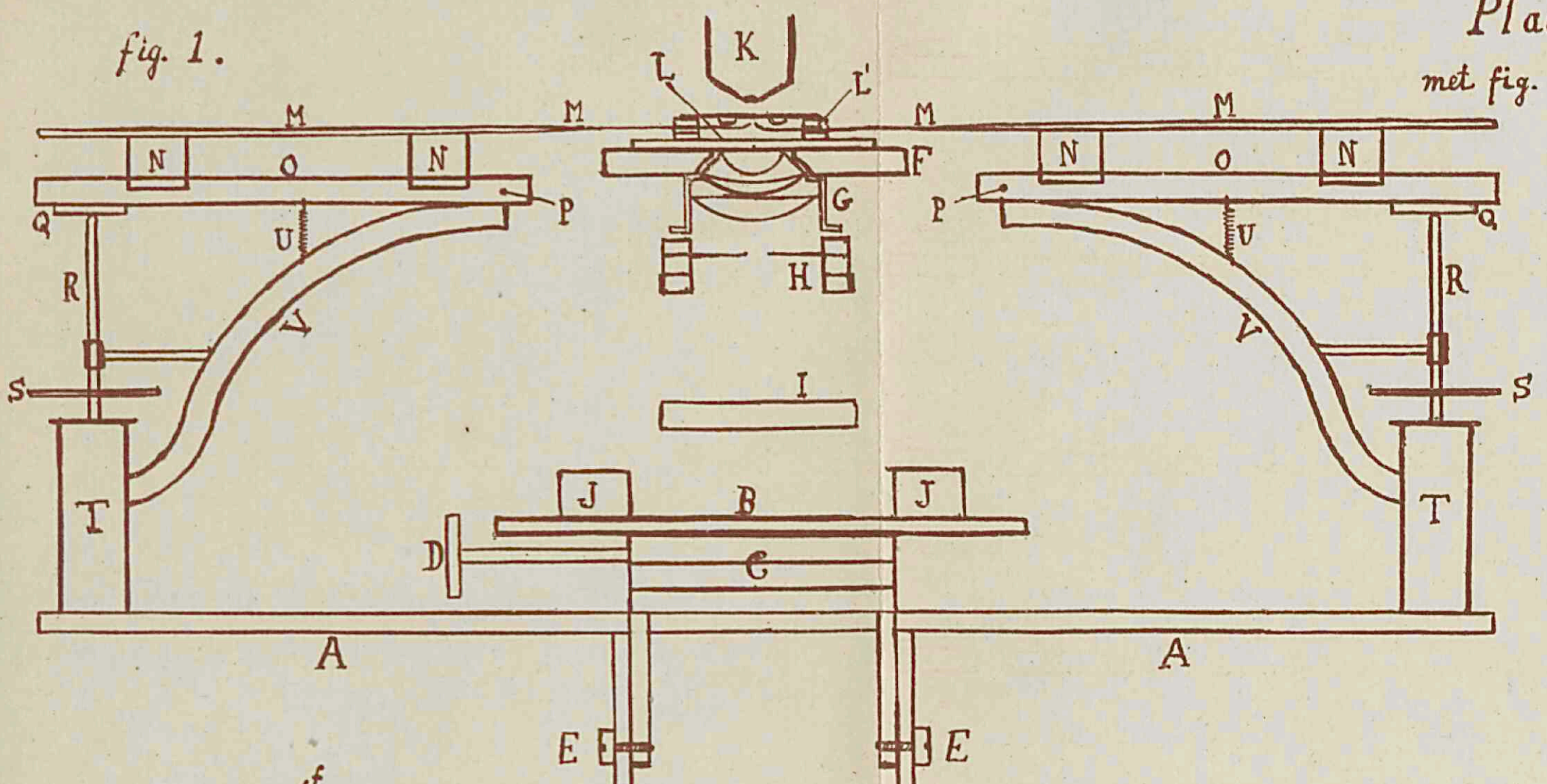
XIX.

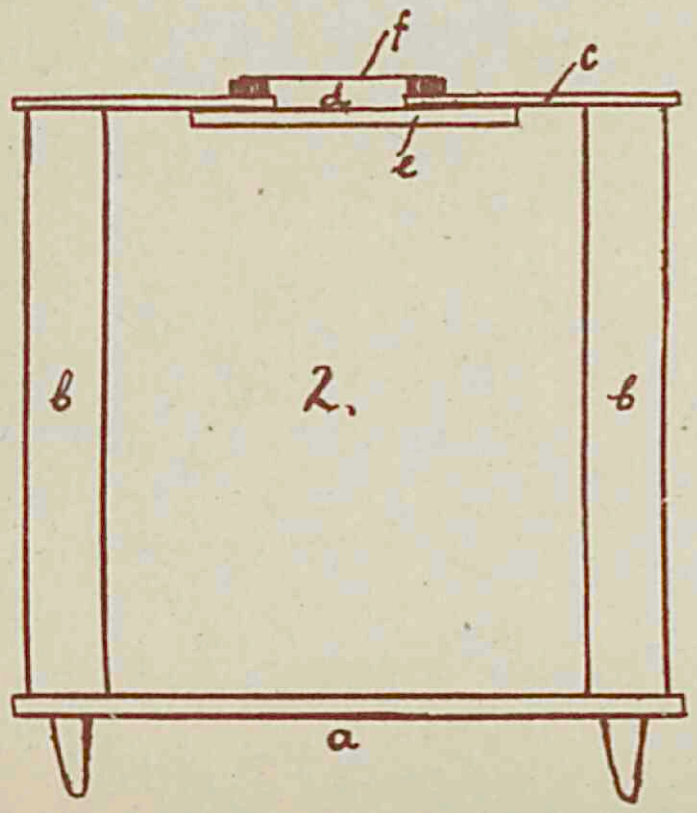
Voor a. s. natuurphilosophen en medici moeten op het eind-examen van het gymnasium Grieksch en Latijn als examen-vakken worden vervangen door Natuurlijke Historie, Natuur- en Scheikunde.

Plaat I

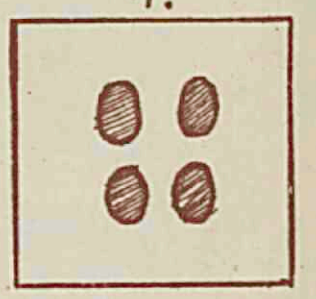
met fig. 1-17 en 19-21

fig. 1.

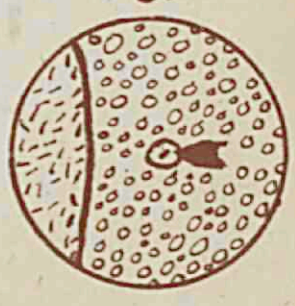




4.



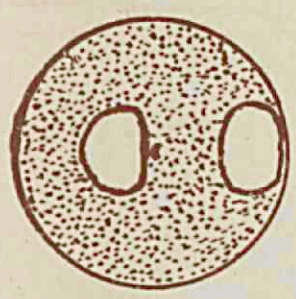
8.



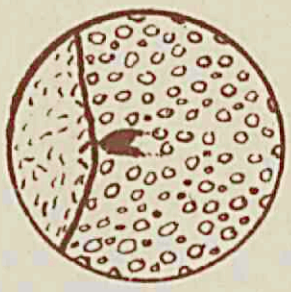


3.

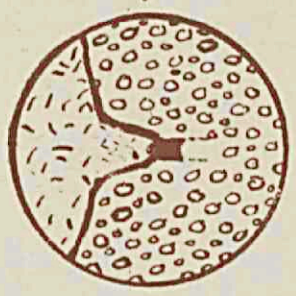
5.



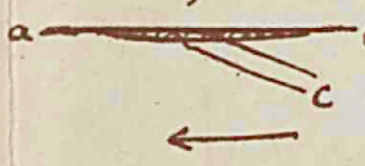
6.



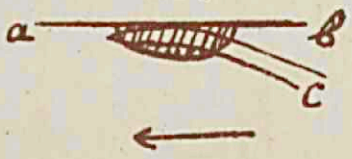
7.



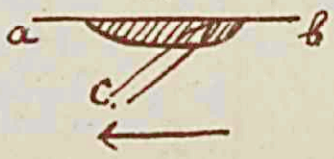
9.



10.



11.



12.



13.



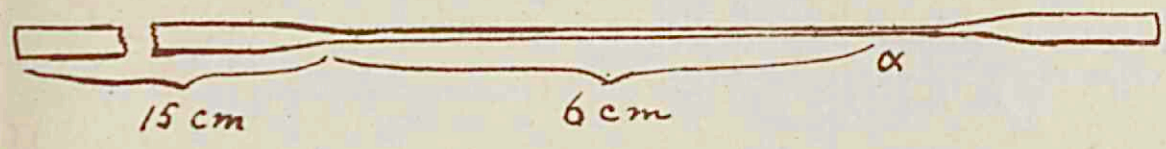
14.



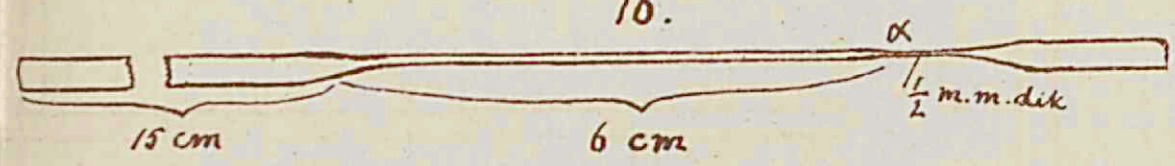
17.



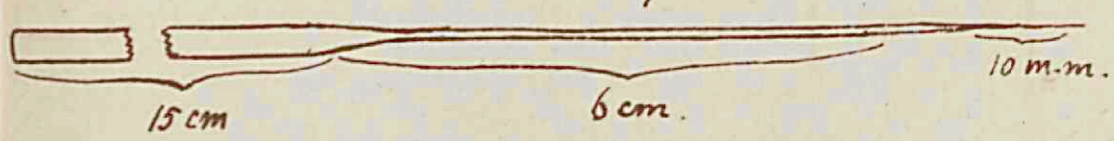
15.



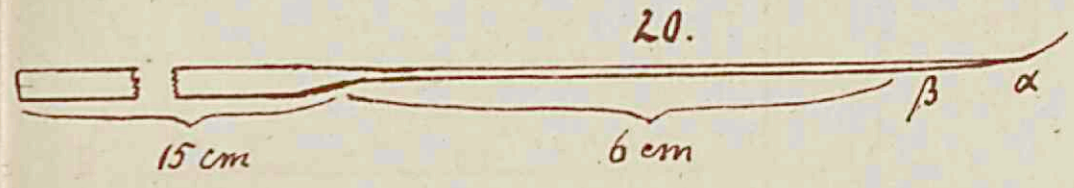
16.



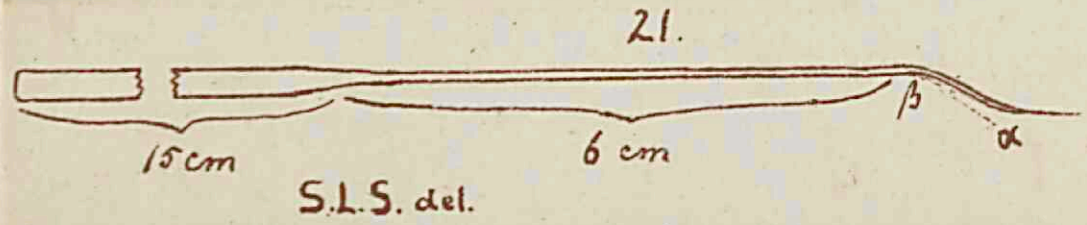
19.



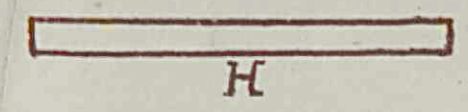
20.



21.



S.L.S. del.



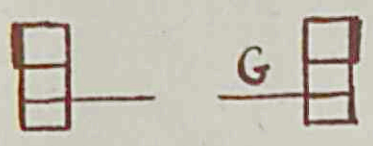
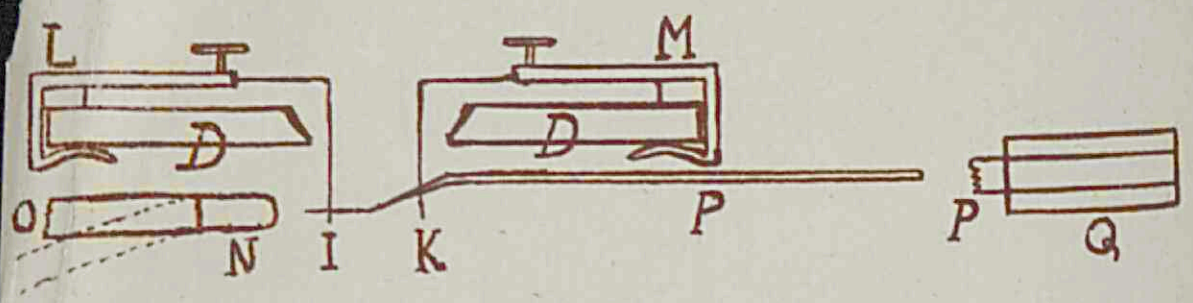
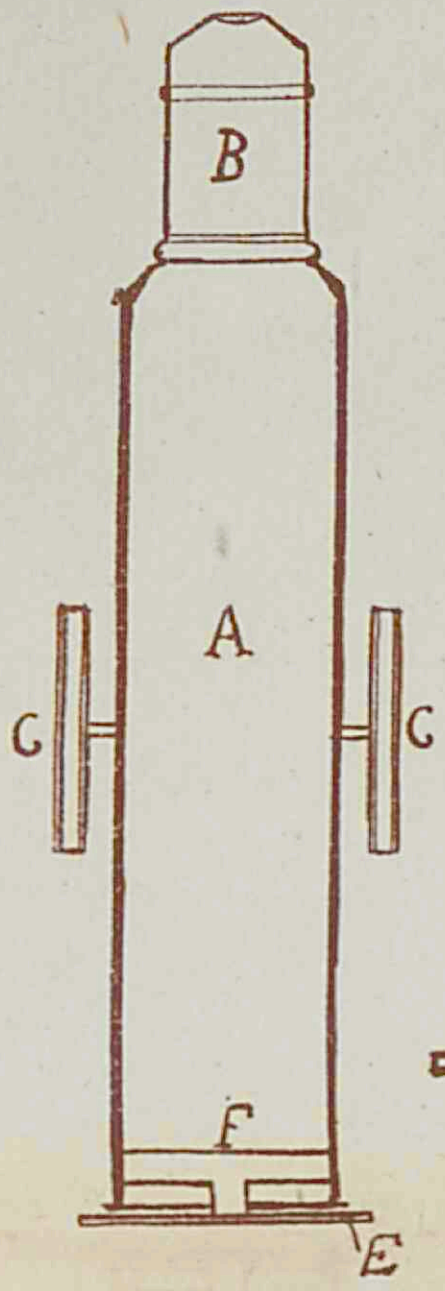


fig. 18.





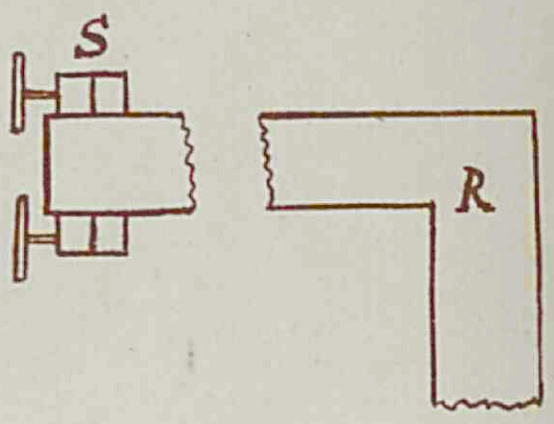
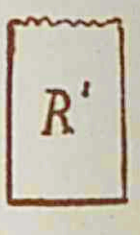
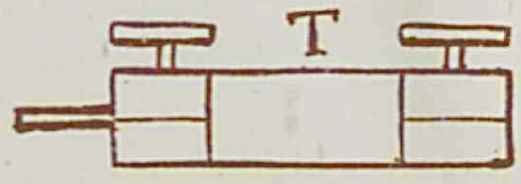


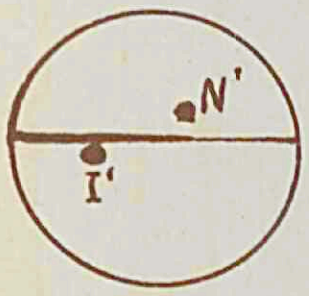
fig. 18.



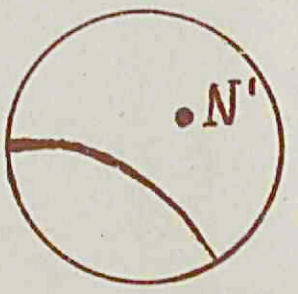


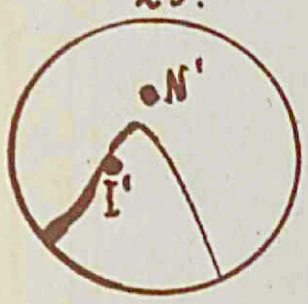
Plaat II

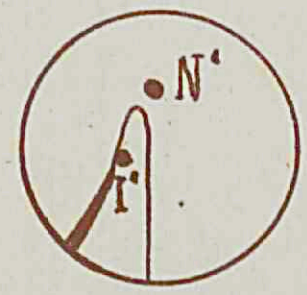
met fig. 18 en 22-41

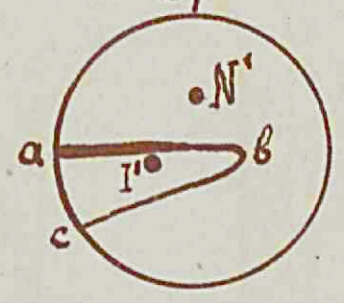


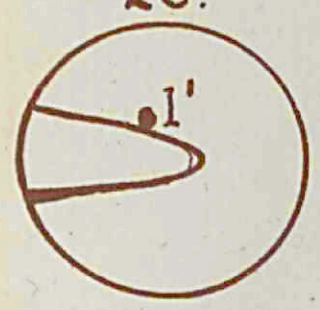


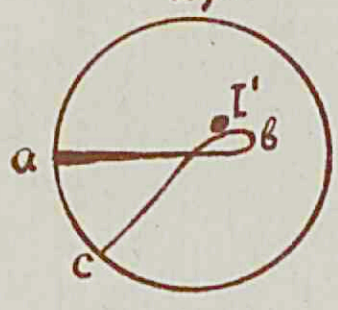


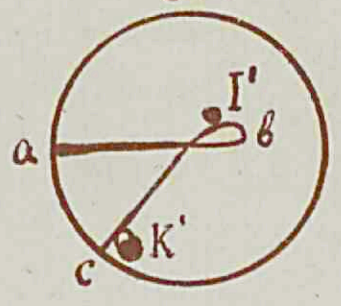


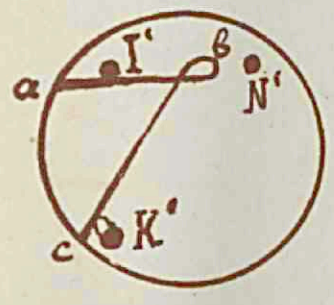


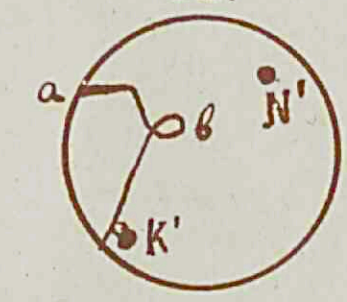


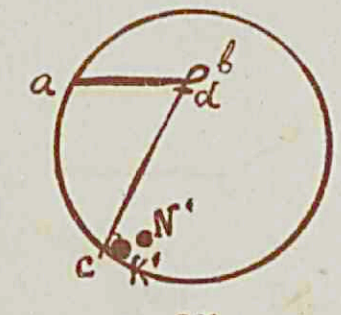


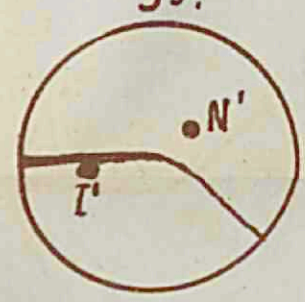


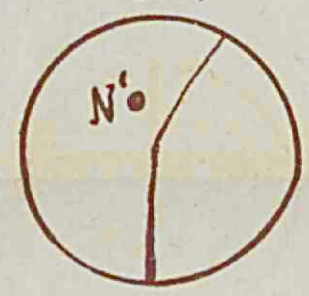




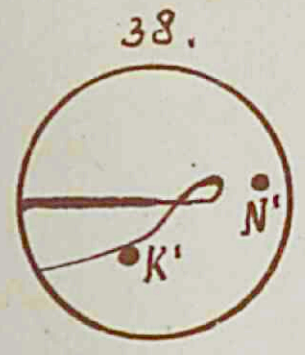


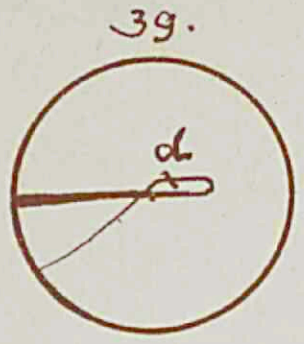


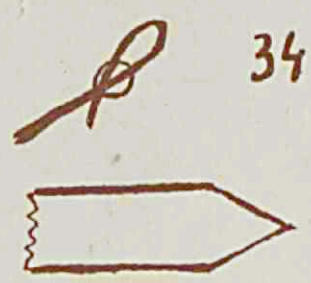












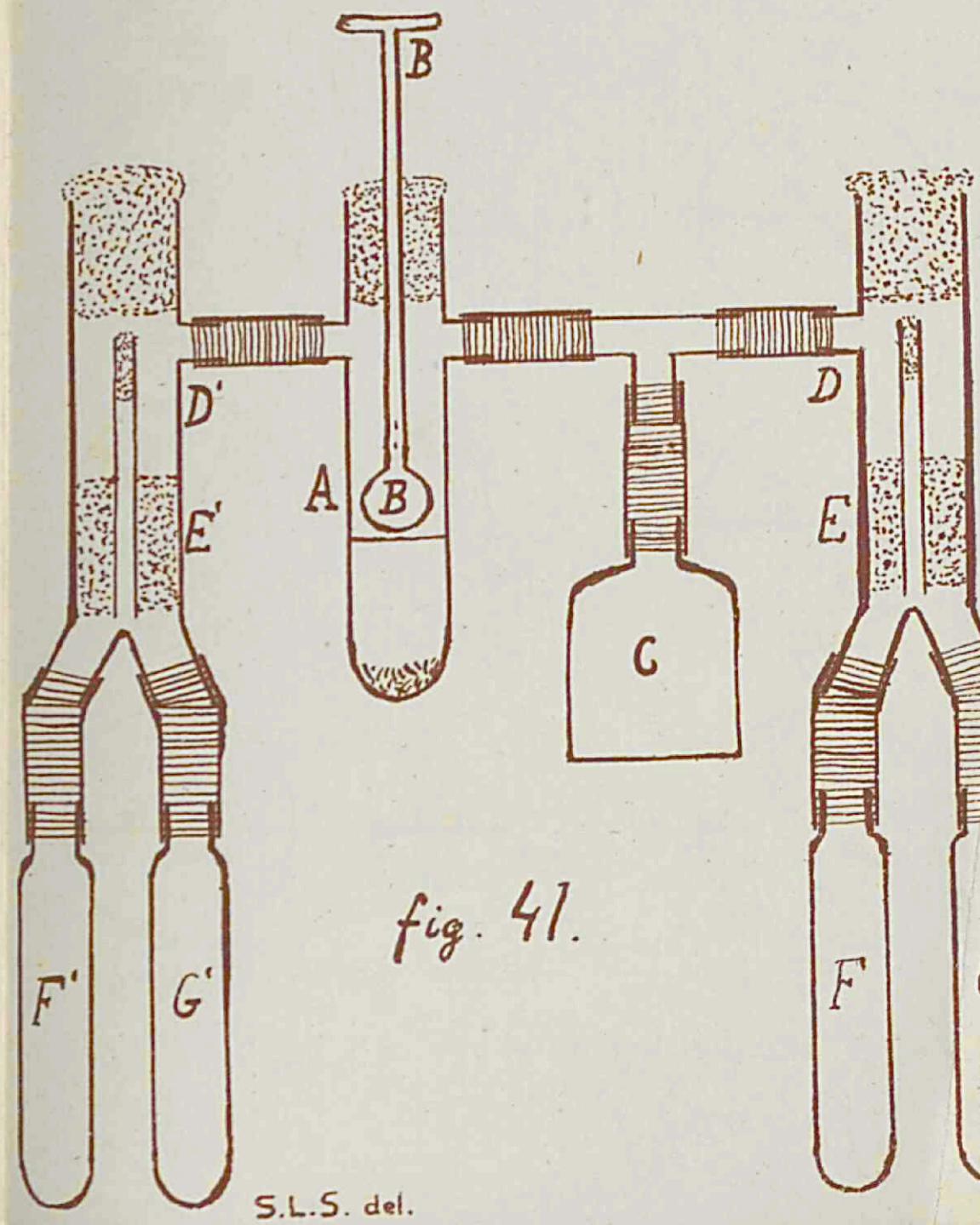


fig. 41.

S.L.S. del.