Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Koolzuurassimilatie en beperkende factoren

https://hdl.handle.net/1874/291033

A. qu. 192, 1928.

KOOLZUURASSIMILATIE EN BEPERKENDE FACTOREN

T. H. VAN DEN HONERT

Diss.
Utrecht
1928

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

KOOLZUURASSIMILATIE EN BEPERKENDE FACTOREN

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 3829

Diss. Utrecht 1928

KOOLZUURASSIMILATIE EN BEPERKENDE FACTOREN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. B. J. H. OVINK, HOOG-LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE OP WOENSDAG 13 JUNI 1928, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

TACO HAJO VAN DEN HONERT,

GEBOREN TE BAARN

DRUKKERIJ P. DEN BOER

SENATUS VETERANORUM TYPOGRAPHUS ET LIBRORUM EDITOR

UTRECHT MCMXXVIII

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS
EN MIJN BRUID

VOORWOORD.

Weinig publicaties zijn zoozeer als een proefschrift een weerspiegeling van de factoren, die invloed hebben uitgeoefend op de wetenschappelijke vorming van den schrijver. Daarvan ben ik mij bij het werk, dat ik in de volgende bladzijden heb beschreven, ten volle bewust geweest.

In de eerste plaats zijt Gij het, mijn ouders, die mij geleid hebt in de richting, die voor mij de eenige juiste was. Ik kan U daarvoor nimmer dankbaar genoeg zijn.

Ik beschouw het als een groote eer, Hooggeleerde W e n t, hooggeachte promotor, dat ik zal behooren tot degenen, die bij U hun dissertatie hebben bewerkt. Gij bezit de gave om in Uw laboratorium een opgewekt wetenschappelijke spheer te scheppen. Het groote respect dat Uw voorbeeld afdwingt, maakt dat men U slechts het beste wil toonen, waartoe men in staat is. Niettegenstaande Uw kritischen geest laat ge aan het persoonlijk initiatief van Uw leerlingen groote vrijheid en heeft elke nieuwe richting van onderzoek Uw belangstelling. Dat Ge nimmer twijfel hebt doen blijken in den uitslag van mijn onderzoek, waar ik zelf menigmaal twijfelde, is voor mij een groote steun geweest om vol te houden, tot een resultaat was bereikt. Ik ben U voor dit alles ten hoogste dankbaar.

Hooggeleerde J o r d a n, het is slechts na lange aarzeling, dat ik de dierphysiologie heb vaarwel gezegd. Uw diep inzicht in physiologische problemen heeft op mijn denkwijze een grooten en blijvenden invloed gehad.

Hooggeleerde N i e r s t r a s z, met veel genoegen denk ik terug aan de jaren, dat ik bij U assistent was. De vergelijkende anatomie, zooals zij door U wordt gedoceerd, heeft voor mij steeds haar bekoring behouden. Ook aan den omgang met U, Zeergeleerde H i r s c h en E n t z, benevens het vele, van U geleerd, denk ik met dankbaarheid terug.

Hooggeleerde P u l l e, hoewel ik in den laatsten tijd mij niet met plantensystematiek heb beziggehouden, hoop ik in de komende jaren meer van het van U geleerde te zullen profiteeren.

Hooggeleerde v a n R o m b u r g h, Zeergeleerde S t r e n g e r s, U ben ik zeer dankbaar voor de wijze, waarop gij mij in de gelegenheid hebt gesteld, mij op het gebied van de organische en anorganische chemie verder te ontwikkelen.

Hooggeleerde K r u y t, het feit dat de gedachtengang, welke aan dit proefschrift ten grondslag ligt, op Uwe colleges is ontstaan, bewijst voldoende, welk een beslissenden invloed gij op mijn vorming hebt gehad.

Hooggeleerde O r n s t e i n, S c h o o r l en K o l t h o f f, Zeergeleerde v a n C i t t e r t, de bereidwilligheid, waarmede gij mij als vreemde in Uw laboratoria behulpzaam zijt geweest, valt niet genoeg te waardeeren.

Ik beschouw het als een gunstige lotsbeschikking, dat ik U, Hooggeleerde B a a s B e c k i n g, in het laatste jaar van mijn studie heb leeren kennen en waardeeren. Moge het U gegeven zijn verder door te dringen in het raadsel, dat Chlorophyl heet.

Waarde D o l k, zeer veel heb ik gehad aan de talrijke gesprekken, met U gevoerd. Ik hoop, dat ik nog dikwijls in de gelegenheid zijn zal, om met U van gedachten te wisselen.

Ik zou het niet gewaagd hebben een onderzoek te beginnen, dat aan de techniek aanzienlijke eischen stelt, indien ik niet zeker was geweest van de hulp van een bekwaam technicus. Gij, waarde P. A. d e B o u t e r, hebt U op voortreffelijke wijze van Uw moeilijke taak gekweten.

U, waarde A. d e B o u t e r, dank ik voor het keurige teekenwerk.

INHOUD.

HOOFDSTUK I.

Blz.

INLEIDING 1

HOOFDSTUK II.

LITERATUURBESPREKING 7
De geldigheid van Blackman's formule 7
Is de koolzuurassimilatie een ketenproces? 11

HOOFDSTUK III.

HET MATERIAAL VOOR DE PROEVEN GEBEZIGD 22

HOOFDSTUK IV.

DE APPARATEN 28
Het gasanalyse-apparaat 29
Het construeeren van het apparaat 33
Voorbeeld van een CO_2-analyse 36
De proefopstelling 39
De CO_2-generator 41
Het circulatiesysteem 44
De belichting 50
De aspirator 50

HOOFDSTUK V.

VOORPROEVEN, FOUTENBRONNEN, BEREKENINGEN EN CORRECTIES 55
De bufferoplossingen 55
De CO_2-concentratie in het assimilatievat 56
Berekening van de assimilatie 60
Correcties 61
Correctie voor de CO_2-lekken 61
Correctie voor den groei 61
Correctie voor het CO_2-verval in het assimilatievat 62
De eenheid van de hoeveelheid celmateriaal 63
Berekening van de lichtintensiteit 64
Verdere foutenbronnen 66

HOOFDSTUK VI.

Blz.

PROEVEN EN RESULTATEN 67
De invloed van de lichtintensiteit 67
De invloed van de temperatuur 68
De invloed van de CO_2-concentratie 70
Conclusies uit de resultaten 70
De diffusieweerstand 73

HOOFDSTUK VII.

HET OVERGANGSPUNT EN HET ASSIMILATIEGETAL. HET ASSIMILATIEQUOTIENT 77
De beteekenis van het overgangspunt 77
Bepaling van het assimilatiegetal 78
Bepaling van het assimilatiequotient 85

HOOFDSTUK VIII.

THEORETISCHE BESCHOUWINGEN 86
De regel voor de ketenprocessen 86
Mogelijkheden van de gebruikte methode van onderzoek 95

SAMENVATTING 97

LITERATUURLIJST 99

TABELLEN 103

HOOFDSTUK I.

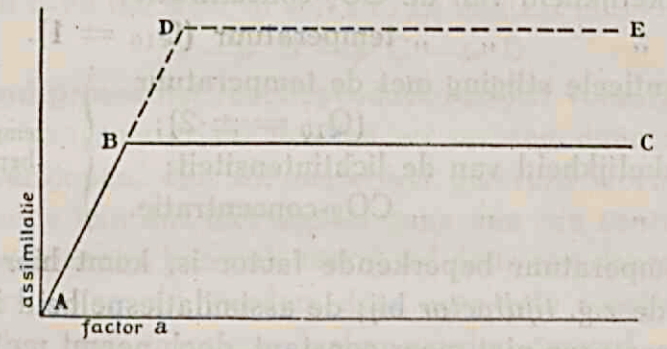
INLEIDING.

De snelheid, waarmede een groene plant CO_2 assimileert, is in eerste instantie afhankelijk van drie uitwendige factoren, n.l. van de concentratie van de CO_2, van de intensiteit van het licht en van de temperatuur.

F. F. Blackman (1905) heeft voor deze afhankelijkheid de volgende formuleering gegeven:

„When a process is conditioned as to its rapidity by a number of separate factors, the rate of the process is limited by the pace of the „slowest" factor".

Deze formuleering wordt grafisch voorgesteld door het bekende, in alle handboeken overgenomen figuurtje (fig. 1), dat ik



Figuur 1.

de ideale Blackman-kromme wil noemen. De stijgende lijn *AB* stelt voor de vermeerdering van de assimilatiesnelheid onder invloed van het toenemen van een factor *a*; bij *B* wordt verdere stijging onmogelijk, omdat een tweede factor *b* daar beperkend wordt. De lijn loopt nu verder evenwijdig aan de abscis *(BC)*. Was factor *b* in grooter hoeveelheid aanwezig geweest, dan zou

stijging van de assimilatiesnelheid tot *D* plaats hebben, alvorens factor *b* beperkend werd.

Het punt, waarbij de beperking door één factor *overgaat* in beperking door een andere, wil ik het *overgangspunt* noemen, en dit definieeren als *het punt, waarbij twee factoren evenveel invloed hebben op de snelheid van de assimilatie.*

Over de juistheid van Blackman's formuleering is een strijd ontstaan, die nog niet schijnt uitgestreden. Ik wil hier nu niet op ingaan, doch voorloopig *aannemen*, dat Blackman's formuleering de feiten juist weergeeft en nagaan, tot welke consequenties dit voert.

De eerste gevolgtrekking is, dat blijkbaar het assimilatieproces drie combinaties van eigenschappen kan bezitten, al naarmate CO_2-concentratie, lichtintensiteit of temperatuur beperkend zijn, t.w.:

1°. Rechte evenredigheid met de CO_2-concentratie;
Onafhankelijkheid van de lichtintensiteit;
„ „ „ temperatuur ($Q_{10} = 1$). } CO_2 beperkend.

2°. Rechte evenredigheid met de lichtintensiteit;
Onafhankelijkheid van de CO_2-concentratie;
„ „ „ temperatuur ($Q_{10} = 1$). } lichtintensiteit beperkend.

3°. Exponentieele stijging met de temperatuur ($Q_{10} = \pm 2$);
Onafhankelijkheid van de lichtintensiteit;
„ „ „ CO_2-concentratie. } temperatuur beperkend.

Als de temperatuur beperkende factor is, komt hier nog als complicatie de z.g. *tijdfactor* bij; de assimilatiesnelheid is n.l. bij hooge temperaturen niet meer constant, doch neemt met den tijd af, en wel des te sneller, naarmate de temperatuur hooger is. Dezen tijdsfactor wil ik voorloopig buiten beschouwing laten, daar zij bij lagere temperaturen niet optreedt.

Wanneer men het assimilatieproces vergelijkt met een enkelvoudig chemisch proces in vitro, bijv. de reactie:

$$A + B \longrightarrow AB,$$

dan valt dadelijk een groot verschil op. De reactiesnelheid van dit proces wordt eveneens bepaald door drie factoren, n.l. de con-

centratie van stof A, die van stof B en de temperatuur; doch deze factoren bepalen niet om de beurt, maar gelijktijdig de snelheid van het proces.

Het proces heeft deze eigenschappen:

Rechte evenredigheid met de concentratie van A;
" " " " " " B;
Exponentieele stijging met de temperatuur,

en houdt deze combinatie van eigenschappen onder alle omstandigheden.

Tevergeefs zal men zoeken naar een enkelvoudig chemisch proces, dat bij verandering der factoren, die zijn snelheid bepalen, zoo geheel van eigenschappen verandert als het assimilatieproces. Een verklaring is in deze richting niet te vinden.

Anders wordt het, wanneer men het assimilatieproces vergelijkt met een ketenreactie, een proces, bestaande uit eenige op elkaar volgende reacties. Voor een dergelijk ketenproces geldt n.l. de algemeene regel, dat de snelheid, waarmede het eindproduct wordt gevormd, beheerscht wordt door het *langzaamste* proces uit de keten (K r u y t 1926; M'c. L e w i s 1918).

Wanneer b.v. een stof A wordt omgezet in een stof B, deze weer in een stof C en die weer in een stof D, dan zal in de reactieketen

$$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$$

elk volgend proces het reactieproduct van het voorafgaande proces als uitgangsmateriaal hebben en op den duur niet sneller kunnen verloopen, dan dit materiaal geleverd wordt. Een *volgende* reactie kan dus niet sneller gaan dan een *voorafgaande*.

Maar een reactie kan ook zeer goed door een daarop *volgende* reactie verlangzaamd worden, daar zeer vele reacties door ophooping van hare reactieproducten worden geremd.

Aldus is het zeer begrijpelijk, dat in een reactieketen het langzaamste proces de snelheid van het geheel bepaalt. Ook physische processen, als oplossing en diffusie, vallen onder dezen regel.

Wanneer men het assimilatieproces zou willen herleiden tot een ketenproces, dan zou het een keten moeten zijn van ten minste drie processen; op deze drie processen zouden de bovengenoemde drie combinaties van eigenschappen van toepassing moeten zijn.

De drie processen, die daarvoor in aanmerking komen, zijn de volgende:

1o. een *diffusieproces*, waarbij de CO_2 uit het uitwendig milieu tot in de chloroplast doordringt;

2o. een *photochemisch proces*, waarbij lichtenergie in chemische energie wordt omgezet, onder medewerking van het chlorophyl;

3o. een *chemisch proces*, waarbij het licht geen rol speelt.

Het 1e proces zou het langzaamste zijn, wanneer de CO_2 concentratie, het 2e, wanneer het licht, het 3e wanneer de temperatuur beperkende factor is.

Wanneer ik het bovenstaande als werkhypothese aanneem, zal ik moeten aantoonen, dat de door B l a c k m a n gevonden drie combinaties van eigenschappen inderdaad aan deze drie processen kunnen worden toegeschreven. Dat dit mogelijk is, wil ik thans laten zien.

1o. *Het diffusieproces.*

Wanneer een stof door diffusie een bepaalden weg aflegt, is de diffusiesnelheid ceteris paribus recht evenredig met het verschil in concentratie van die stof aan het begin en het eind van dezen weg.

Wanneer de concentratie aan het einde 0 is, dan is de snelheid dus recht evenredig met de concentratie aan het begin.

Wanneer in de chloroplast de CO_2 druk = 0 is, (d.i. wanneer alle aangevoerd CO_2 onmiddellijk verbruikt wordt) is dus de rechte evenredigheid met de CO_2-concentratie van het milieu verklaard. Het licht heeft op een diffusieproces natuurlijk geen invloed.

De temperatuur heeft op diffusiesnelheden wel invloed, hoewel veel minder dan op chemische processen. Men vindt een Q_{10} van 1.2 — 1.3 opgegeven, dus hooger dan een Q_{10} =1, die men volgens B l a c k m a n's schema zou moeten verwachten. Dat in bepaalde gevallen deze schijnbare tegenspraak verklaard kan worden, hoop ik in een later hoofdstuk aan te toonen. Tevens wil ik er op wijzen, dat proeven met CO_2 als beperkende factor bij hoogere planten zeer moeilijk zijn, daar de doorsnede van den

diffusieweg veranderlijk is door het dikwijls zeer wispelturig gedrag van de stomata.

2o. *Het photochemisch proces.*

Volgens de wetten der photochemie is de snelheid van een photochemisch proces recht evenredig met de geabsorbeerde hoeveelheid lichtenergie. (Wet van Grotthus—van 't Hoff, zie Plotnikow, 1920). Hoe ingewikkeld de lichtverdeeling in een blad ook zijn moge, de absorptiecoëfficiënt verandert niet (Ursprung, 1918b). In alle deelen van het blad zal de lichtintensiteit dus recht evenredig met die van het opvallende licht varieeren. En zoolang het photochemisch proces in alle deelen van het blad het „langzaamste" is, zal de totale assimilatiesnelheid recht evenredig zijn met de intensiteit van het opvallende licht.

Volgens Blackman's formuleering is boven een bepaalde CO_2-concentratie het photochemisch proces daarvan onafhankelijk. Neemt men aan, dat de CO_2 onveranderd aan dit proces deelneemt, dan is de verklaring van dit feit niet zoo voor de hand liggend. Het vermoeden dringt zich op, dat op de plaats, waar het photochemisch proces zich afspeelt, de concentratie van de reageerende stof reeds haar maximum heeft bereikt en door vermeerdering van de CO_2-concentratie in het milieu niet verder kan worden verhoogd; dat dus het assimileerend agens, waarschijnlijk het chlorophyl, een groote affiniteit tot CO_2 heeft en zich bij een geringe CO_2-concentratie reeds geheel met koolzuur heeft verzadigd.

Neemt men bijvoorbeeld met Willstätter (1918) aan, dat het koolzuur met chlorophyl een dissocieerbare verbinding vormt:

Koolzuur + chlorophyl $\rightleftarrows$ koolzuurchlorophyl

en dat in het koolzuurchlorophyl-molecuul de photochemische omzetting plaats vindt, dan zal, bij een gegeven lichtintensiteit, de reactiesnelheid bepaald worden door de hoeveelheid koolzuurchlorophyl.

Het is duidelijk dat, wanneer practisch alle chlorophyl aan koolzuur gebonden is, de reactiesnelheid bij die lichtintensiteit haar maximum heeft bereikt. Is de affiniteit van chlorophyl voor koolzuur zeer groot, dan zal dit bij een zeer geringe koolzuur-

concentratie reeds het geval zijn, zoodat verdere stijging van de koolzuurconcentratie het photochemisch proces niet meer kan versnellen.

Dat de snelheid van dit proces onafhankelijk is van de temperatuur behoeft geen verwondering te wekken. Een groote groep van photochemische reacties hebben een Q_{10} van $\pm$ 1 (Plotnikow, 1920, p. 62).

Wanneer het photochemisch proces van de CO_2-assimilatie tot deze groep behoort, vormt het volstrekt geen uitzondering.

3e. *Het chemisch proces.*

Dit proces volgt in mijn voorstelling op het photochemisch proces en verwerkt het product ervan. De CO_2 neemt er dus waarschijnlijk niet aan deel en heeft er dan ook geen invloed op; het licht evenmin, daar het een niet-photochemisch proces is.

Zooals elke chemische reactie heeft dit proces een hooge Q_{10}. De meeste chemische reacties immers hebben, volgens den regel van Van 't Hoff, een Q_{10}, welke tusschen 2 en 3 varieert.

In het bovenstaande heb ik, uitsluitend uitgaande van Blackman's principe der beperkende factoren, een werkhypothese opgesteld, waarbij de assimilatie tot een ketenproces wordt herleid. Een quantitatieve overeenstemming met Blackman's formuleering werd daarbij bereikt, behalve dat een geringe temperatuursinvloed is te verwachten, wanneer de CO_2 beperkende factor is.

Niet, dat anderen dergelijke hypothesen niet reeds hebben opgesteld. Alle gedachten, die ik hierboven gaf, zijn wel reeds door anderen uitgesproken.

Toch heb ik dezen gedachtengang eerst willen geven zonder verdere literatuurbeschouwing, met uitsluitend Blackman's „limiting factors" als uitgangspunt; ten eerste, omdat hij als werkhypothese bij mijn proefnemingen gediend heeft, en ten tweede, om tot een zoo scherp mogelijke omschrijving van het probleem te geraken.

Ik wil thans, met behulp van de literatuur, nagaan:

1o. of mijn uitgangspunt als juist mag worden aanvaard;

2o. of er nog andere argumenten zijn te vinden voor de opvatting, dat de assimilatie een ketenproces is.

HOOFDSTUK II.

LITERATUURBESPREKING.

DE GELDIGHEID VAN BLACKMAN'S FORMULE.

Nadat F. F. Blackman in 1905 het principe der beperkende factoren voor de koolzuurassimilatie had uitgesproken en het door hem en zijn medewerkers [1]) was gepropageerd, heeft het snel ingang gevonden en een grooten invloed gekregen op de denkwijze in de botanie en ook daarbuiten.

Het was speciaal gericht tegen de toenmaals algemeen heerschende opvatting, dat bijna elk physiologisch proces door een optimumkromme kon worden voorgesteld.

Ten onrechte spreekt men vaak van een theorie. Een theorie is slechts Blackman's verklaring van het temperatuuroptimum uit een stijgende en een dalende kromme. Overigens zie ik er niets anders in dan een omschrijving van de feiten, een *empyrische formule* dus, welke al of niet juist kan zijn.

Is zij juist? Verscheidene auteurs beweren het tegendeel.

Een zeer fellen aanval deden Brown en Heise (1917 a en b; Brown 1918). Zij hebben de vergissing begaan het assimilatieproces te beschouwen als een enkelvoudig photochemisch proces en hebben eenige consequenties van deze beschouwingswijze willen waar maken met cijfers uit de literatuur. Zoo zeggen zij bijvoorbeeld, dat bij hooge lichtintensiteiten de Q_{10} dezelfde moet zijn als bij lage: „A photochemical reaction, with such intensities of light, would still be photochemical and should show photochemical coefficients".

Blackman en zijn medewerkers zouden zich bij hun proef-

---

[1]) Zie Blackman en Matthaei (1905), Matthaei (1904), Blackman en Smith (1911 a en b).

nemingen door een vooropgezette meening hebben laten leiden. In werkelijkheid zouden meerdere factoren tegelijk van invloed zijn; het proces zou door een optimumkromme kunnen worden voorgesteld.

Smith (1919), die hen, mede namens Blackman, van antwoord dient, merkt terecht op, dat genoemde auteurs zich de zaak veel te eenvoudig voorstellen. Hij zinspeelt op de mogelijkheid, dat de assimilatie een ketenproces is, waarin donkere, niet-photochemische processen voorkomen. Hij komt echter niet verder dan tot het onderstellen van deze mogelijkheid.

Toch moet Smith in één opzicht Brown en Heise gelijk geven, n.l. dat bij het „overgangspunt" de assimilatiekromme geen scherpen knik heeft, doch wordt afgerond; dicht bij dit punt n.l. „the one (factor) not limiting may have some appreciable effect." Hier erkent hij dat Blackman's formuleering waarschijnlijk niet geheel juist is.

Hetzelfde bezwaar heeft Boysen Jensen (1919), op grond van eigen onderzoek. Hij vindt n.l. bij stijgende lichtintensiteit een geleidelijk ombuigende assimilatiekromme. Hij bepleit een wijziging van Blackman's principe op dezelfde wijze, als op landbouwkundig gebied Liebig's wet van het minimum door Mitscherlich is gewijzigd. Mitscherlich zegt n.l., dat de opbrengst stijgt met de vermeerdering van één bepaalde voedingsstof, doch dat de stijging niet evenredig daarmede is, maar geleidelijk afneemt, waarmede het punt genaderd wordt, waar de betreffende factor niet meer beperkend is.

Benecke (1921) komt op grond van onderzoekingen over de zetmeelvorming bij Elodea tot hetzelfde resultaat. Hij neemt de nomenclatuur van Mitscherlich over: een factor kan zijn in *absoluut minimum* (= 0) of in *relatief minimum* (= het meest van alle factoren beperkend); doch nooit is één factor uitsluitend beperkend (tenzij in absoluut minimum), altijd hebben andere factoren ook invloed.

Harder (1921) trekt dezelfde conclusie uit onderzoekingen over de zuurstofafscheiding bij waterplanten. Zijn krommen wijken nog iets meer dan die van bovengenoemde onderzoekers, van Blackman's schema af.

Ook Lundegårdh vindt dezelfde afwijkingen van dit schema. Hij ziet hierin echter geen modificatie daarvan, doch een geheel nieuw principe, dat door hem genoemd is „das Relativitätsgesetz der Assimilationsfactoren" (1924a). Het luidt in 't kort: „Die relative Wirkung eines Faktors nimmt mit seiner absoluten Intensität und zwar vielfach nach einer logarithmischen Kurve ab" (1927).

In zijn latere onderzoekingen (1926, 1927) vindt hij bovendien een zeer merkwaardigen invloed van de temperatuur, zoodanig afwijkend van hetgeen door andere onderzoekers hieromtrent wordt medegedeeld, dat het de moeite loont er een oogenblik langer bij stil te staan.

Bij stijgende temperatuur vindt hij n.l. op het bovenbeschreven algemeen verloop van de assimilatiekromme nog eenige uitgesproken optima en minima gesuperponeerd. Eenige van zijn medewerkers krijgen met dezelfde methodiek soortgelijke resultaten (Walther 1927, Stocker 1927).

Indien Lundegårdh gelijk had, zouden de heerschende opvattingen geheel moeten worden gewijzigd. Er is echter in Lundegårdh's methodiek veel, dat omtrent de resultaten twijfel doet rijzen.

1e. Alle proeven duurden buitengewoon kort, dikwijls slechts enkele minuten en werden direct na het begin der belichting ingezet. Daar een blad veel CO_2 kan bevatten (Willstätter en Stoll 1918) zal eerst de CO_2, die zich in het blad bevindt, verbruikt worden, voordat deze vanuit de lucht wordt opgenomen; in de eerste minuten is dus het CO_2-verbruik zeker niet constant.

2e. De assimilatie bij hoogere CO_2-concentraties werd volumetrisch bepaald met een gasanalyse-apparaat waarin, voorzoover uit de beschrijving is op te maken, de waterdampspanning van de lucht niet constant werd gehouden, iets, waarvoor anders in soortgelijke apparaten (als die van Haldane en Krogh) steeds zorgvuldig gezorgd wordt. Wanneer nu bijv. bij 20° een monster lucht, met waterdamp verzadigd, in het apparaat komt en daarna in aanraking wordt gebracht met een 30 pCt. KOH-oplossing, kan de waterdampspanning van 17 m.M. kwik tot 12 m.M. kwik dalen, hetgeen een volumenafname van ± 0.6 pCt. zou beteekenen.

Toch zegt Lundegårdh dat met dit apparaat een gemiddelde fout wordt gemaakt van slechts 0.003 pCt.

3e. Bij een gedeelte der proeven (1924 b.) werd door de analyses de CO_2-houdende lucht met *water* uit het assimilatievat gedreven, waarin de CO_2 gedeeltelijk kan oplossen.

Ook het opvangen boven glycerine (1927) lijkt mij in dit opzicht niet veilig.

4e. Voor de bepalingen werd telkens een nieuw blad gebruikt; de assimilatie is berekend per eenheid van oppervlakte. Individueele verschillen lijken mij niet uitgesloten.

Ik meen, dat de bovengenoemde opmerkingen aanleiding kunnen zijn om aan de door Lundegårdh gevonden optima en minima geen principieele waarde toe te kennen.

Warburg (1919), experimenteerende met het eencellige groene wier Chlorella, vindt bij vermeerdering van CO_2-concentratie of lichtintensiteit eveneens ongeveer logarithmisch verloopende assimilatiekrommen.

Romell (1926) bestrijdt op zuiver theoretische gronden het principe der beperkende factoren. In het laatste hoofdstuk zal ik hierop terugkomen.

Alles bijeengenomen schijnt dus de regel van Blackman niet streng, doch slechts bij benadering op te gaan en schijnen groote afwijkingen voor te komen in de buurt van het overgangspunt, waar de knik in de kromme aanzienlijk wordt afgerond.

Behalve Warburg hebben alle genoemde onderzoekers gewerkt met bladen of zelfs met geheele waterplanten. Nu is een enkel blad reeds een zeer gecompliceerd systeem en verkeeren de chloroplasten daarin in zeer verschillende condities. Wordt een blad van boven belicht, dan ontvangen de chloroplasten aan de bovenzijde vele malen meer licht dan die aan de onderzijde.

Bij het toenemen van de licht-intensiteit zal voor de chloroplasten aan de bovenzijde het eerst het punt bereikt worden, waarbij het licht niet meer beperkende factor is; de assimilatie zal hier dus niet verder stijgen. Bij verdere toeneming van de lichtintensiteit zal dit geschieden voor de daaronder gelegen chloroplasten, tenslotte voor de onderste. Dus zelfs, indien voor elke chloroplast Blackman's formuleering volkomen juist was, zou

men toch voor het geheele blad een langzamen overgang van lichtbeperking in temperatuur- resp. CO_2-beperking moeten verwachten. Hoe meer de condities van de chloroplasten onderling verschillen, des te meer wordt de overgang geleidelijk en wordt de kromme afgerond. Dit kan misschien de afwijkingen van B l a c k m a n ' s schema grootendeels verklaren. Ook de CO_2-toevoer behoeft voor alle chloroplasten niet dezelfde te zijn, waardoor eveneens belangrijke afwijkingen kunnen ontstaan. Deze beide omstandigheden worden door S c h r o e d e r (1924) helder uiteengezet.

IS DE KOOLZUURASSIMILATIE EEN KETENPROCES?

Zooals reeds werd opgemerkt, is deze gedachte niet nieuw. Aan de theorieën, door onderzoekers als W i l l s t ä t t e r en S t o l l, W a r b u r g en B r i g g s ontwikkeld, ligt deze idee ten grondslag.

De argumenten, die ten gunste van deze hypothese zijn aan te voeren, wil ik duidelijkheidshalve in vier groepen verdeelen:

1. B l a c k m a n's principe der beperkende factoren.
2. Inhibitie- en vermoeienisverschijnsels.
3. Disproportionaliteit van chlorophylgehalte en assimilatievermogen.
4. Inwerking van chemische stoffen op de assimilatie.

Ad. 1. In de inleiding heb ik de hypothese, dat de assimilatie een ketenproces is, op logische wijze uit B l a c k m a n ' s formuleering trachten af te leiden. Argumenten in denzelfden geest vindt men bij W i l l s t ä t t e r en S t o l l en B r i g g s, die een photochemisch en een chemisch proces onderscheiden. Een meer gedetailleerde, hoewel ook meer hypothetische uitwerking treft men bij W a r b u r g aan; bij dezen onderzoeker vindt men ook de meening, dat, wanneer de CO_2-concentratie beperkende factor is, de assimilatiesnelheid van een blad door een diffusieproces wordt bepaald.

Hetgeen ik op pagina 3 schreef omtrent enkelvoudige reacties in vitro, vindt men bijna gelijkluidend bij T h o d a y (1922). Hij zegt:

„Clearly the principle of limiting factors is not applicable to simple direct reactions of this type, between substances in solution. That it does hold for assimilation is in itself a demonstration of the complexity of the process. It is at least probable that to each of the external limiting factors corresponds a distinct stage of the process which is dependent upon it. The rate of the process as a whole is in reality determined by the rate of the slowest contributory stage, as pointed out by Briggs".

Ook bij Spoehr (1926) vindt men de opmerking: „The principle of limiting factors has its analogon in the step-reactions of chemistry". (l.c. p. 97). Hij beschouwt Blackman's principe, evenals ik, als een formuleering: „This theory and its modifications, however, tell us little of the kinetics of the photosynthetic process; they are the first attemps at an accurate expression of the relation of this process to the various factors which influence it."

Ad 2. Van *inhibitie- en vermoeienis-verschijnselen* vindt men de meest bekende voorbeelden in de onderzoekingen van Ewart en Pantanelli.

Ewart (1896, 1897, 1898a, 1898b) stelde groene plantendeelen bloot aan alle mogelijke schadelijke invloeden, zooals: hooge temperaturen bij droogte en vochtigheid, koude, uitdroging, gedeeltelijke verstikking, narcotica, zuren, alcaliën, ophooping van koolhydraten in de plant, sterke plasmolytica, sterke bestraling door de zon, langdurige afwezigheid van CO_2.

In bijna alle gevallen kon hij, met behulp van Engelmann's bacteriën-methode, een reversibelen stilstand van het assimilatieproces constateeren. Werd de plant weer in normale omstandigheden gebracht, dan keerde het assimilatievermogen weer terug. Meestal was, wat betreft de groene kleur, geen verandering waar te nemen. Hij noemde dit verschijnsel: „assimilatory inhibition". Hij concludeerde hieruit, dat, hoewel chlorophyl voor de assimilatie noodzakelijk is „equally important factors of probably plasmatic origin also enter into play" (1896 l.c. p. 457).

Pantanelli (1904), evenals Ewart in Pfeffer's laboratorium werkzaam, bestudeerde de assimilatie van waterplanten met de luchtbellenmethode. Hij vond, dat bij sterke lichtintensi-

teiten (1—64 × die van het zonlicht) het assimilatievermogen afneemt en zich bij lagere lichtintensiteiten weer grootendeels herstelt. Hij noemde dit verschijnsel „*Ermüdung*" en meende het niet door afbraak van het chlorophyl te kunnen verklaren, daar dit zich niet zoo gauw herstelt. „In der That sind die Ermüdungserscheinungen gewiss auf protoplasmatische Reactionen zurückzuführen". (l.c. p. 188).

Door de onderzoekingen van Engelmann (1882—1884), Timiriaseff (1903), Ursprung (1917, 1918a) e.a. is gebleken, dat slechts het licht, dat door het chlorophyl wordt geabsorbeerd, aan het assimilatieproces, d.w.z. aan het photochemisch proces deelneemt, aangezien er een groote overeenkomst bestaat tusschen absorbtie en assimilatie in de verschillende deelen van het spectrum. Het chlorophyl beheerscht dus de photochemische reactie, is het photochemisch agens. Wanneer nu volgens Ewart en Pantanelli het assimilatievermogen kan worden verminderd zonder invloed uit te oefenen op het chlorophyl, geldt deze vermindering blijkbaar een agens dat een niet-photochemische reactie beheerscht.

De z.g. *tijdfactor* van Blackman (1905) is blijkbaar niets anders dan een speciaal geval van inhibitie: bij hooge temperaturen neemt de snelheid van het chemisch proces af. Blackman neemt aan, dat men hier te doen heeft met de afbraak van een enzym door de hooge temperatuur; dit enzym moet dus als het chemisch agens worden beschouwd.

Ook hetgeen Ursprung *solarisatie* noemt, is wellicht hetzelfde verschijnsel. De zetmeelvorming in een blad, welke met de stijging van de lichtintensiteit eerst toeneemt, wordt bij hooge lichtintensiteiten gedeeltelijk of geheel stopgezet, terwijl blijkbaar de afvoer van zetmeel doorgaat. Ook dit verschijnsel is reversibel. Maar aan den anderen kant is de zetmeelvorming niet zonder meer gelijk te stellen met het opnemen van CO_2 of het afgeven van O_2. Bovendien vermoeden Schroeder en Horn (1922, Trude Horn 1923), dat de solarisatie berust op uitdroging en daarmede gepaard gaande omzetting van zetmeel in suikers.

Ad 3. Over *de verhouding van chlorophylgehalte en assimi-*

latievermogen deed reeds Ewart (1896) enkele proeven. Hij constateerde, dat eerst de groene kleur ontstaat, vervolgens pas het assimilatievermogen. (Volgens Willstätter zijn echter deze waarnemingen aan twijfel onderhevig.) Miss Irving (1910) heeft dit vraagstuk opnieuw aangepakt. Zij vond, dat bij geëtioleerde bladen van kiemplanten van gerst en boon bij belichting eerst de groene kleur zich ontwikkelt. Pas wanneer de bladen grasgroen zijn, begint de assimilatie op te treden, die dan snel toeneemt. Haar conclusie luidt: „It must be some other component part of the photosynthetic machinery, which controls the beginning of complete functional activity."

Willstätter was, dank zij zijn groote kennis van het chlorophyl, in staat, een colorimetrische methode uit te werken, om het chlorophyl quantitatief te bepalen. Hij en Stoll (1918) onderzochten daarmede het verband tusschen chlorophyl-gehalte en assimilatievermogen bij bladen van zeer vele planten. De omstandigheden waaronder de assimilatie plaats vond, waren in 't algemeen zoodanig, dat de temperatuur beperkende factor was; t.w. 25° C., een zeer hooge lichtintensiteit (48.000 M.K.) en een groote overmaat van CO_2 (± 5 pCt.).

Het aantal grammen CO_2, per uur geassimileerd, gedeeld door het chlorophylgehalte in grammen noemden zij het *assimilatiegetal* (Assimilationszahl). Dit getal is een maat voor de verhouding van chemisch agens tot photochemisch agens (chlorophyl), daar in hun proeven het chemisch proces de snelheid bepaalde.

Zij vonden nu een groote variatie van assimilatiegetallen. Wel waren deze voor vele gewone bladen ongeveer hetzelfde, varieerend tusschen 5 en 8, iets hooger bij bladen met een sterk ontwikkeld assimilatievermogen (voor Helianthus 14.0—16.7); doch bij aura-varieteiten, welke zeer weinig chlorophyl bevatten, vonden zij zeer hooge assimilatiegetallen (50—120), tot 20 maal hooger dan bij den groenen stamvorm.

Zij kwamen hierdoor tot het besluit, dat er een chemisch agens moet bestaan, dat niet identiek is met het chlorophyl, doch een apart iets is. Zij gaven dit den naam van „enzymfactor".

De theorie, welke zij omtrent het assimilatieproces hebben ontwikkeld, luidt ongeveer als volgt:

Het koolzuur verbindt zich niet als CO_2, doch als H_2CO_3 met het Mg atoom van het chlorophyl. Er ontstaat een molecuul koolzuurchlorophyl. Willstätter en Stoll konden inderdaad een binding van koolzuur door een colloïdale chlorophyloplossing constateeren.

Het photochemisch proces bestaat nu hieruit, dat dit aan chlorophyl gebonden koolzuur onder opneming van lichtenergie overgaat in een hoogeren energievorm, n.l. formaldehydperoxyd. Het chemisch proces is de afsplitsing van zuurstof door een katalase-achtig enzym, waardoor formaldehyd ontstaat. Daar zij steeds een assimilatiequotient van 1 vonden, maakten zij de gevolgtrekking, dat direct de reductietrap van formaldehyd wordt bereikt en een intermediair reductieproduct niet wordt opgehoopt.

Het gevormde formaldehyd wordt nu van het chlorophyl afgesplitst en tot suikers gepolymeriseerd.

Na deze kleine uitweiding over Willstätter's theorie wil ik nog even terugkomen op de assimilatiegetallen, die hij vindt bij geëtioleerde bladen.

In tegenstelling met Miss Irving vond Willstätter bij het eerste optreden van het chlorophyl buitengewoon hooge assimilatiegetallen, wat bewijzen zou, dat de „enzymfactor" reeds aanwezig is, vóórdat het chlorophyl begint op te treden, terwijl uit de proeven van Miss Irving juist het tegendeel valt te concludeeren. Deze tegenspraak is door Briggs (1920) tot een bevredigende oplossing gebracht. Deze onderzoeker gebruikte de palladiumzwartmethode van Blackman, een methode, waarbij het mogelijk is, het chlorophylgehalte constant te houden. Hij constateerde, dat bij kiemplanten van Phaseolus vulgaris een factor, die het assimilatievermogen beheerscht en die *niet* is het chlorophyl, den 8en dag na het ontkiemen optreedt, onafhankelijk van het chlorophylgehalte en in enkele dagen zijn maximum bereikt. Hij noemde dezen factor den *internen factor*.

Duurt het etiolement langer dan 8 dagen, dan is bij het eerste optreden van het chlorophyl de „interne factor" reeds overvloedig aanwezig en krijgt men hooge assimilatiegetallen. Heeft het etiolement kort geduurd, dan is er nog geen interne factor, dus nog geen assimilatievermogen.

Willstätter schijnt zijn planten langer aan etiolement te hebben blootgesteld dan Miss Irving, zoodat daarmede deze controversie is opgehelderd.

Ook Briggs beschouwt de assimilatie als een keten van op elkaar volgende processen. Zijn meening, dat de „interne factor" zou behooren bij een photochemisch proces, dus geheel iets anders zijn zou dan Willstätter's enzymfactor, heeft hij naderhand herroepen (1923a); de interne factor behoort dus thans ook volgens Briggs bij een niet-photochemisch proces.

Het bleek hem, dat men bij kiemplanten twee typen kan onderscheiden (1923b); bij het eerste type is tegelijk met het chlorophyl reeds het assimilatievermogen aanwezig (Helianthus type), bij het tweede laat dit nog eenigen tijd op zich wachten (Phaseolus type).

Ad 4. De vele onderzoekingen over de *inwerking van chemische stoffen* op de assimilatie zal ik grootendeels stilzwijgend voorbijgaan. Een overzicht vindt men bij Stiles (1925, p. 119).

In dit verband is echter van belang hetgeen Warburg (1919, 1920) hierover heeft gepubliceerd. Warburg experimenteerde met suspensies van het eencellige groene wier Chlorella, een object, dat o.m. het voordeel heeft, dat wegens de kleine afmetingen zoowel CO_2 als andere stoffen zeer gemakkelijk tot in de chloroplast doordringen. Warburg beschouwt eveneens de assimilatie als een ketenproces, waarbij men, door óf licht óf temperatuur als beperkende factor te kiezen, resp. een photochemisch of een chemisch proces afzonderlijk kan bestudeeren.

Hij bestudeerde nu den invloed van verschillende stoffen, n.l. een reeks urethanen en blauwzuur, op de snelheid van deze twee processen.

Urethanen zijn oppervlakte-actieve stoffen; zulke stoffen hebben de eigenschap om in een waterige oplossing de oppervlaktespanning te verlagen, waarmede gepaard gaat een ophooping van de oppervlakte-actieve stof in het grensvlak, terwijl daardoor andere stoffen voor een grooter of kleiner deel uit dat grensvlak worden verdrongen.

Nu zijn de meeste, zoo niet alle biochemische reacties hetero-

gene reacties; de reageerende stoffen bevinden zich in een grensvlak. Een oppervlakte-actieve stof zal hen daaruit kunnen verdringen en daarmede de reactiesnelheid verlagen; dus kan men urethanen beschouwen als „reagentia" op heterogene reacties.

Warburg merkt op, dat blauwzuur een groote affiniteit heeft tot zware metalen. Een reactie, die door een zwaar metaal katalytisch wordt versneld, zal door blauwzuur geremd worden, omdat de katalysator door het blauwzuur a.h.w. wordt geblokkeerd. Daarom wordt blauwzuur door Warburg beschouwd als een „reagens" op katalyse door zware metalen.

Warburg vond nu, dat de assimilatie, zoowel bij licht- als bij temperatuurbeperking door urethanen in geringe concentratie sterk wordt geremd. In de homologe reeks van urethanen vond hij een toenemende werking bij stijgend moleculairgewicht, hetgeen met toenemende oppervlakte-activiteit overeenkomt.

Blauwzuur daarentegen had alleen een sterk remmenden invloed bij temperatuurbeperking, doch niet bij lichtbeperking.

Hierin kan men een nieuw bewijs zien, dat het twee verschillende processen zijn, die de snelheid van de assimilatie in deze twee gevallen bepalen.

Vóór 1924 maakte Warburg zich van den gang van zaken ongeveer de volgende voorstelling:

1e. Onder opneming van lichtenergie wordt het chlorophyl omgezet in een hoogeren energievorm; het wordt tot „photochemisch primair product". Dit is dus het eigenlijk photochemisch proces.

2e. De CO_2 wordt in een chemisch proces verwerkt tot een stof, welke geschikt is om de in het photochemisch primair product opgehoopte energie over te nemen: de CO_2 wordt gemaakt tot „acceptor". De reactie, waarin deze acceptorvorming plaats vindt, noemt hij de *Blackman'sche reactie*. Dit is de reactie, welke de snelheid bepaalt als de temperatuur beperkende factor is. Deze reactie heeft plaats in een grensvlak, heeft een zwaar metaal (waarschijnlijk Fe) als katalysator en wordt daarom zoowel door urethanen, als door blauwzuur geremd.

3e. De acceptor reageert met het „photochemisch primair product" en ondergaat daarbij een reductie. Deze acceptorreductie

bepaalt de snelheid van de assimilatie, wanneer het licht beperkende factor is; zij heeft plaats in een grensvlak en wordt wel door urethanen, doch niet door blauwzuur geremd.

De lichtenergie wordt door de „genarcotiseerde" cellen op normale wijze geabsorbeerd, doch voor een kleiner deel aan den acceptor overgedragen, daar deze voor een deel uit het grensvlak is verdrongen.

Voor de argumentatie van deze theorie verwijs ik naar Warburg's publicaties (1919, 1920, 1921). Ik bespreek deze theorie naast die van Willstätter slechts om deze reden, dat het hier twee door physiologische feiten gefundeerde theorieën betreft, welke in dit opzicht verschillen:

In Willstätter's theorie ondergaat het koolzuur *eerst* een photochemische, *dan* een chemische omzetting; in Warburg's theorie juist omgekeerd: hier neemt het koolzuur zelf *niet* deel aan het photochemisch proces, doch eerst nadat het is omgezet.

In 1924 heeft Warburg zijn acceptortheorie zonder slag of stoot opgegeven en Willstätter's theorie als de meest waarschijnlijke aanvaard.

Het bleek n.l. in proeven met suspensies van Chlorella, dat de inwerking van blauwzuur en urethanen op de Blackman'sche reactie ongeveer dezelfde was als op de ontbinding van H_2O_2 (oxydase- of katalasewerking) door datzelfde object (Warburg en Uyesugi 1924).

Ook de afhankelijkheid van de temperatuur was voor beide reacties dezelfde (Yabusoe 1924). Hieruit concludeerde Warburg, dat beide reacties door hetzelfde agens zouden worden veroorzaakt. De Blackman'sche reactie zou dan een oxydasereactie zijn, hetgeen geheel in Willstätter's theorie past.

Al wijst dus de waarschijnlijkheid in deze richting, toch staat het m.i. nog volstrekt niet vast, dat het koolzuur aan het photochemisch proces deelneemt en zal het bewijs daartoe nog geleverd moeten worden.

De bovenstaande literatuurbeschouwing is geenszins volledig. In de laatste jaren zijn twee voortreffelijke overzichten over het geheele gebied der koolzuurassimilatie verschenen van de hand van Stiles (1925) en Spoehr (1926), waarin de literatuur

volledíger behandeld wordt dan het hier in mijn bedoeling ligt en waarnaar ik den lezer verwijzen kan.

Slechts zooveel heb ik genoemd, als tot steun of kritiek van mijn betoog diende te worden aangevoerd. Wat ik echter hoop te hebben aangetoond is, dat de assimilatie als een ketenproces moet worden beschouwd. Ongetwijfeld bestaat er naast een photochemisch proces een chemisch proces; de namen *temperatuurfactor* (Blackman), *enzymfactor* (Willstätter), *Blackman'sche reactie* (Warburg), *interne factor* (Briggs) hebben alle betrekking op dit proces of op het agens, aan welks werkzaamheid dit proces moet worden toegeschreven; de termen *inhibitie* (Ewart), *vermoeienis* (Pantanelli), *tijdfactor* Blackman) en misschien *solarisatie* (Ursprung) betreffen een teruggang in de reactiesnelheid van dit proces.

De groote onafhankelijkheid, welke dit proces in allerlei opzichten blijkt te bezitten ten opzichte van het photochemisch proces, maakt de onderstelling van een afzonderlijk agens naast het photochemisch agens — het chlorophyl — tot een zeer waarschijnlijke hypothese. Vermoedelijk is het van enzymachtigen aard, daar het bij temperaturen boven 30° C. snel in werkzaamheid vermindert (Blackman's tijdfactor en theorie van het temperatuuroptimum, 1905).

Ik wil niet zeggen, dat het proces, waarmede wij hier te doen hebben, een enkelvoudig proces is. De groote veranderlijkheid in de temperatuurcoëfficiënt, die daalt, naarmate de temperatuur hooger wordt, zooals Warburg voor de „Blackman'sche reactie" heeft gevonden, duidt op den samengestelden aard van dit proces. Doch daar ons voorloopig de gegevens ontbreken om dit proces verder te analyseeren, meen ik al de bovengenoemde verschijnselen in één adem te mogen noemen, als betrekking hebbende op eenzelfde chemisch proces.

Het spreekt vanzelf, dat de eigenlijke assimilatieprocessen worden voorafgegaan door een transport van de CO_2 van uit het uitwendig milieu naar de chloroplast. Algemeen vindt men de meening verbreid, dat een gedeeltelijke sluiting van de stomata een daling van de assimilatiesnelheid tengevolge kan hebben, dat

dus onder bepaalde omstandigheden het CO_2-transport de assimilatiesnelheid kan bepalen.

De hypothese, dat bij lage CO_2-concentratie een diffusieproces het langzaamste proces in de reactieketen is, is hiermede gewettigd.

In het eerste deel van dit hoofdstuk heb ik uiteengezet, dat het schema van de „limiting factors" de verschijnselen voor een blad niet juist weergeeft, dat het echter mogelijk is, dat voor de afzonderlijke chloroplast dit schema geldig is.

De eenige proeven hierover zijn van W a r b u r g. Hij experimenteerde, zooals reeds is opgemerkt, met het eencellige groene wier Chlorella, waarvan men elke cel, om zoo te zeggen, als een enkele chloroplast met een celwand kan beschouwen. Daar het CO_2-transport hier een zeer kleinen weg heeft af te leggen, meende hij, dat dit transport nimmer de assimilatiesnelheid zou kunnen belemmeren. Het diffusieproces zou hier dus als eventueele „langzaamste" reactie zijn uitgeschakeld en het geheel een graad eenvoudiger zijn geworden. W a r b u r g meende dan ook, dat hij de CO_2-druk binnen en buiten de cel gelijk mocht stellen en door dezen te varieeren den invloed daarvan op het eigenlijke assimilatieproces in de cel kon vaststellen.

De veranderingen in CO_2-concentratie bereikte hij door de wieren te suspendeeren in oplossingen van carbonaat en bicarbonaat. Door de verhouding van deze twee zouten te veranderen kon hij de koolzuurconcentratie in de oplossing binnen zeer wijde grenzen varieeren. De assimilatie bepaalde hij manometrisch, gebruik makende van de verschillende oplosbaarheden van CO_2 en O_2 in deze oplossingen.

Hoewel W a r b u r g's methode zeer ingenieus en elegant is, heeft zij m.i. toch nog bezwaren. In de eerste plaats is het ideaal, waarbij alle cellen in dezelfde condities verkeeren, wat de lichtintensiteit betreft, nog niet bereikt.

Wel heeft W a r b u r g de voorzorg genomen, om in de proeven, waar het licht beperkende factor was, zeer verdunde celsuspensies te gebruiken, waardoor, volgens zijn eigen opgave, slechts 10—20 pCt. van het licht werd geabsorbeerd.

Indien het maximale verschil in lichtintensiteit voor alle cellen slechts 10—20 pCt. bedraagt, is dit bezwaar niet groot. Het is echter zeer waarschijnlijk, dat een betrekkelijk klein gedeelte van de cellen aanzienlijk door andere cellen wordt beschaduwd en slechts 50 pCt. of nog minder van het vereischte licht ontvangt. In dat geval, ook indien in totaal slechts 10—20 pCt. van het licht wordt geabsorbeerd, zal de fout, die men maakt, veel grooter zijn.

Immers, indien voor het gros der cellen het licht juist niet meer beperkende factor is, zal men de intensiteit tot het dubbele moeten opvoeren, om dit ook voor de beschaduwde cellen het geval te doen zijn.

Een tweede bezwaar van W a r b u r g's methode is het feit, dat men, om de CO_2-concentratie te varieeren, de cellen moet blootstellen aan buffermengsels van zeer verschillenden zuurgraad, die voor de cellen niet steeds onschadelijk zijn, en waarmede men een nieuwe complicatie invoert.

Ik heb nu een methode uitgewerkt, waarin ik ook deze laatste twee bezwaren meen te hebben ondervangen en waarmede ik mij ten doel heb gesteld de volgende vragen te beantwoorden:

1e. Op welke wijze is de assimilatiesnelheid van de afzonderlijke chloroplast afhankelijk van de CO_2-concentratie, de lichtintensiteit en de temperatuur?

2e. Van welken aard zijn de processen uit de reactieketen, welke de snelheid van het assimilatieproces kunnen bepalen?

HOOFDSTUK III.

HET MATERIAAL VOOR DE PROEVEN GEBEZIGD.

Een geschikt object heb ik gezocht onder de eencellige luchtwieren, welke men overal op boomen en muren kan aantreffen.

Van materiaal van dergelijke vindplaatsen heb ik in het laboratorium op verschillende manieren culturen gemaakt op anorganische voedingsbodems met het doel een soort te vinden, die geschikt was om voort te kweeken in een laag van één cel dik.

Ik achtte het niet waarschijnlijk, dat het mogelijk zou zijn om in de experimenten het materiaal vrij te houden van bacteriën. Dus moest ik een organisme hebben, dat zich goed vermenigvuldigen kon op een zuiver anorganischen voedingsbodem, waardoor de bacteriënontwikkeling tot een minimum zou worden beperkt.

Als handleiding diende mij een artikel van E. G. Pringsheim (1926).

Verschillende vaste substraten werden gebezigd: agar, kiezelzuurgel en gips.

Het water, dat voor het maken van de voedingsbodems werd gebruikt, was steeds van glas in glas gedestilleerd, ter vermijding van sporen koper en andere zware metalen, welke voor de wieren zeer vergiftig zijn (oligodynamische werking). Het gebruik van apparaten en kolven van Jenaglas bleek voor mijn doel niet noodig te zijn.

De voor de plaatculturen te gebruiken agar werd, ter verwijdering van organische stoffen, twee dagen met leidingwater gespoeld, vervolgens een dag in gedestilleerd water gezet.

Daarna werd een voedingsbodem gemaakt van de volgende, door Beyerink (1898) aangegeven samenstelling.

Agar	2	pCt.
NH_4NO_3	0.05	pCt.

KH_2PO_4	0.02	pCt.
$MgSO_4$	0.02	pCt.
$CaCl_2$	0.01	pCt.
$FeSO_4$	0.0001	pCt.

Deze werd gesteriliseerd en in Petrischalen uitgegoten.

Kiezelzuurbodems werden gemaakt volgens het voorschrift van P r i n g s h e i m: waterglas wordt met behulp van een areometer verdund tot s.g. 1.08. Hiervan werd telkens 10 ccM. in een bekerglaasje snel vermengd met 7 ccM. 1N. zoutzuur en snel in Petrischalen uitgegoten, waarin het spoedig gelatineert. (P r i n g s h e i m neemt eenigszins andere verhoudingen, n.l. gelijke volumina waterglas s.g. 1.08 en zoutzuur s.g. 1.1 op 1/10 verdund = ± 0.55 N.).

Deze platen worden nu een dag in stroomend leidingwater gespoeld om het aanwezige zoutzuur uit te wasschen en daarna overgoten met een oplossing van voedingszouten, welke na eenige uren voldoende in het kiezelzuur doordringt; daarna kan de vloeistof worden afgegoten.

Het bleek mij, dat voor mijn doel de kiezelzuurbodems op den duur de voorkeur verdienen boven de agarbodems. Indien men n.l. niet met reinculturen te maken heeft, krijgt men op agarbodems, hoe goed de agar te voren ook is uitgewasschen, steeds nog eenige ontwikkeling van bacteriën en schimmels, welke op kiezelzuurbodems bijna geheel achterwege blijft.

Voor de culturen op gips werden kleine gipsplaatjes gegoten en in Petrischaaltjes overgoten met ± 10 ccM. voedingsvloeistof.

Nu werd van verschillende muren en boomen eenige groene substantie afgekrabd en in een reageerbuis met water geschud; deze suspensie werd eenige malen verdund en tenslotte over de voedingsbodems uitgegoten. Na eenige oogenblikken liet ik het water voorzichtig afloopen.

Na een paar weken vertoonden de voedingsbodems een groot aantal kleine groene koloniën van verschillende soorten wieren, waaronder soorten van Protococcus, Chlorella, Hormidium, Stichococcus en andere. Met een puntig mesje kan zulk een celklompje van het substraat worden afgelicht, in gedestilleerd water gesuspendeerd en over een nieuwen voedingsbodem uitge-

goten. Op deze wijze konden zonder moeite cultures van één soort worden verkregen.

In den aanvang had ik gedacht, dat de één of andere Protococcacee wel voor mijn doel geschikt zou zijn. Door een toeval ontdekte ik echter een veel beter object.

Op het oppervlak van de voedingsvloeistof, welke één van de gipsblokjes omgaf, zag ik n.l. na ruim een maand groene slierten ontstaan, welke in grootte toenamen en zich aaneenlegden, zoodat tenslotte het geheele vloeistofoppervlak bedekt was met een dun groen vliesje.

Het bleek te zijn een draadwier, Hormidium spec., dat de eigenschap heeft, zich aan het oppervlak van de cultuurvloeistof te ontwikkelen. *) De celdraden vormen bij het uitgroeien kronkels, welke zich aan elkaar leggen, zoodat een aaneengesloten vlies ontstaat, dat door capillaire krachten aan het oppervlak wordt vastgehouden, terwijl vrijwel niets naar beneden zinkt. Het laagje is één cel dik. Het vertoont bij doorvallend licht een merkwaardig aspect, doordat op verschillende plekken de aaneengesloten celdraden in verschillende richtingen zijn georiënteerd, waarbij door de lichtbreking afwisselend lichte en donkere plekjes ontstaan. Het bleek mij, dat deze eigenschap bij Hormidium reeds lang bekend is, door Chodat in 1915 is beschreven en in de Flora van Pascher (1914) zelfs als soortskenmerk wordt gebruikt. Deze eigenschap maakt dit wier tot een ideaal object voor mijn onderzoek. Met behulp van kiezelzuurbodems werd op de bovenbeschreven wijze een soortzuivere cultuur verkregen, welke vervolgens verder op vloeibare voedingsbodems werd voortgekweekt.

Daar door Willstätter (1918 noot p. 168) en Benecke (1921) een specifieke invloed van Ammoniumzouten op de assimilatie wordt vermeld, heb ik er de voorkeur aan gegeven, om met ammoniumvrije oplossingen te werken.

Ik wijzigde daartoe een door Pringsheim (1921) aange-

---

*) De Heer J. Heimans te Amsterdam was zoo vriendelijk, het wier voor mij te determineeren. Het is waarschijnlijk een vorm van Hormococcus flaccidus (Kütz.) Chodat = Klothrix flaccidus Kütz. = Hormidium flaccidum Kl. = Stichococcus flaccidus (Näg.) Gay.

geven oplossing en kwam na een aantal oriënteerende proeven tot een samenstelling, waarop de wieren goed bleken te gedijen.

Ik maakte een aantal zoutoplossingen, welke in voorraad werden gehouden, n.l. een van KNO_3 5 pCt., een van $CaSO_4$ verzadigde opl.=0.01 pCt., een van $MgSO_4$ 1 pCt., een van KH_2PO_4 1 pCt. en een van $FeSO_4$ 0.1 pCt. Alleen de laatste oplossing moest voor het gebruik steeds versch worden bereid, daar het ferrozout in oplossing spoedig oxydeert en als ferrizout neerslaat. Bij ± 400 ccM. gedestilleerd water werden deze oplossingen in de onderstaande hoeveelheden en volgorde toegevoegd; de laatste kolom geeft de samenstelling van de verkregen oplossing aan:

$FeSO_4$	0.1 pCt.	5 ccM.	0.001 pCt.
$MgSO_4$	1 pCt.	5 ccM.	0.01 pCt.
$CaSO_4$	verz. opl.	10 ccM.	0.002 pCt.
KNO_3	5 pCt.	10 ccM.	0.1 pCt.
KH_2PO_4	2 pCt.	5 ccM.	0.02 pCt.
gedestilleerd water tot		50 ccM.	

Ik heb meenen op te merken, dat het voor de voedingswaarde van de oplossing niet onverschillig is, op welke wijze de zouten bij elkander worden gevoegd.

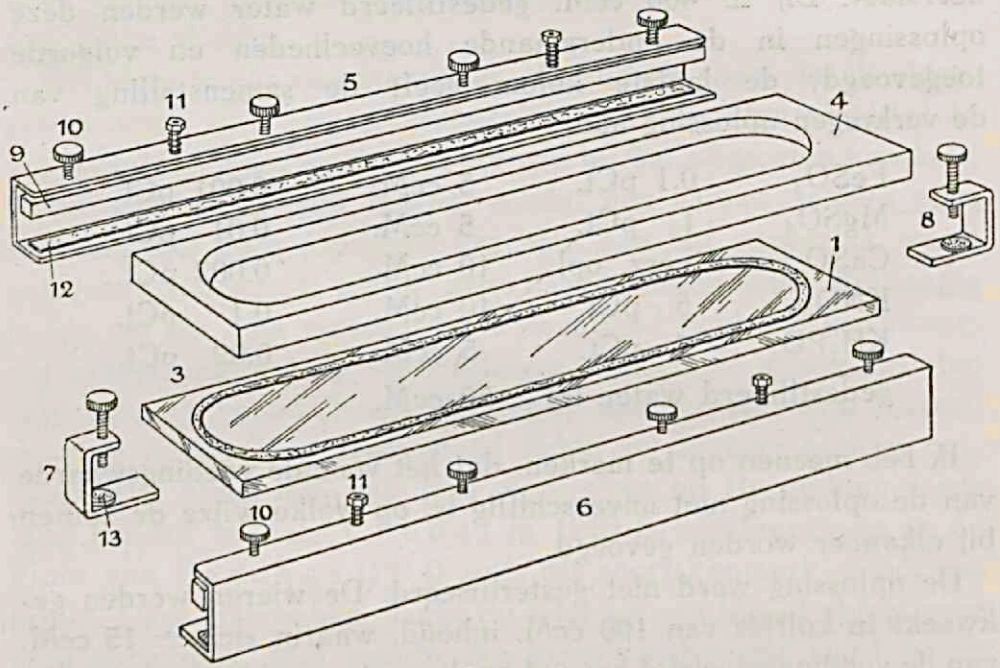
De oplossing werd niet gesteriliseerd. De wieren werden gekweekt in kolfjes van 100 ccM. inhoud, waarin zich ± 15 ccM. van de voedingsvloeistof bevond en die met een wattenprop waren gesloten.

Het overenten geschiedde met een oog van nikkelchroomdraad, dat een middellijn had van 5-10 mM. Als men zulk een oog in de vloeistof onder de wieren steekt en daarna eruit licht, draagt het een vloeistofvliesje, dat aan twee kanten met een laagje wieren bedekt is. Brengt men dit oog in een nieuw cultuurkolfje met het vloeistofoppervlak in aanraking, dan spreiden zich de wieren onmiddellijk over het oppervlak uit en kunnen zich daar opnieuw vermeerderen.

Ik plaatste de cultuurkolfjes in een glazen bak, door een glazen plaat afgedekt, voor het venster. Direct zonlicht werd met transparant papier afgeschermd. In den beginne meende ik koolzuur

te moeten toevoegen, door dagelijks eenig koolzuur in den glazen bak te laten stroomen. Op den duur bleek, dat uit de kamerlucht voldoende koolzuur door de wattenprop diffundeert om de wieren te voorzien.

In twee à drie weken is het geheele vloeistofoppervlak in het kolfje met wier bedekt. De groei gaat dan niet verder, blijkbaar is dan de voedingsvloeistof uitgeput of zijn afbraakproducten van de stofwisseling gevormd, welke den groei belemmeren.



Figuur 2.

Komt een cultuur op deze wijze, of wel door te hooge temperatuur of te sterke belichting, in slechte condities, dan beginnen de wierdraden naar beneden te zinken, zoodat na eenigen tijd bijna de geheele hoeveelheid wieren als groene vlokken in de vloeistof zweeft.

Wieren, die voor een proef moesten dienen, werden twee à drie dagen te voren geënt op het oppervlak van een voedingsoplossing, welke zich bevond in een soort van vijvertje, 4 c.M. breed en 24 c.M. lang (zie fig. 2).

Dit vijvertje werd gevormd door een glazen plaat 1 als bodem en een ebonieten ring 4 als rand. Een caoutchouc ring 3, geknipt

uit een rijwielbinnenband, werd hiertusschen geklemd (voor waterdichte afsluiting) met behulp van de klemmen 5, 6, 7 en 8. De klemmen 5 en 6 bestaan uit een gootvormig, witgelakt stuk koper, waarin een vernikkeld koperen staaf 9 bewegelijk is bevestigd; er zijn n.l. twee staafjes 11 aan vastgemaakt, welke door spiraalveertjes worden omhooggehouden. Door het aandraaien van de schroeven 10 kan de staaf naar beneden worden gedrukt, waarmede de ebonieten ring en de glazen plaat op elkander kunnen worden geklemd.

Reepen caoutchouc 12 en schijfjes kurk 13 beschermen het glas tegen het metaal; het springt anders spoedig stuk.

Dit vijvertje wordt horizontaal gezet en tot halverhoogte met de voedingsoplossing gevuld. Daarop wordt een voldoende hoeveelheid wieren erin overgeënt.

Wanneer nu een proef genomen moet worden, wordt door middel van een klein heveltje de voedingsoplossing grootendeels onder de wieren uitgezogen. Dit geschiedt ook, wanneer de oplossing moet worden ververscht. Het moet vooral voorzichtig gebeuren. Het wierlaagje blijft n.l. op zijn plaats, zoolang het uiteinde van het heveltje onder het vloeistofoppervlak is. Doch als het vijvertje bijna leeg is, worden luchtbelletjes meegezogen en wordt het met wier bedekte oppervlak naar het heveltje toegetrokken en a.h.w. mede weggeheveld, waarbij dikwijls vrij veel materiaal verloren gaat. Dit is te verhelpen door om het uiteinde van het heveltje, waar dit in de vloeistof steekt, een lusje van geparaffineerd draad of dun touw op het vloeistofoppervlak te laten drijven; dit laatste wordt aldus grootendeels van het heveltje afgesloten en reageert dan ook niet meer, wanneer luchtbelletjes worden medegezogen.

Ook kan men met twee geparaffineerde reepjes papier de wieren naar het middengedeelte van het vijvertje opdrijven, alvorens de voedingsvloeistof te laten wegloopen. Aldus geschiedde bij de meeste proeven.

Als de vloeistof is weggezogen, liggen de wieren op een zeer dun vloeistoflaagje op de glazen plaat 1; deze wordt, na het wegnemen van de klemmen en den ring van eboniet, gemaakt tot bodem van het assimilatievat (zie volgend hoofdstuk).

HOOFDSTUK IV.

DE APPARATEN.

De methode heb ik in korte trekken reeds elders beschreven (1928) en zal ik hier uitvoerig weergeven. Zij moet aan de volgende technische eischen voldoen:

In het assimilatievat moeten de drie factoren: CO_2-concentratie, lichtintensiteit en temperatuur, elk afzonderlijk naar willekeur kunnen worden gevarieerd of constant gehouden. De CO_2-concentratie moet in alle deelen van het assimilatievat dezelfde zijn en nauwkeurig kunnen worden bepaald.

Wanneer men bedenkt, dat in de atmospheer de CO_2-concentratie $\pm$ 0.03 pCt. bedraagt, wat dus voor de wieren de normale toestand is, dan is het duidelijk, dat een nauwkeurigheid van 0.001 pCt. gewenscht is. Productie en verbruik van CO_2 (respiratie en assimilatie) moeten nauwkeurig kunnen worden bepaald.

De CO_2-bepalingen geschieden gasanalytisch. Het veelgebruikte gasanalyseapparaat van H a l d a n e heeft slechts een nauwkeurigeid van 0.01 pCt.

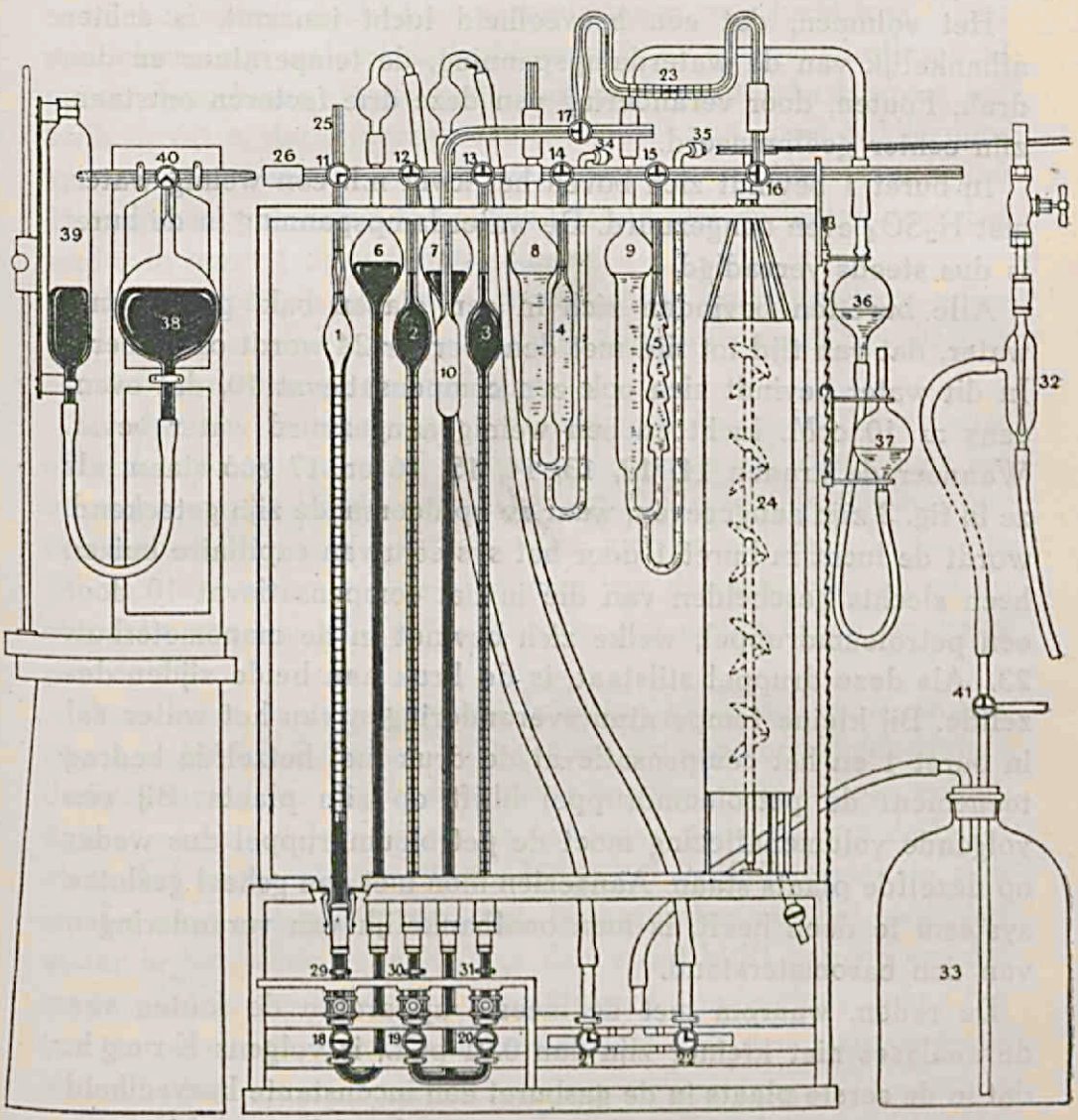
K r o g h (1920) construeerde echter een apparaat, waarmede van 50 ccM. lucht het CO_2- en O_2-gehalte op 0.001 vol. pCt. kan worden bepaald.

Het gasanalysetoestel, in mijn proeven gebruikt, is, behoudens eenige kleine wijzigingen, geheel naar het toestel van K r o g h (1920) nagebouwd. De grootte van het luchtmonster is echter niet 50 ccM., doch 10 ccM.

Een korte beschrijving moge hier volgen. Voor een uitvoerige argumentatie van de constructie verwijs ik naar het artikel van K r o g h.

HET GASANALYSE-APPARAAT.

Het principe is zeer eenvoudig. Door het dalen van het kwik, dat zich bevindt in een gecalibreerde buret 1 (zie fig. 3) wordt



Figuur 3.

een monster lucht naar binnen gezogen. Hiervan wordt het volumen gemeten; dan wordt dit luchtmonster in aanraking gebracht met een 10 pCt. KOH-oplossing, welke zich in pipet 4 bevindt, waar de CO_2 geabsorbeerd wordt; het volumen wordt opnieuw

gemeten. De vermindering van het volumen komt overeen met de hoeveelheid CO_2, welke het luchtmonster bevat.

Evenzoo gaat het met de zuurstof, die in pipet 5 wordt geabsorbeerd door een alkalische oplossing van pyrogallol.

Het volumen, dat een hoeveelheid lucht inneemt, is echter afhankelijk van de waterdampspanning, de temperatuur en den druk. Fouten, door verandering van deze drie factoren ontstaan, zijn echter geëlimineerd.

In buret 1 bevindt zich boven het kwik n.l. een weinig water, met H_2SO_4 even aangezuurd. De waterdampspanning in de buret is dus steeds verzadigd.

Alle buretten bevinden zich in een glazen bak, gevuld met water, dat van tijd tot tijd met den roerder 24 wordt omgeroerd. In dit water bevindt zich ook een compensatievat 10, dat eveneens $\pm$ 10 ccM. lucht en een weinig aangezuurd water bevat. Wanneer de kranen 11, 12, 13, 14, 15, 16 en 17 zóó staan, als ze in fig. 3 zijn aangegeven, waar ze op doorsnede zijn geteekend, wordt de lucht in buret 1 door het systeem van capillaire buizen heen slechts gescheiden van die in het compensatievat 10 door een petroleumdruppel, welke zich bevindt in de manometerbuis 23. Als deze druppel stilstaat, is de kruk aan beide zijden dezelfde. Bij kleine temperatuursveranderingen van het water zal in buret 1 en het compensatievat de druk met hetzelfde bedrag toenemen: de petroleumdruppel blijft op zijn plaats. Bij een volgende volumenaflezing moet de petroleumdruppel dus weder op dezelfde plaats staan. Aangezien men met een geheel gesloten systeem te doen heeft, is men onafhankelijk van veranderingen van den barometerstand.

De reden, waarom met de meeste apparaten de fouten van de analyses niet kleiner zijn dan 0.01 pCt., is volgens K r o g h, dat in de eerste plaats in de gasburet een inconstante hoeveelheid vuil aanwezig is, voornamelijk ontstaan door de aanraking van het kwik met een bewegende caoutchoucslang; in de tweede plaats, dat de hoeveelheid water, die zich in de gasburet bevindt, afneemt, doordat bij elke analyse eenig water overdestilleert naar de absorptievloeistoffen, welke een geringere waterdampspanning hebben dan zuiver water.

De twee verbeteringen, door K r o g h aangebracht, zijn nu de volgende:

Het op en neer bewegen van het kwik geschiedt niet door het op en neer bewegen van een niveauvat met een bewegelijke caoutchoucslang, doch door veranderingen van luchtdruk. Door middel van een waterstraalluchtpomp 32 en een vacuumflesch 33 wordt door kraan 21 heen de luchtdruk verminderd boven het kwik in vat 6, dat onderaan communiceert met buret 1. Hierdoor kan men het kwik uit buret 1 wegzuigen, en na vat 6 door kraan 21 weder in verbinding te hebben gesteld met de buitenlucht, het weder in buret 1 doen terugstroomen.

Aldus wordt op een zeer gemakkelijke en handelbare wijze het kwik op en neer bewogen, terwijl het nergens met bewegelijke caoutchoucdeelen in aanraking is.

De tweede, belangrijkste verbetering is het gebruik van drie afzonderlijke gasburetten, waarvan de eerste (1) dient voor het bewegen van de lucht naar en van de absorptiepipetten en voor het verzadigen van het luchtmonster met waterdamp; de tweede (2) voor het meten van het volumen van de lucht vóór en na de absorptie van CO_2; de derde (3) voor het meten na de absorptie van de O_2.

Deze beide laatste buretten bevatten eveneens eenig aangezuurd water (± 2 cmM.), juist genoeg om een verzadigde waterdampspanning van het luchtmonster te verzekeren en zoo weinig, dat, wanneer het kwikniveau in het wijde gedeelte van de buret staat, het water als een lijntje langs het kwikoppervlak te zien is. Het moet zóó weinig zijn, dat, bij het dalen van het kwik, het water in het wijde gedeelte aan den wand blijft hangen en niet mede gaat in het capillaire, gecalibreerde ondereinde, waar het een nauwkeurige aflezing van de positie van den kwikmeniscus zou schaden.

De inhoud van buret 2 is evenals die van buret 1 ruim 10 ccM.; de inhoud van het gecalibreerde ondereinde is slechts 0.4 ccM. = 4 pCt. van het totale volumen. Het is in gedeelten van 1 cmM. verdeeld, zoodat door schatting het volumen op 0.1 cmM. nauwkeurig kan worden afgelezen.

Wanneer de CO_2 uit het luchtmonster is geabsorbeerd, kan

het volumen in dezelfde buret 2 gemeten worden, daar het CO_2-gehalte van de lucht zelden meer dan 1 pCt bedraagt. Wanneer echter de O_2 uit de lucht is geabsorbeerd, is het volumen met ± 21 pCt. afgenomen en kan niet meer in buret 2 gemeten worden. Dit geschiedt nu in buret 3, welks inhoud ± 8 ccM. is.

Het capillaire ondereinde hiervan is in mijn toestel iets minder fijn gecalibreerd, n.l. in gedeelten van 5 cmM., zoodat aflezingen op 0.5 cmM. of 0.005 pCt. nauwkeurig kunnen plaats hebben.

Het op en neer bewegen van het kwik in de buretten 2 en 3 geschiedt op de reeds beschreven wijze met behulp van vat 7 en kraan 22. Dit is voldoende voor grove instelling van den kwikmeniscus. Voor fijne instelling dient de volgende inrichting.

Boven de kranen 18, 19 en 20 zijn zijbuisjes aangebracht, elk voorzien van een kort stukje vacuumslang, met een glazen stop afgesloten. Door het losser of vaster draaien van de klemkraantjes 29, 30 of 31 kan de hoeveelheid kwik hierin worden gewijzigd, waardoor een zeer fijne instelling kan worden verkregen. De klemkraantjes zijn gemonteerd op een frame, waardoor de slangetjes onbewegelijk worden vastgehouden en een betere fixatie van het kwikniveau in de buretten wordt bereikt.

De 10 pCt. KOH-oplossing, welke zich bevindt in de absorptiepipet 4 en het daarmede communieerende vat 8, is tevoren door schudden in evenwicht gebracht met lucht bij kamertemperatuur.

De pyrogallol-oplossing in pipet 5 en vat 9 is (naar H a l d a n e's voorschrift) een oplossing van 10 gr. zuivere pyrogallol (ik gebruikte hiervoor „Pyral" van H a u f f & Co.) op 100 ccM. verzadigde KOH-oplossing (s.g. 1.55). Deze oplossing moet verzadigd zijn met stikstof (lucht, bevrijd van CO_2 en O_2) en is daartoe in een fleschje ± 20 min. met lucht heftig geschud. De CO_2 en O_2 zijn spoedig door de vloeistof geabsorbeerd; door de stop af en toe een klein weinig te openen, zorgt men er voor, dat de stikstof een druk heeft van 1 atm. Het verwarmen van het fleschje door de hand dient te worden vermeden.

De absorptiepipetten worden geledigd, schoongemaakt en gevuld door de buizen 34 en 35, welke aan hare boveneinden naar achteren zijn omgebogen en met een stukje caoutchoucslang met stop zijn afgesloten. Aldus komt er nooit absorptievloeistof in aanraking met het water uit den glazen bak.

Het vat 8 staat met een capillaire buis met de buitenlucht in verbinding, waardoor heen slechts weinig CO_2 uit de kamerlucht diffundeert, zoodat de KOH-oplossing lang bruikbaar blijft.

De absorptievloeistof in vat 9 is door een KOH-oplossing in de reservoirtjes 36 en 37 van de buitenlucht afgesloten, zooals in de figuur te zien is.

Het construeeren van het apparaat.

Het gasanalyseapparaat en de overige apparatuur werden vervaardigd door den Heer P. A. de Bouter, Amanuensis van het Botanisch laboratorium te Utrecht. Menige technische moeilijkheid werd in overleg met hem opgelost. Een woord van dank voor de degelijke en bekwame wijze, waarop hij het dikwijls moeilijke werk tot stand heeft gebracht, is hier zeker op zijn plaats.

Voor het maken van de buretten werden uit een groot aantal capillaire glazen buizen eenige uitgezocht, die de vereischte, over de geheele lengte ongeveer constante, inwendige diameter hadden. Deze werden voorzien van de bollen 1, 2 en 3, waarvan de inhoud werd bepaald door het geheel met kwik te vullen en dit daarna te wegen. Door in de vlam het glas iets uit te blazen of een weinig te doen samenvallen werd ten slotte ongeveer de juiste inhoud verkregen.

De buretten werden vervolgens gecalibreerd. Daartoe werd er aan het benedeneinde een glazen kraantje aangeblazen, voorzien van een fijn uitgetrokken punt. De buret werd gevuld met gezuiverd kwik. Door hiervan een hoeveelheid te laten afvloeien en te wegen, werd het volumen bepaald tusschen twee merkstreepjes, boven en beneden den bol aangebracht.

Het aanbrengen van deze streepjes geschiedde met een mengsel van zwarte lak en terpentijn, tot een kleverige substantie ingedroogd, door middel van een aan eene zijde haarfijn uitgetrokken glazen staafje. Gedurende deze bewerkingen moet het kwik een bekende, constante temperatuur hebben. Hiertoe werd een watermantel om den bol aangebracht en de buis bij het kraantje door een laag watten tegen de warmte van de hand beschermd.

Nadat op deze wijze ook aan het benedeneind van de capillair

een punt bepaald was en een merkstreepje aangebracht, werd de ruimte tusschen de streepjes voorzien van calibreering.

Buret 1 werd van 6.4 tot 10.3 ccM. verdeeld in deelen van 10 cmM.; buret 2 van 9.57 tot 10.03 ccM in deelen van 1 cmM. en buret 3 van 7.0 tot 8.3 ccM. in deelen van 5 cmM.

De calibreering werd gecontroleerd op de boven beschreven wijze. Voor het capillaire gedeelte was hiertoe het aanbrengen van een watermantel niet noodig; het aflezen van de temperatuur der kamerlucht was voldoende. Van de nog gevonden, geringe afwijkingen werd een correctietabel voor elke buret samengesteld.

De buretten 1, 2 en 3 werden nu met de kranen 11, 12 en 13 tot één geheel vereenigd en met koperen staafjes op den rand van den bak bevestigd. De glazen buizen passeeren den doorboorden bodem van dezen bak en zijn daarmede met een stuk zachte caoutchoucslang waterdicht verbonden, zonder dat het glas geklemd wordt, zooals in fig. 3 bij buret 1 is aangegeven.

Een tweede geheel vormen de absorptiepipetten 4 en 5, met de kranen 14, 15 en 16. Dit is afzonderlijk gemonteerd en kan apart verwijderd worden.

Een derde geheel vormen het compensatievat 10, de kraan 17 en de manometerbuis 23.

De drie genoemde deelen zijn met vacuumslang glas op glas verbonden.

Ter waarschuwing voor volgende onderzoekers wil ik hier eenige constructiefouten vermelden, die ik in den aanvang heb gemaakt.

In de eerste plaats vertoonden de kranen uiterst geringe lekken. Het meerendeel der in den handel verkrijgbare kranen is n.l. voor het beoogde doel niet geschikt. Door inslijpen met fijn amarilpoeder gelukte het mij dit euvel gedeeltelijk te verhelpen. De kranen 16 en 17 werden door andere vervangen, speciaal voor het doel besteld. Daar ook kraan 11 goed afsloot, was een lek naar de buitenlucht uitgesloten. Daar het verder steeds mogelijk was, bij groote drukverschillen binnen het apparaat de absorptiepipetten door twee kranen van de plaats van drukverandering af te sluiten, kan het onverhoopt opzuigen van absorptievloeistof tot in de kranen worden vermeden.

Een tweede fout was, dat het gedeelte van het apparaat, dat buiten het water uitstak, een te groot luchtvolumen bevatte ten opzichte van den inhoud van de buretten (± 14 pCt.). Om dit volumen aan weerszijden van de manometerbuis gelijk te maken, werd boven kraan 17 een verwijding aangebracht, zoodat veranderingen in de kamertemperatuur nog slechts zeer geringen invloed hadden op den stand van den petroleumdruppel. Bovendien werden de capillairen grootendeels met watten omwikkeld om ze af te sluiten van de warmte van de handen bij het openen en sluiten van de kranen.

Een derde fout maakte ik bij het ijken van de buretten. Ik heb n.l. over het hoofd gezien, dat de calibreering moet aangeven het werkelijk volumen, vermeerderd met den inhoud van kraan 11.

Alvorens een monster lucht in het apparaat te brengen, wordt n.l. kraan 11 in stand ⊥ gebracht en een weinig van de te onderzoeken lucht wordt door capillair 26, kraan 11 en capillair 25 gedreven om deze schadelijke ruimte door te spoelen. Zet men kraan 11 nu in zijn ouden stand terug, dan is de inhoud van deze kraan aan te onderzoeken lucht reeds in het apparaat gebracht, zonder dat men nog iets daarvan heeft ingezogen.

Om deze kleine fout te elimineeren werd boven het 0-streepje op buret 1 een kleine verwijding aangebracht en daarboven weder een streepje, zoodanig, dat het volumen tusschen deze streepjes overeenkwam met den inhoud van kraan 11. Vóór het begin van elke analyse werd het niveau van het water boven het kwik gezet op het onderste streepje, bij alle volgende volumenaflezingen (in de buretten 2 en 3) of het bovenste streepje.

Het overbrengen van een luchtmonster geschiedt met een gashouder 38, waarin het kwik, met behulp van een niveauvat 39 op en neer kan worden bewogen.

In bijna alle proeven heb ik mij beperkt tot CO_2-bepalingen en de bepaling van het O_2-gehalte achterwege gelaten.

Daar ik echter te voren niet wist of hiermede mijn doel bereikt kon worden, heb ik het apparaat ook voor O_2-analyses geschikt gemaakt.

Na al de genoemde verbeteringen en voorzorgen, gelukte het

ten slotte, de nauwkeurigheid der CO_2-bepalingen tot $\pm$ 0.001 pCt. op te voeren (men zie de dubbelbepalingen in de tabellen, die gewoonlijk niet meer dan 0,002 pCt. van elkander afwijken).

Het aflezen van het kwikniveau in de buretten geschiedt met een loupe, waarbij de parallaxfout op de volgende wijze vermeden wordt. Vóór de loupe is een wit papier aangebracht, waarin een spleetvormig diaphragma is geknipt. Bekijkt men hierdoor heen de kwikzuil in de buret, het diaphragma dwars houdende, dan ziet men dit als een donker vlekje op de kwikzuil weerkaatst. Men zorgt nu dat dit vlekje steeds vlak onder den meniscus te zien is; het oog heeft dan ten opzichte van den meniscus steeds denzelfden stand.

Voorbeeld van een CO_2-analyse.

Verondersteld wordt, dat zich in het apparaat slechts CO_2-vrije lucht bevindt, alle menisci op hun 0-punt staan (die in buret 1 op de onderste streep) en de kranen zooals in fig. 3 aangegeven. De stand van den petroleumdruppel wordt afgelezen, daarop kraan 16 en 17 in stand $\times$ gezet. Nu komt kraan 11 in stand $\perp$; de gashouder wordt glas op glas met buis 26 verbonden, het niveauvat 39 eenige cM. omhoog geschoven, waardoor in den gashouder een overdruk ontstaat en door eenige malen kraan 40 van den gashouder kort te openen, de schadelijke ruimte tusschen 40 en 11 doorgespoeld. Nu wordt kraan 11 in stand $\perp$ gezet, de waterstraalluchtpomp in werking gesteld, kraan 41 van de vacuumflesch in stand $\dashv$, kraan 21 in stand $\vdash$ gezet en kraan 40 van den gashouder opnieuw geopend. Nu wordt door het openen van kraan 18 het luchtmonster, $\pm$ 10 ccM. groot, naar binnengezogen, waarna men kraan 18 sluit. Het kwik in niveauvat en gashouder wordt nu nauwkeurig op gelijke hoogte gesteld door op- of neerschuiven van het niveauvat 39, kraan 40 gesloten en kraan 11 in stand $\sqcap$ gezet. Nu komt kraan 12 in stand $\dashv$, kraan 14 in stand $\times$, kraan 21 in stand $\perp$ en kraan 22 in stand $\perp$; kraan 18 en 19 worden voorzichtig geopend en het luchtmonster van buret 1 in buret 2 overgebracht. De meniscus van het water in buret 1 komt op de bovenste streep te staan.

De grove regeling van den luchtdruk in buret 2 geschiedt met

behulp van de KOH-meniscus in pipet 4; kraan 12 wordt in stand ⊤ en kraan 14 in stand ⊣ gezet. De KOH-meniscus verspringt hierbij gewoonlijk van plaats en wordt door draaien aan klemkraan 30 op zijn plaats teruggebracht. Nu komt kraan 14 weer in stand ⊥ en opent men voorzichtig één voor één de kranen 16 en 17, daarbij zoolang aan klemkraan 30 draaiende, totdat de petroleummeniscus op zijn plaats blijft, waarop de beide kranen in stand ⊣ worden gezet en de petroleumdruppel nauwkeurig op zijn ouden stand wordt ingesteld.

Tusschen de bedrijven door wordt de roerder 24 door een motor in beweging gebracht, om voor een gelijkmatige temperatuur van het water te zorgen.

De menisci in 1 en 4 worden gecontroleerd en de stand van het kwik in 2 afgelezen. Meestal duurt het 2 à 3 minuten, vóórdat het volumen van de lucht volkomen constant is geworden.

Kranen 16 en 17 komen in stand ⤫, kraan 14 in stand ⊣, kraan 12 in stand ⊢ en kraan 22 in stand ⌊. Nu wordt kraan 19 geopend en het luchtmonster uit buret 2 in pipet 4 gedreven, waarop kraan 12 in stand ⊥ wordt gezet. Door het ± 10 ⤫ op en neer bewegen van het kwik in buret 1 wordt de schadelijke ruimte tusschen de kranen uitgespoeld en alle CO_2, welke zich daarin mocht bevinden, geabsorbeerd. Bij zeer hooge CO_2-concentraties wordt ook de schadelijke ruimte tusschen kraan 12 en den meniscus in 2 nog even doorgespoeld, hoewel dit gewoonlijk overbodig is. Het luchtmonster wordt dan in buret 1 en vandaar opnieuw in buret 2 overgebracht, op de boven beschreven wijze op den juisten druk gebracht en gemeten. De vermindering in volumen komt overeen met het gehalte aan CO_2. Eventueele correcties voor de fouten in de calibreering van de buret worden aangebracht en het CO_2-gehalte in pCt. berekend.

Daarna wordt de lucht door kraan 16 uit het apparaat gedreven, terwijl men den meniscus in buret 1 weer op de onderste streep zet. Men is nu weer voor een nieuwe analyse gereed.

Indien zoowel het CO_2- als het O_2-gehalte moet worden bepaald, geschiedt dit op analoge wijze, alleen moet dan vóór het begin der analyse het apparaat met stikstof gevuld zijn. Het uitspoelen van de schadelijke ruimte bij de O_2-absorptie duurt lan-

ger dan bij de CO_2-absorptie; ik bewoog het kwik in buret 1 daarbij 30-40 × op en neer. K r o g h doet dit slechts 6 ×, waarschijnlijk omdat in zijn toestel de schadelijke ruimte naar verhouding zooveel geringer is.

Eenige analyses van atmospherische lucht (van het dak van het laboratorium) volgen hier.

TABEL 1.

	CO_2	O_2	N_2
	0,028	20,951	79,021
	0,030	20,934	79,036
	0,030	20,926	79,064
	0,033	20,885	79,082
	0,027	20,921	79,051
Gemiddeld . .	0,030	20,923	79,051

K r o g h vindt bij atmospherische lucht van een straat in Kopenhagen een CO_2-gehalte, dat varieert tusschen ± 0.030 en 0.039 pCt. en een N_2-gehalte, dat varieert tusschen ± 79.040 pCt. en 79.055 pCt. Al waren mijn O_2-bepalingen niet zoo nauwkeurig als ik gewenscht had, toch moge uit de overeenstemming van bovenstaande analyses met K r o g h's bepalingen een behoorlijke ijking van het apparaat blijken.

Moeten de buretten worden schoongemaakt, dan laat men het kwikniveau dalen tot vlak beneden de genoemde zijbuisjes, verwijdert de stukjes vacuumslang en verbindt met een ander stukje caoutchoucslang het zijbuisje met een rechthoekig omgebogen buis, waardoor men een oplossing van kaliumbichromaat in verdund zwavelzuur in de buret laat loopen, waarna het caoutchoucslangetje wordt dichtgeklemd. Na een dag staan wordt de kaliumbichromaatoplossing weder afgetapt, de buret zorgvuldig met gedestilleerd water uitgewasschen, dat schoon moet afloopen zonder aan den wand druppels te vormen en ten slotte gedroogd door het doorzuigen van lucht.

Om het aangezuurde water, dat boven het kwik moet staan, in de buret te brengen, verwijdert men de kraan aan het boveneinde, brengt het kwikniveau tot boven aan toe, en brengt vervolgens met een klein pipetje de vereischte hoeveelheid water boven het kwik, dat men met het klemkraantje langzaam doet dalen.

Voor het invetten van de kranen gebruikte ik rubbervet, bestaande uit 1 deel ongevulcaniseerde rubber, bij ± 100° C. in 5 deelen vaseline opgelost.

DE PROEFOPSTELLING.

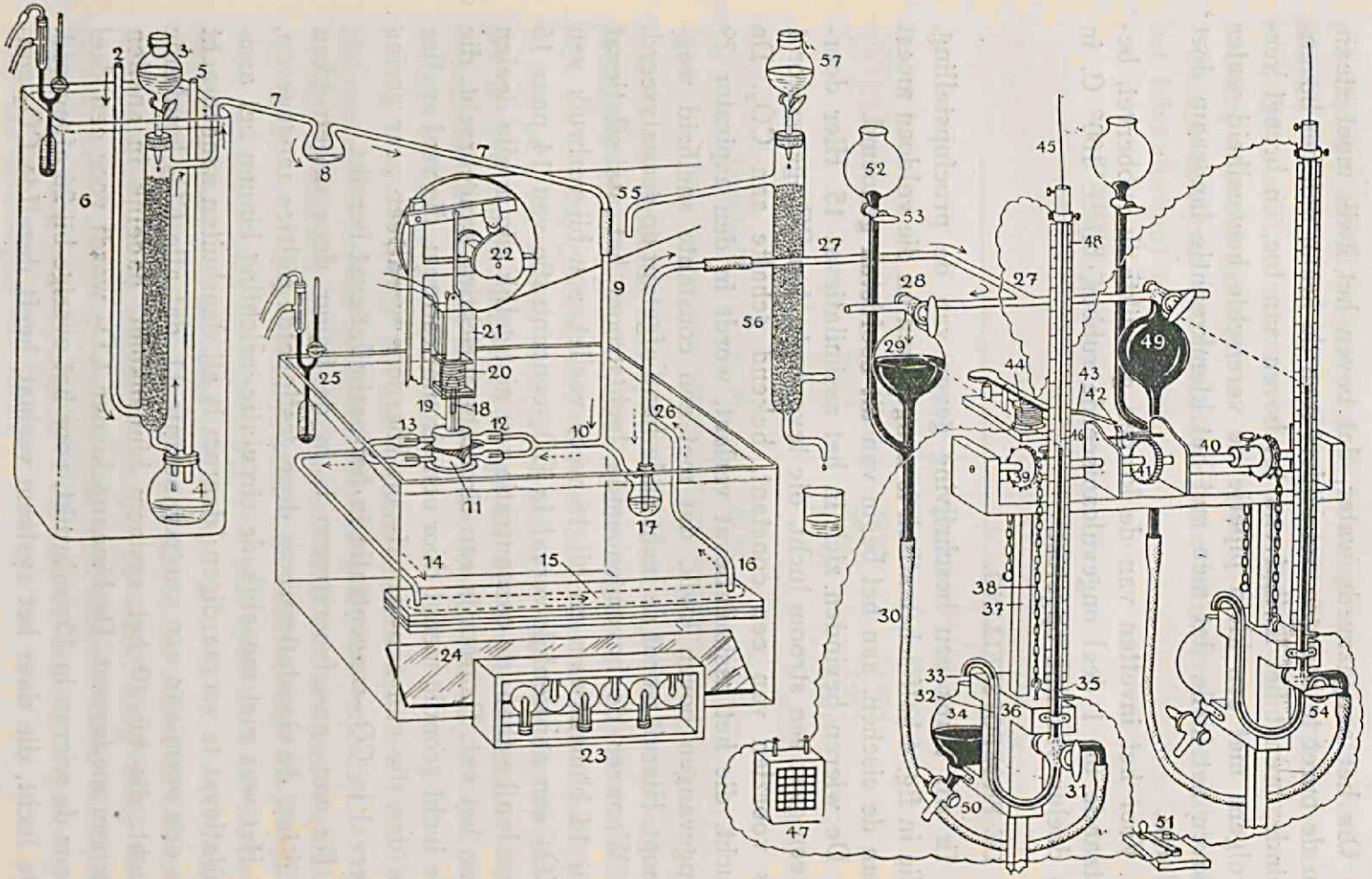
Ik wil thans een beschrijving geven van de proefopstelling, die in fig. 4 half-schematisch is aangegeven en die voldoen moest aan de eischen, aan het begin van dit hoofdstuk genoemd.

De wieren bevinden zich in het assimilatievat 15. Hier doorheen gaat een stroom lucht, die tevoren in den CO_2-generator 1 is voorzien van een constant, bekend gehalte aan CO_2. De lucht, die het assimilatievat verlaat, wordt in den aspirator 29 opgevangen boven kwik, dat met een constante snelheid wegloopt. Hieruit wordt de lucht naderhand afgetapt en geanalyseerd.

Wanneer de bovengenoemde luchtstroom het assimilatievat bij 14 binnenkwam en bij 16 weer verliet, zou bij verbruik van CO_2 een aanzienlijk verval in CO_2-concentratie van 14 naar 16 moeten bestaan; de concentratie zou niet gelijk zijn in alle deelen van het vat. Daarom is een circulatie-inrichting aangebracht, die de lucht grondig mengt door een circulatiestroom, die veel sneller is, dan die van aan- en afvoer. Hierdoor wordt een zeer gering verval in CO_2-concentratie in het assimilatievat bereikt.

De aan- en afvoerstroom is in de figuur door uitgetrokken pijltjes, de circulatiestroom door gestippelde pijltjes aangegeven.

Het was niet mogelijk de circulatie-inrichting binnen het assimilatievat te vervaardigen; daarom is zij daarbuiten aangebracht in den vorm van een zuigperspompje 11, dat alle CO_2 houdende lucht, die bij 10 het systeem binnenkomt, dadelijk in snellen stroom medevoert. De binnengekomen CO_2 wordt voor een deel door de wieren in 15 verbruikt, voor het overige bij 26 afgevoerd. De lucht, die daar het systeem verlaat, heeft dezelfde CO_2-con-


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
55
56
57

Figuur 4.

centratie als die in het assimilatievat; uit het verschil in concentratie van aan- en afvoerlucht benevens de snelheid van aan- en afvoer wordt de assimilatie in cmM. CO_2 per uur berekend.

De snelheid van aan- en afvoer wordt bepaald door de snelheid, waarmede het kwik uit den aspirator 29 wegloopt; deze snelheid wordt langs electrischen weg geregeld en automatisch constant gehouden. Aspirator 29 staat door het geheele buizensysteem heen bij 2 in open communicatie met de buitenlucht; evenveel lucht als per minuut het vat 29 binnenkomt, wordt bij 2 in den generator gezogen, treedt bij 10 het circulatiesysteem binnen en verlaat het bij 26. Na eenigen tijd stelt zich een evenwicht in tusschen aanvoer, verbruik en afvoer van CO_2. De afvoerlucht is dan voor de analyse geschikt en wordt daartoe, zonder onderbreking van den constanten stroom, op een tweeden aspirator 49 overgeschakeld.

Een beschrijving van de constructie en de werking van de afzonderlijke apparaten moge hier volgen.

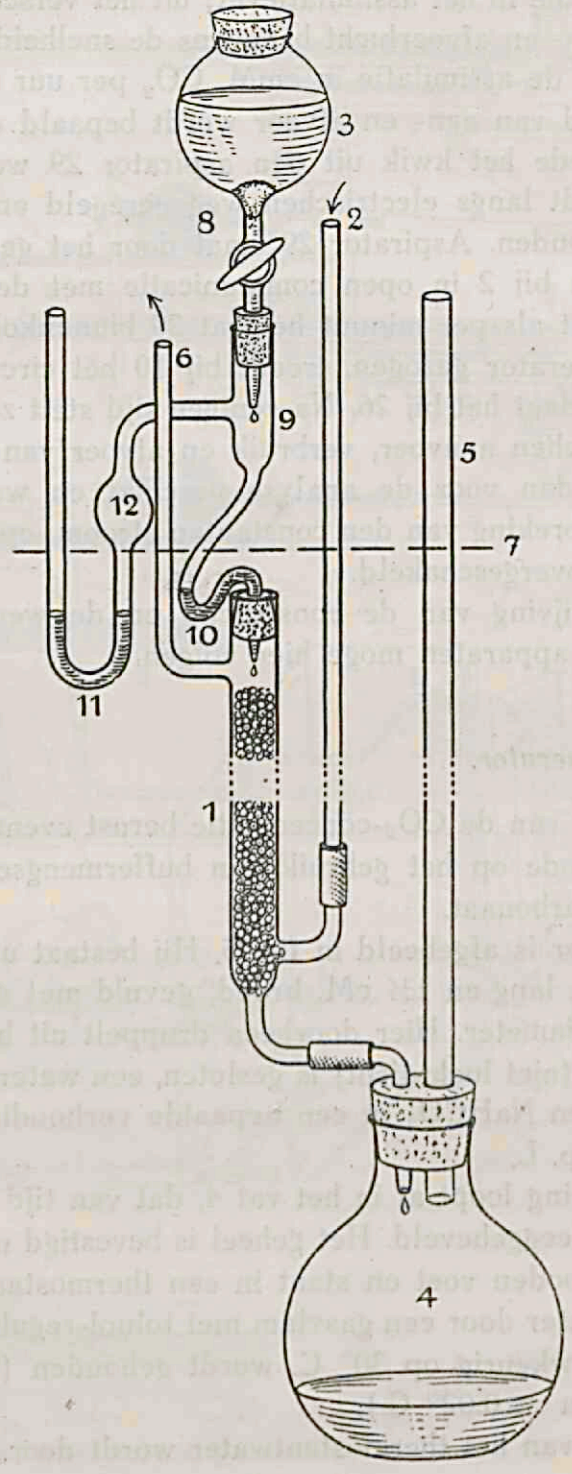
De CO_2-generator.

De regeling van de CO_2-concentratie berust evenals bij W a r b u r g's methode op het gebruik van buffermengsels van carbonaat en bicarbonaat.

De generator is afgebeeld in fig. 5. Hij bestaat uit een glazen buis 1, 40 cM. lang en 1½ cM. breed, gevuld met glazen kralen van 2 m.M. diameter. Hier doorheen druppelt uit het vat 3, dat met een kurk (niet luchtdicht) is gesloten, een waterige oplossing van Na_2CO_3 en $NaHCO_3$ in een bepaalde verhouding, te samen 0.5 grammol. p. L.

Deze oplossing loopt af in het vat 4, dat van tijd tot tijd door buis 5 wordt leeggeheveld. Het geheel is bevestigd op een statief met zwaren looden voet en staat in een thermostaat (fig. 4, 6), waarin het water door een gasvlam met toluol-regulator en roerinrichting nauwkeurig op 30° C. wordt gehouden (temperatuurschommelingen ± 0.02° C.).

Het niveau van het thermostaatwater wordt door de streeplijn 7 in fig. 5 aangegeven.



Figuur 5.

De lucht treedt door buis 2 in den generator, passeert ongehinderd de openingen tusschen de kraaltjes, waarlangs de oplossing neervloeit (tegenstroomprincipe) en is, boven aangeland, daarmede in evenwicht. Lucht, bij een bepaalde temperatuur in evenwicht gebracht met een dergelijke bufferoplossing van Na_2CO_3 en $NaHCO_3$, heeft n.l. een zeer bepaalde CO_2-concentratie, die des te hooger is, naarmate de oplossing meer $NaHCO_3$ en minder Na_2CO_3 bevat.

De buis 6 is van binnen geparaffineerd, om het capillair opkruipen van het buffermengsel langs den wand tot buiten het bereik van het thermostaatwater te verhinderen.

De druppelsnelheid is niet goed met een kraan te regelen; daarom wordt, na het ingieten van het buffermengsel in 3, met een pincet bij 8 een propje watten aangebracht en stevig aangedrukt, zoodanig, dat er elke 4 of 5 seconden één druppel valt, hetgeen bij 9 gecontroleerd wordt. In het S-vormig gedeelte 10 komt het mengsel op de juiste temperatuur, alvorens de generatorbuis 1 binnen te komen.

Het is meermalen voorgekomen, dat ik vergat het vat 4 tijdig leeg te hevelen. Er wordt dan in plaats van lucht buffermengsel door den generator gezogen in het circulatiesysteem en zelfs in den aspirator. Het kost dan zeer veel tijd om al deze apparaten weer schoon te krijgen.

Daarom is er een veiligheidsbuisje 11 aangebracht, waarin zich een weinig water bevindt. Zoodra door het opzuigen van buffermengsel in buis 1 een onderdruk ontstaat, wordt buitenlucht door 11 en 10 naar binnen gezogen, waarbij men in de verwijding 12 luchtbelletjes door het water ziet borrelen.

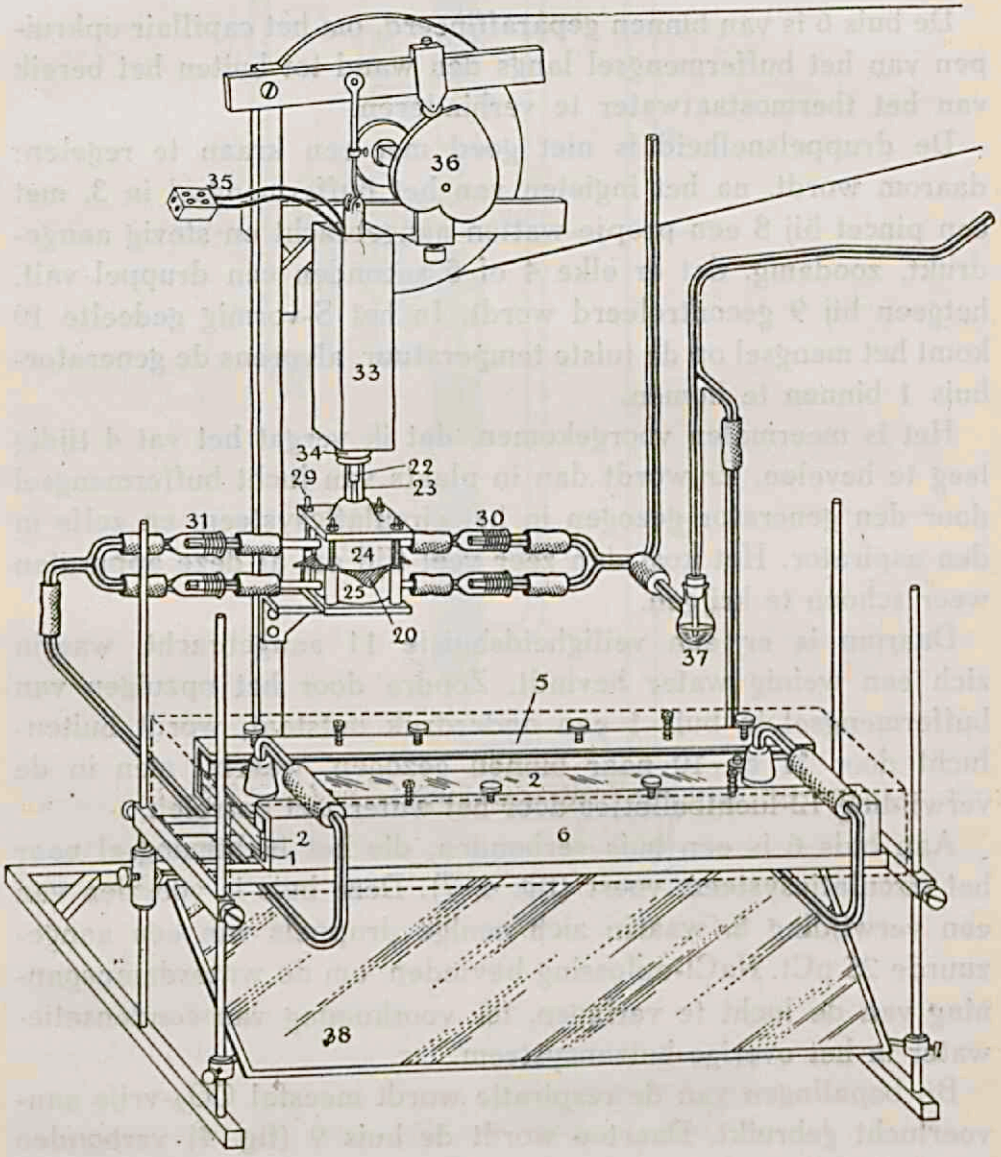
Aan buis 6 is een buis verbonden, die het luchtmengsel naar het circulatiesysteem voert (fig. 4, 7). Deze buis is voorzien van een verwijding 8, waarin zich eenige druppels van een aangezuurde 25 pCt. NaCl-oplossing bevinden, om de waterdampspanning van de lucht te verlagen, ter voorkoming van condensatiewater in het overige buizensysteem.

Bij bepalingen van de respiratie wordt meestal CO_2-vrije aanvoerlucht gebruikt. Daartoe wordt de buis 9 (fig. 4) verbonden met buis 55 van een generator 56, waar doorheen uit het vat 57

een 2 pCt.-oplossing van KOH druppelt. Deze oplossing loopt weder langs kraaltjes naar beneden, waar tusschendoor de lucht strijkt, die aldus van CO_2 wordt bevrijd.

Het circulatiesysteem.

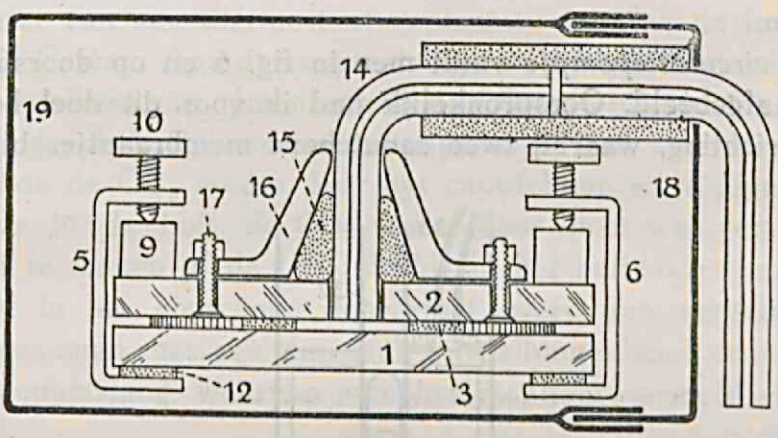
Hieronder versta ik het assimilatievat te samen met de inrichting voor luchtcirculatie, in fig. 6 afzonderlijk afgebeeld. Zij zijn



Figuur 6.

samen gemonteerd op een statief van zwaar vernikkeld koper, dat vóór en na de proeven in zijn geheel in en uit den thermostaat (fig. 4, 25) wordt genomen.

Het *assimilatievat* (zie figuur 6 en 7) wordt gevormd door twee glazen platen (1 en 2) als boven- en benedenwand. De benedenwand heeft, zooals reeds in Hoofdstuk III is gezegd, de bodem gevormd van het vijvertje (fig. 2, 1) waarin de wieren zijn gekweekt, welke nu op een zeer dun vloeistofvliesje op deze plaat liggen. Dezelfde ± 5 mM. breede caoutchouc ring (fig. 2, 3), als daar gebruikt werd, dient nu als zijwand van het assimilatie-



Figuur 7.

vat. Daar deze ring ± 0.8 m.M. dik is, is dit dus tevens de hoogte van het assimilatievat. Deze ring wordt met vaseline een weinig ingevet en met de twee vernikkeld koperen klemmen 5 en 6 tusschen de boven- en benedenwand ingeperst; daardoor wordt een lucht- en waterdichte afsluiting bereikt en een assimilatievat gevormd, dat 24 c.M. lang, 4 c.M. breed en 0.8 m.M. hoog is.

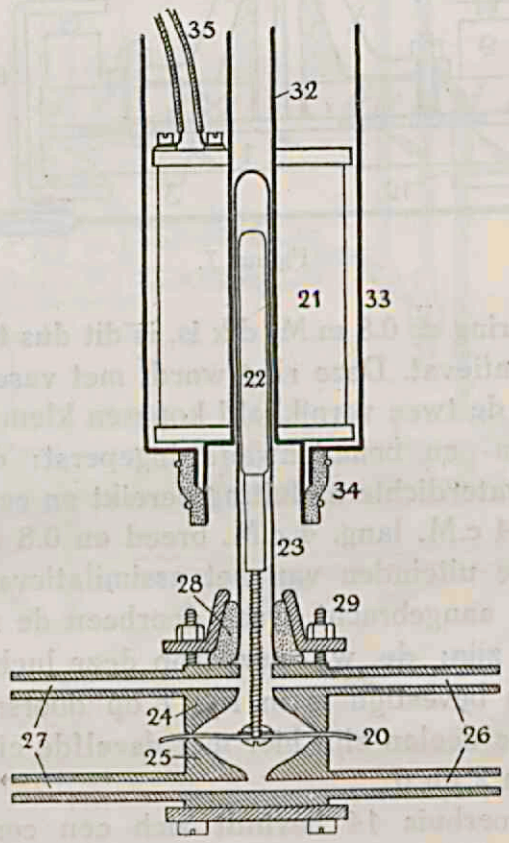
Aan de beide uiteinden van het assimilatievat zijn gaten in den bovenwand aangebracht, waar doorheen de aan- en afvoerbuis gestoken zijn; de wijze waarop deze luchtdicht aan den bovenwand zijn bevestigd is in fig. 7 op doorsnede afgebeeld. De verschillende deelen zijn hier met dezelfde cijfers aangeduid als in de figuren 2 en 6.

Om de aanvoerbuis 14 bevindt zich een conisch gesneden caoutchouc stop 15, die door een conisch uitgehold stuk vernik-

keld koper 16 met behulp van de schroeven en moeren 17 stevig op den bovenwand 2 van het assimilatievat wordt vastgedrukt. De caoutchoucring 3 loopt juist buiten de uitmonding van de buis 14 om, doch blijft binnen de koppen van de schroeven 17.

Het assimilatievat kan in een doos van vernikkeld koper van het licht worden afgesloten (in fig. 6 met stippellijn aangegeven). De eigenlijke doos wordt gevormd door een voorwand (fig. 7, 18) en twee zijwanden en is aan het statief vast verbonden. De twee zijwanden dragen uitsteeksels, waarop het assimilatievat rust, zoodanig, dat de deksel 19, welke de boven-, onder- en achterwand vormt, er ongehinderd op- en afgeschoven kan worden.

Het *circulatiepompje* vindt men in fig. 6 en op doorsnede in fig. 8 afgebeeld. Oorspronkelijk had ik voor dit doel bestemd een inrichting, waarbij twee caoutchouc membraantjes bij wijze



Figuur 8.

van zuigers beurtelings op en neer werden bewogen. Het bleek echter, dat zulke caoutchouc membranen, aan één zijde in aanraking met de buitenlucht of met het water van de thermostaat, met groote snelheid CO_2 doorlaten. Dit hangt samen met het feit, dat CO_2 in caoutchouc oplosbaar is.

Om mij van deze oplosbaarheid een denkbeeld te vormen nam ik het volgende proefje.

In een aan eene zijde gesloten glazen buis werd een stuk caoutchouc gedaan, de buis met CO_2-gas gevuld en het open einde verbonden met een capillaire buis, waarin zich een gekleurde petroleumdruppel bevond; daarna werd de buis snel in het water van een thermostaat geplaatst, waarvan de temperatuur 20° C. was. Aan de verplaatsing van den petroleumdruppel kon de snelheid van opneming van de CO_2 van minuut tot minuut worden gevolgd. Op overeenkomstige wijze kon worden vastgesteld, hoe de CO_2 weder door het caoutchouc werd afgegeven, wanneer in de buis de CO_2 weder door lucht was vervangen. Om uit te maken of de CO_2 slechts in het buitenste laagje oplost, of in het coutchouc doordringt, werd een vergelijkende proef genomen met een dun stuk rijwielbinnenband en een dik stuk vacuumslang, waarvan men het resultaat vermeld vindt in tabel 2.

Men ziet hieruit, dat de snelheid, waarmede de CO_2 wordt opgenomen, in het eerste geval zeer snel, in het tweede geval zeer langzaam afneemt. Blijkbaar is het 1 m.M. dikke stuk binnenband spoedig tot in zijn binnenste met CO_2 verzadigd, terwijl hiervoor bij het dikke stuk slang veel meer tijd noodig is; de CO_2 dringt dus met behoorlijke snelheid in het caoutchouc door.

Tevens blijkt, dat een stuk binnenband in een uur reeds bijna $\frac{3}{4}$ van zijn volumen aan CO_2 kan opnemen.

Caoutchouc is dus voor CO_2-dichte afsluiting geen ideaal middel. Het is echter moeilijk, om iets beters te vinden. Insmeren met vaseline heeft weinig invloed. Ook allerlei andere stoffen, zooals celloïdine en zelfs vaste paraffine, bleken met aanmerkelijke snelheid CO_2 te absorbeeren.

Deze moeilijkheid is nu voor het circulatiepompje opgelost,

door het membraantje, dat als zuiger dienst doet, afgesloten te houden van het water in de thermostaat (zie fig. 8). De krachtoverbrenging, noodig voor het op en neer bewegen van het membraantje 20, geschiedt door een electrische spoel 21, die een staafje week ijzer 22, dat zich in het van boven gesloten glazen buisje 23 bevindt, op en neer trekt.

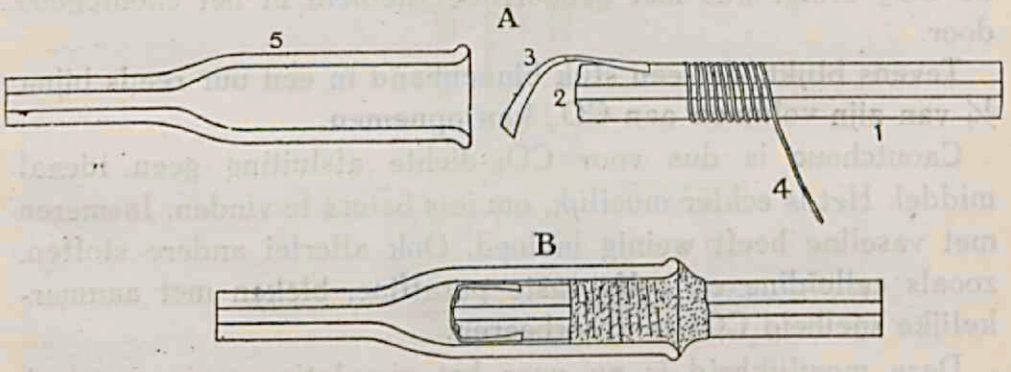
Het membraantje 20 zit geklemd tusschen twee cylindertjes 24 en 25, elk voorzien van een aan- en afvoerbuis 26 en 27, die elk weder van een ventieltje 30 en 31 zijn voorzien.

De luchtdichte bevestiging van het glazen buisje 23 geschiedt weder met een kegelvormige, doorboorde caoutchouc stop 28, stevig aangedrukt door het aandraaien van de moeren 29, waardoor tevens de twee cylindertjes op elkander worden geklemd.

Het membraantje mag niet te strak gespannen zijn. Het stukje week ijzer moet in zijn glazen omhulsel vrij kunnen bewegen, zoodat het rammelt wanneer men er tegen tikt.

De electrische spoel wordt van het water van de thermostaat afgesloten door een huls, die uit twee deelen 32 en 33 bestaat, met caoutchoucslang 34 waterdicht verbonden. Met de geleidingsdraden 35 wordt de spoel, met tusschenschakeling van een lampweerstand, op den stadsstroom aangesloten.

Met behulp van den electromotor, die ook de roerders van de beide thermostaten in beweging brengt, wordt de hartvormige schijf 36 (fig. 6) rondgedraaid, waardoor de electrische spoel op en neer gaat en het pompje functioneert. Het pompje maakt ± 88 slagen per minuut en veroorzaakt een circulatiestroom van 5 L. per uur.



Figuur 9.

De *ventieltjes* moeten buitengewoon weinig weerstand hebben. Dit wordt bereikt door ze te maken als op fig. 9 is aangegeven. Een glazen capillair 1 wordt aan zijn eene einde zoodanig geslepen, dat de eigenlijke uitmonding 2 iets uitsteekt en daarna in de vlam even glad gesmolten. Over deze uitmonding wordt, met een weinig gesmolten was en hars, een reepje uiterst dun caoutchouc 3 bevestigd, zoodat het de opening juist afsluit. Een overdruk van enkele c.M. water in de eene richting moet echter voldoende zijn om de lucht er door te drijven, terwijl bij eenzelfden druk in de andere richting het membraantje de opening 2 luchtdicht moet afsluiten.

Het buisje 1 wordt nu met zeer dun touw 4 omwonden, zoodat het, gestoken in het buisje 5, daarin een weinig klemt.

Met een gesmolten mengsel van was en hars, dat men tusschen het touw laat loopen, worden de beide buisjes aan elkaar gekit, zooals bij B te zien is.

In het circulatiesysteem is opgenomen een klein *waschfleschje* 37 (fig. 6), dat een weinig gedestilleerd water bevat. Aan het borrelen van de luchtbelletjes daar doorheen kan de circulatiestroom worden gecontroleerd. Het houdt de lucht op verzadigde waterdampspanning en voorkomt het uitdrogen van de wieren.

De verschillende deelen van het circulatiesysteem zijn met stukjes vacuumslang aan elkaar verbonden; dit geschiedt steeds glas op glas, met het oog op de groote doorlaatbaarheid van caoutchouc voor CO_2. De ring, welke het assimilatievat afsluit levert, wat dit betreft, nog de meeste kans op lekken van CO_2; deze bleken echter in de practijk minimaal te zijn en konden bovendien in rekening worden gebracht.

De *thermostaat* (fig. 4, 25) waarin het circulatiesysteem kan worden geplaatst, is een bak met wanden van spiegelglas en is van een roerinrichting voorzien. De bak is gevuld met leidingwater, dat dikwijls ververscht moet worden, daar het door bacteriënontwikkeling spoedig troebel wordt. Ook gedestilleerd water blijft niet lang helder.

In deze thermostaat kan de temperatuur door het bijvoegen van warm of koud water naar willekeur worden veranderd en door een gasvlam met verstelbaren toluolregulator binnen 15

minuten constant gemaakt worden op minder dan 0.1°. Voor de regeling van temperaturen bij of beneden de kamertemperatuur bevindt zich in den bak een meermalen gebogen looden buis, waardoorheen men het koude water uit de waterleiding kan laten loopen.

De belichting.

De belichting (fig. 4, 23) heeft plaats door één tot zes 50-kaars lampjes (Philips ½ Watt 6-8 Volt autolampjes), welke op een accumulatoren-batterij branden, terwijl door middel van een regelbaren weerstand het voltage kan worden geregeld en de lichtintensiteit op 1 pCt. constant kan worden gehouden. Voor nog hoogere lichtintensiteiten dient een Philips projectielamp (± 1650 kaars), welke veel minder constant licht geeft, daar zij op het stadsnet brandt, waarvan het voltage vrij sterk schommelt.

Het licht valt op een spiegel (fig. 6, 38), welke onder een hoek van 45° onder het assimilatievat is aangebracht, en treft de wieren uitsluitend loodrecht van onderen. Ander licht wordt door zwart papier afgeschermd.

Ik heb aan deze wijze van belichting de voorkeur gegeven boven een belichting van twee zijden. Daar n.l. de wieren aan de bovenzijde aan de lucht grenzen, zou door het groote verschil in brekingsindex waarschijnlijk een lenswerking ontstaan, waardoor men groote verschillen in lichtintensiteit binnen de cel zou krijgen.

De Aspirator.

Deze regelt de snelheid van den luchtstroom, die het circulatiesysteem in- en uitgaat, door middel van kwik, dat met constante, regelbare snelheid wegloopt.

De manier, waarop dit wordt bereikt, is in fig. 4 schematisch aangegeven. Uit het vat 29 loopt het kwik door de caoutchoucbuis 30, de driewegkraan 31 en vervolgens door een glazen capillair met een zeer nauw gedeelte 32, waarin de kwikstroom grooten weerstand ondervindt, en druppelt bij 33 in het vat 34, dat dient om het op te vangen. De snelheid van dezen kwikstroom wordt beheerscht 1° door de hoogte van de kwikzuil boven de uitmonding 33, 2° door den constanten weerstand in 32.

Wanneer in het vat 29 het kwikniveau daalt, zou de stroomsnelheid afnemen, wanneer niet de uitmonding 33 tegelijkertijd daalde.

Dit nu geschiedt automatisch. Aan de driewegkraan 31 is n.l. verbonden een capillaire glazen buis 35, waarin het kwikniveau even hoog staat als in het vat 29, daar deze beide communiceerende vaten vormen. Capillair 35, kraan 31, weerstand 32 en vat 34 zijn gemonteerd op een houten blok 36, dat langs staaf 37 schuiven kan en aan ketting 38 is opgehangen. Deze ketting loopt over een tandrad 39, dat met een schroef op de as 40 kan worden vastgezet. Draait deze as, dan wordt door middel van een aantal tandraadjes 41 (er zijn er slechts twee geteekend) het windvleugeltje 42 in snel draaiende beweging gebracht. Dit windvleugeltje wordt gestopt wanneer de hefboom 43 naar beneden wordt getrokken, hetgeen geschiedt, wanneer door den electromagneet 44 een zwakke electrische stroom gaat; hierdoor worden tevens de as 40, het tandrad 39 en het blok 36 gefixeerd.

Nu is van boven af in de capillair 35 een ijzerdraad 45 gestoken, die voorzien is van een fijne platinapunt 46. Maakt deze punt contact met het kwik, dan gaat, via het schakelaartje 51, een stroom uit den accumulator 47 door den electromagneet 44: het windvleugeltje wordt vastgehouden. Daalt nu in het vat 29, dus ook in den cappillair 35, het kwikniveau, dan wordt het contact met de platinapunt verbroken; het windvleugeltje wordt losgelaten en het blok 36 begint langzaam naar beneden te schuiven, waardoor het windvleugeltje in draaiende beweging raakt. Zoodra de platinapunt het kwik weer bereikt, wordt de beweging weer gestopt.

Aldus wordt de kwikzuil boven de uitmonding 33 steeds gehouden op eenzelfde hoogte, welke bepaald wordt door den stand van de platinapunt in capillair 35. Op een daarachter aangebrachte reep millimeterpapier 48 kan men dezen stand aflezen. Elke stand komt overeen met een bepaalde hoogte van de kwikzuil, dus met een bepaalde stroomsnelheid, welke vooraf door ijking voor een aantal punten werd bepaald. Aldus kan de snelheid van den kwikstroom van 0 tot 160 ccM. per uur naar wille-

keur worden geregeld, met niet meer dan ½ pCt. fout voor de gemiddelde snelheden.

De lucht, die aan het begin van een proef het vat 29 binnenkomt, heeft nog geen constante samenstelling; eerst nadat een bepaalde hoeveelheid lucht het circulatiesysteem is gepasseerd, heeft zich een evenwicht tusschen aanvoer, verbruik en afvoer van CO_2 ingesteld en is het CO_2-gehalte van de afvoerlucht constant geworden, die nu voor analyses kan worden gebruikt. Nu wordt de luchtstroom zonder onderbreking geleid naar een tweede vat 49, voorzien van eenzelfde inrichting en ingesteld op dezelfde stroomsnelheid. Daartoe worden de vlogende voorbereidingen getroffen. Het tandrad 39 wordt met een schroef (niet in de figuur geteekend) aan het statief vastgezet, zoodat het niet meer draaien kan, en van de as 40 losgemaakt. Het overeenkomstige tandrad aan de rechterzijde van de as 40 wordt nu op deze as vastgezet.

De kraan boven 49 wordt naar de toevoerbuis 27 geopend en het schakelaartje 51 naar rechts gezet.

Door nu gelijktijdig kraan 54 te openen en kraan 31 te sluiten, wordt de luchtstroom van vat 29 naar vat 49 overgeschakeld.

De lucht in het vat 29 kan nu naar buiten worden gedreven. Hiertoe wordt uit kraan 50 het afgevloeide kwik afgetapt en in vat 52 gegoten; vervolgens wordt kraan 28 naar links opengezet. Door het openen van kraan 53 kan men het vat 29 weder geheel met kwik vullen.

Daar het rechter gedeelte van de toevoerbuis 27 een schadelijke ruimte vormt, die nog niet met de te analyseeren lucht was doorgespoeld, verdient het aanbeveling, om den luchtstroom opnieuw naar het vat 29 over te schakelen.

De lucht, die nu wordt opgevangen, kan worden geanalyseerd en wordt daartoe met behulp van een kort caoutchouc slangetje in den gashouder (fig. 3, 38) overgebracht. Daarbij wordt de schadelijke ruimte weder zorgvuldig doorgespoeld.

Terwille van de eenvoudigheid zijn in fig. 4 verschillende bijzonderheden weggelaten. Zoo is de capillaire toevoerbuis 27 in werkelijkheid niet aan de vaten 29 en 49 vastgesmolten, doch daarmede glas op glas met caoutchouc buisjes verbonden. De

buizen 30 zijn elk vervangen door een viertal glazen buisjes, verbonden door korte dikwandige caoutchouc verbindingen. Een doorloopende caoutchouc buis van een dergelijke lengte heeft, zelfs indien zij uit vacuumslang bestaat, bij verandering van den kwikdruk een te wisselend volumen. In het ondereinde van de capilair 35 is een zeer nauw gedeelte aangebracht, zoodat het kwik er slechts langzaam in en uit kan loopen. Dit dient om bij voorkomende stooten of trillingen het schommelen van den kwikmeniscus in deze capillair zooveel mogelijk tegen te gaan.

De kwikstroomweerstanden 32 zijn eveneens met caoutchouc buisjes aan de kranen 31 en 54 vastgemaakt en kunnen daarvan gemakkelijk worden verwijderd om te worden schoongemaakt. Oorspronkelijk had ik deze weerstanden vervaardigd, door een glazen capillair op één plaats in de vlam zoolang te doen samenvallen, totdat slechts een haarfijne opening overbleef, waarbij door telkens probeeren tenslotte ongeveer de vereischte weerstand werd verkregen. In zulk een kort, zeer nauw gedeelte blijft echter, zelfs indien het kwik zorgvuldig is gereinigd, spoedig eenig vuil achter. Met de loupe ziet men in dit gedeelte dan minimale luchtbelletjes ontstaan. De stroomsnelheid van het kwik wordt hierdoor aanzienlijk vertraagd.

Daarom zijn deze kwikstroomweerstanden door nieuwe vervangen, waarvan een ± 15 c.M. lang gedeelte bestaat uit een capillair van ± 0.3 m.M. inwendige diameter. Het verdient aanbeveling in dit nauwe gedeelte geen bochten aan te brengen.

Deze weerstanden behoeven slechts af en toe te worden schoongemaakt. Dit geschiedt door het doorzuigen van een oplossing van kalumbichromaat in verdund zwavelzuur, goed schoonspoelen met gedestilleerd water en droogzuigen met lucht, waarbij geen spoor vocht in de capillair mag achterblijven.

Door bij verschillende hoogten van de kwikzuil de hoeveelheid kwik, in een bepaalden tijd uitgevloeid, in een buret te meten, werd voor beide weerstanden een ijkingskromme geconstrueerd. Zet men op de abscis de stroomsnelheid af en op de ordinaat de hoogte van de kwikzuil in 35, dan verloopt de kromme eenigszins convex naar de abscis.

Een kleine versnelling van den kwikstroom bij verhooging van de temperatuur werd gevonden (± 0.08 pCt. per 1° C.). Neemt men dit in aanmerking, dan kan men de nauwkeurigheid tot 0.1 pCt. opvoeren. Ik heb mij echter met een nauwkeurigheid van ½ pCt. voor de gemiddelde snelheid (± 100 ccM. per uur) tevreden gesteld. Deze snelheid kan tijdens de proeven gecontroleerd worden door het aantal kwikdruppels per minuut te tellen.

De in dit hoofdstuk beschreven apparatuur voldoet aan de gestelde eischen (zie pag. 28). In het assimilatievat kan de CO_2-concentratie worden gevarieerd door de toevoer van CO_2 in het circulatiesysteem te veranderen. Dit geschiedt 1° door wijziging van de samenstelling van de bufferoplossing in den generator, 2° door wijziging van de snelheid van den luchtstroom met den aspirator. Het verschil in CO_2-concentratie tusschen aan- en afvoerlucht kan zeer groot zijn, waardoor het verbruik op enkele pCt. nauwkeurig bepaald kan worden. Toch is, door de snelle circulatie, het concentratieverval van CO_2 in het assimilatievat tot een minimum beperkt, terwijl de CO_2-concentratie aldaar vrijwel gelijk is aan die van de afvoerlucht, welke wordt geanalyseerd.

De zuurgraad van de oplossing, waarop de wieren drijven, wordt door de verschillen in CO_2-concentratie slechts zeer weinig veranderd. Want door de aanwezigheid van KH_2PO_4 reageert deze oplossing bij totale afwezigheid van CO_2 reeds zwak zuur, terwijl door toevoeging van het zwak dissocieerende koolzuur de concentratie van de waterstofionen slechts weinig zal toenemen.

Het varieeren van de temperatuur geschiedt door het water van de thermostaat op hooger of lager temperatuur te brengen.

Voor het varieeren van de lichtintensiteit gebruikt men een grooter of kleiner aantal lampjes of wel de projectielamp. Hoe daarbij de lichtintensiteit is berekend, vindt men in het volgende hoofdstuk vermeld.

HOOFDSTUK V.

VOORPROEVEN, FOUTENBRONNEN, BEREKENINGEN EN CORRECTIES.

DE BUFFEROPLOSSINGEN.

In 4 L. leidingwater worden oplossingen gemaakt van $NaHCO_3$ en Na_2CO_3 in verschillende verhoudingen, te zamen steeds 0.5 grammol p. L.

Bijzondere voorzorgsmaatregelen voor de zuiverheid van de zouten e.d. zijn hierbij niet noodig, aangezien de CO_2-waarde van elk nieuwgemaakt mengsel door gasanalyses wordt bepaald als een gemiddelde uit minstens vijf dubbelbepalingen.

Deze mengsels worden bewaard in flesschen van 4 L. inhoud, met geparaffineerde kurken stop gesloten en van een hevelinrichting voorzien. Hoewel de CO_2-concentratie van de lucht, bij 30° met deze mengsels in evenwicht, steeds experimenteel werd bepaald, heb ik deze toch vooraf bij benadering berekend, met behulp van de twee dissociatieconstanten van koolzuur (resp. k_1 en k_2) en de absorptiecoëfficiënt van CO_2 in water (α).

Uit de vergelijkingen:

$$\frac{[H^+] \,.\, [HCO_3^-]}{[CO_2]} = k_1 \text{ en } \frac{[H^+] \,.\, [CO_3^{--}]}{[HCO_3^-]} = k_2.$$

waarin de uitdrukkingen tusschen vierkante haken het aantal grammol. p. L. beteekenen, volgt de waarde voor de CO_2-concentratie in de waterige oplossing:

$$[CO_2] = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{[HCO_3^-]^2}{[CO_3^{--}]}$$

en in de lucht, daarmede in evenwicht:

$$[CO_2] = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{[HCO_3^-]^2}{[CO_3^{--}]}.$$

Neemt men volgens Kolthoff (1923) $k_1 = 3 \times 10^{-7}$ en $k_2 = 6 \times 10^{-11}$ (voor 30° C. waarschijnlijk te laag), neemt men $\alpha = 0.66$ en stelt men de concentraties van HCO_3^- en CO_3^{--} gelijk aan die van $NaHCO_3$ en Na_2CO_3, dan vindt men bij benadering de waarde voor de CO_2-concentratie in de lucht in grammol. p. L., welke tot volumen-eenheden kan worden herleid.

Deze werd nu experimenteel door gasanalyses voor oplossingen met verschillende verhoudingen der beide zouten (te zamen 0.5 grammol. p. L.) vastgesteld. Hiertoe werd de CO_2-generator direct met den aspirator verbonden, de schadelijke ruimte met de te onderzoeken lucht doorgespoeld en het daarna opgevangen luchtmonster geanalyseerd.

Bij de snelheden van den luchtstroom, welke ik in mijn proeven toepaste (beneden 160 ccM. per uur) en een druppelsnelheid van de bufferoplossing van ± 1 druppel per 5 seconden, bleek de CO_2-concentratie in de doorgezogen lucht van deze beide snelheden onafhankelijk te zijn.

Voor vier van dergelijke oplossingen vindt men de CO_2-analyses vereenigd in tabel 3, waarin men de gevonden CO_2-concentraties, evenals in alle andere tabellen, in eenheden van 0.001 volumen pCt. vindt aangegeven.

Men ziet in deze tabel, dat een zeer constant CO_2-gehalte van de lucht kan worden bereikt en krijgt uit de dubbelbepalingen tevens een indruk van de nauwkeurigheid der CO_2-analyses.

De oplossingen konden maanden lang bewaard worden zonder van CO_2-waarde te veranderen.

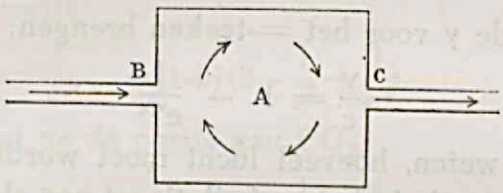
DE CO_2-CONCENTRATIE IN HET ASSIMILATIEVAT.

Wanneer zich in het circulatiesysteem CO_2-vrije lucht bevindt en men begint er lucht van een bepaald CO_2-gehalte door te zuigen, zal de CO_2-concentratie daarin eerst snel, dan langzaam toenemen en asymptotisch een eindwaarde naderen, welke met die van de instroomende lucht overeenkomt.

Zoowel een berekening als het experiment kunnen leeren, hoeveel lucht het circulatiesysteem passeeren moet, alvorens een ongeveer constante CO_2-concentratie wordt bereikt en de afwijkingen zoo gering zijn, dat ze kunnen worden verwaarloosd.

Berekening.

In fig. 10 wordt het geheele circulatiesysteem schematisch door het vat A voorgesteld. Bij B stroomt in het vat CO_2-houdende lucht, die onmiddellijk gemengd wordt. Aangenomen wordt, dat voor die menging geen tijd noodig is.



Figuur 10.

Bij C stroomt de gemengde lucht weer af. In den begintoestand is de CO_2-concentratie in het vat = 0. Ik noem nu:

x = volumen in- en uitgestroomde lucht;

c = concentratie CO_2 van de instroomende lucht;

a = volumen assimilatievat.

y = CO_2-concentratie *in* het assimilatievat.

De CO_2-concentratie y wordt *vermeerderd* door toevoer van CO_2 bij B en tegelijkertijd *verminderd* door afvoer van CO_2 bij C.

Komt dx lucht binnen, dan bevat deze cdx CO_2, die over volumen a verdeeld wordt. De stijging van de concentratie is dus

$$dy = \frac{c}{a}dx.$$

De uitstroomende lucht heeft een concentratie y; er wordt ydx CO_2 afgevoerd. De afname van de concentratie is daardoor

$$dy = -\frac{y}{a}dx.$$

De totale toename is dus:

$$dy = \frac{c}{a}dx - \frac{y}{a}dx = \frac{c-y}{a}dx.$$

Hieruit volgt:

$$dx = a\frac{dy}{c-y} = -a\frac{d(c-y)}{c-y}$$

Door integratie:

$$x = -a \ln (c-y) + k.$$

Om de waarde van de integratie-constante k te vinden, bedenke men, dat in den beginne x en y beide = 0 waren:

$$k = a \ln c$$

$$x = -a \ln (c-y) + a \ln c = a \ln \left(\frac{c}{c-y}\right)$$

Men kan nu de y voor het =-teeken brengen:

$$\frac{y}{c} = 1 - \frac{1}{e^{x/a}}$$

Wil men nu weten, hoeveel lucht moet worden doorgezogen, opdat de concentratie in het assimilatievat nog slechts 2 pCt. van die van de instroomende lucht afwijkt, dan stelt men:

$$\frac{y}{c} = \frac{98}{100} \text{ en vindt dan: } \frac{x}{a} = 3{,}91.$$

Dat wil zeggen, dat 3.91 $\times$ het volumen a moet zijn doorgezogen.

Wanneer in het assimilatievat een constant CO_2-verbruik plaats heeft, verandert er in principe niets. Men kan eenvoudig zeggen, dat de toevoer van CO_2 met een gedeelte b wordt verminderd.

De vermeerdering der concentratie wordt $\frac{c(1-b)}{a}dx$, de y nadert asymptotisch de eindwaarde c(1-b) i.p.v. c.

Men kan eenvoudig in de formule c door c(1-b) vervangen.

Ik ga nu de afgevoerde lucht opvangen, telkens in porties, 2a groot. Hoe zal de concentratie van CO_2 zijn in de 1e, 2e,enz. portie?

Hiertoe wordt als volgt de aan- en afvoer van CO_2 uit het assimilatievat berekend.

Aangevoerd cx;

verbruikt bcx;

in het vat aanwezig ay.

Afgevoerd dus cx - bcx - ay.

Voor de 1e portie is x = 2a. Bedenkt men, dat

$$y = c(1-b)\left(1-\frac{1}{e^{x/a}}\right),$$

dan bevat dus de 1e portie:

$$ac(1\text{-}b)\,(2 - 1 + \frac{1}{e^2}).$$

Voor x = 4a is in totaal aan CO_2 afgevoerd:

$$ac(1\text{-}b)\,(4 - 1 + \frac{1}{e^4}).$$

De tweede portie bevat deze hoeveelheid, verminderd met die van de eerste portie:

$$ac(1\text{-}b)\,(2 - \frac{1}{e^2} + \frac{1}{e^4}).$$

Evenzoo bevat de 3e portie aan CO_2:

$$ac(1\text{-}b)\,(2 - \frac{1}{e^4} + \frac{1}{e^6}).$$

Het volumen der porties is 2a; de concentraties krijgt men door de berekende hoeveelheden CO_2 door 2a te deelen:

$$\text{1e portie: } c(1\text{-}b)\frac{2 - 1 + \frac{1}{e^2}}{2} = c(1\text{-}b) \cdot 0{,}568.$$

$$\text{2e portie: } c(1\text{-}b)\frac{2 - \frac{1}{e^2} + \frac{1}{e^4}}{2} = c(1\text{-}b) \cdot 0{,}941.$$

$$\text{3e portie: } c(1\text{-}b)\frac{2 - \frac{1}{e^4} + \frac{1}{e^6}}{2} = c(1\text{-}b) \cdot 0{,}992.$$

De afwijkingen van de eindwaarde c(1-b) bedragen bij de 1e portie 43.2 pCt., bij de 2e 5.9 pCt., bij de 3e nog slechts 0.8 pCt.

Nadat een hoeveelheid lucht, groot 4 × het volumen van het circulatiesysteem, is gepasseerd, kan, volgens de berekening, de daarna opgevangen lucht veilig voor analyses worden gebruikt.

Hoe kleiner dus de inhoud van het circulatiesysteem, hoe beter. Om deze reden is bij de constructie van het assimilatievat en het circulatiepompje naar een minimum inhoud gestreefd.

De berekening werd nu door proeven gecontroleerd. Daartoe was het noodig, den inhoud van het circulatiesysteem te kennen. Dit werd gemeten, door de aanvoerbuis af te sluiten en door de afvoerbuis heen de lucht in het systeem onder verhoogden druk te brengen door middel van een waterzuil. De hoogte van de

waterzuil, benevens de volumenafname van de lucht door de samenpersing werden gemeten en hieruit de inhoud van het circulatiesysteem berekend. Deze bedraagt ± 17 ccM.

Bij de controleproeven werden nu porties lucht van telkens 35 ccM. opgevangen en op CO_2 geanalyseerd. De uitkomsten en de afwijkingen van de theoretische eindwaarde, die de CO_2-concentratie bereiken moet, vindt men in de volgende tabel, naast de berekende afwijkingen, op geheele percenten van de CO_2-concentratie afgerond.

TABEL 4.

		afwijking in %		afwijking in %	berekende afwijking in %
CO_2 in 0,001 % van de instroomende lucht	203		460		
idem 1e 35 ccM van de uitstroomende lucht	120	41	246	47	43
„ 2e 35 ccM „ „ „ „	188	7	409	11	6
„ 3e 35 ccM „ „ „ „	199	2	446	3	1

Er blijkt hieruit een goede overeenkomst met de berekening. Bij voortzetting van de proef zou men moeten verwachten, dat de CO_2-concentratie van de uitstroomende lucht geheel gelijk zou worden aan die van de instroomende lucht. Dit is echter niet het geval wegens de geringe CO_2-lekkage, welke het circulatiesysteem vertoont, vooral door den caoutchoucring, welke het assimilatievat afsluit.

Bij een CO_2-concentratie van 450 × 0.001 pCt. (ik zal voortaan altijd de concentraties van CO_2 in 0.001 pCt. uitdrukken) vond ik een gemiddeld lek van 10 cmM. CO_2 per uur.

Aannemende, dat de lekkage evenredig is aan de CO_2-concentratie, kan men de lekkage voor elke concentratie berekenen, bijvoorbeeld voor een concentratie 200 4.4 cmM. per uur. Ik vond experimenteel 5 cmM. per uur.

BEREKENING VAN DE ASSIMILATIE.

Onder assimilatie wordt verstaan het CO_2-verbruik bij belichting, vermeerderd met de CO_2-afscheiding in het donker (respiratie).

CO_2-verbruik of -afscheiding worden berekend uit het verschil tusschen de hoeveelheid CO_2, welke het assimilatievat binnenkomt en die, welke het verlaat, in cmM. per uur.

In de tabellen wordt in de kolommen CO_2i en CO_2u aangegeven de CO_2-concentratie in de instroomende, resp. uitstroomende lucht in 0.001 pCt., d.w.z. *het aantal cmM. CO_2 per 100 ccM.* Wanneer de snelheid van de luchtstroom juist 100 ccM. per uur bedraagt, geven deze kolommen dus tevens het aantal cmM. CO_2 aan, dat per uur wordt aan- en afgevoerd.

Is de snelheid van den luchtstroom grooter of kleiner, dan is de aan- en afvoer van CO_2 naar evenredigheid grooter of kleiner; is deze snelheid bijv. 0.6 $\times$ 100 ccM. = 60 ccM. per uur, dan wordt de aan- en afvoer berekend door het in de kolommen CO_2i en CO_2u aangegeven getal met 0.6 te vermenigvuldigen.

Maakt men voor het assimilatievat een CO_2-balans op, dan krijgt men de vergelijking:

Assimilatie = aanvoer + respiratie — lek — afvoer.

Gewoonlijk nam ik aan het begin van elke proevenserie een donkerproef met CO_2-vrije aanvoerlucht, waarbij de respiratie werd bepaald. In sommige gevallen gebruikte ik hierbij CO_2-houdende aanvoerlucht met hetzelfde CO_2-gehalte, als in de rest van de serie werd gebruikt. Ik bepaalde dan experimenteel:

Aanvoer + respiratie — lek.

CORRECTIES.

1o. *Correctie voor de CO_2-lekken.*

Volgens pag. 160 gaat voor elk pCt. CO_2, dat in het assimilatievat circuleert, per uur 22 cmM. CO_2 door lekken verloren; deze hoeveelheid moet opgeteld worden bij de hoeveelheid CO_2, die met de lucht wordt afgevoerd, om de totale hoeveelheid CO_2, die het assimilatievat verlaat, aan te geven.

In proeven, waarin de CO_2-concentratie niet veel meer dan 100 $\times$ 0.001 pCt. bedraagt, is deze correctie verwaarloosd, daar zij dan binnen de proeffouten valt.

2o. *Correctie voor den groei.*

De wieren groeien tijdens de proefnemingen, hoewel zeer lang-

zaam. Daar een proevenserie dikwijls lang duurt (12 uur en meer) werd het raadzaam geacht ook deze foutenbron niet te verwaarloozen.

Daar het niet mogelijk was, de celdraden aan het begin en het einde van de proeven te meten of te wegen, werd de groeisnelheid op andere wijze vastgesteld. Ik bepaalde daartoe aan het begin en het einde van verschillende proevenseries de assimilatie onder dezelfde condities, d.w.z. dezelfde temperatuur en lichtintensiteit en overmaat CO_2. De vermeerdering van de assimilatiesnelheid was een maat voor de vermeerdering van het assimileerend celmateriaal gedurende dien tijd, waaruit de groei per uur kon worden berekend.

Daar vele proeven toch al lang duurden, is niet bij elke proevenserie deze groei bepaald, doch slechts voor een aantal gevallen en het gemiddelde van de aldus bepaalde groeisnelheden als correctie voor de overige proeven gebruikt. Aangenomen is hierbij, dat de vermeerdering door groei een lineair verloop heeft.

In de tabellen is het uur, waarop de eerste assimilatiebepaling plaats vond, als 0-punt van tijd aangenomen; de volgende bepalingen zijn door aftrek van het berekende groei-percentage op de „0-uur-waarde" herleid.

De groeibepalingen zijn in tabel 5 vereenigd. Bij 20° bedroeg de groei gemiddeld 1.04 pCt. per uur, bij 12° 0.42 pCt. Een aanzienlijk verschil is te zien tusschen de verschillende bepalingen; blijkbaar had ik dezen factor nog niet geheel in de hand. Daar het echter om kleine correcties gaat, is dit niet zulk een groot bezwaar.

Bij de proeven, waarbij de groei niet werd gecontroleerd, zijn de volgende correcties in rekening gebracht:

Voor 12° C.: 0.4 pCt. per uur.
„ 16° C.: 0.7 pCt. „ „
„ 20° C.: 1.0 pCt. „ „
„ 24° C.: 1.3 pCt. „ „

3o. *Correctie voor het CO_2-verval in het assimilatievat.*

Deze correctie betreft niet de assimilatie zelf, doch de CO_2-concentratie, waarbij de assimilatie plaats vindt.

Hoewel de snelheid, waarmede de lucht door het assimilatievat circuleert (± 5 L. per uur) zeer groot is in vergelijking met de snelheid van aan- en afvoerstroom (40—160 ccM. per uur), is er toch steeds bij CO_2-verbruik in het assimilatievat een klein verval van CO_2-concentratie. Dit wordt als volgt berekend.

Door het assimilatievat stroomt 5 L. lucht per uur. In dit uur wordt verbruikt a cmM. CO_2. De lucht bevat dan, nadat zij het assimilatievat is gepasseerd, per 5 L. a cmM. CO_2 minder dan daarvoor, dat is $\frac{a}{50} \times 0.001$ pCt.

De lucht, die juist het assimilatievat verlaten heeft, wordt in de proeven voor analyses gebruikt. Het verschil van de CO_2-concentratie daarin met de *gemiddelde* CO_2-concentratie in het assimilatievat, bedraagt de helft van het bovengenoemde bedrag, dus $\frac{a}{100} \times 0.001$ pCt. *)

Alleen bij de proeven over den invloed van de CO_2-concentratie werd deze correctie in rekening gebracht.

DE EENHEID VAN DE HOEVEELHEID CELMATERIAAL.

Om vergelijkbare waarden te krijgen voor de assimilatie onder verschillende omstandigheden, moeten de gevonden waarden herleid worden tot een bepaalde hoeveelheid celmateriaal. Vaak neemt men hiervoor 1 gr. drooggewicht. De hoeveelheden, in mijn proeven gebruikt, waren echter te gering, om met voldoende nauwkeurigheid te wegen. Ik heb dus een andere eenheid gekozen, en wel die hoeveelheid, die onder bepaalde, gedefinieerde omstandigheden 100 cmM. CO_2 per uur assimileert.

Deze omstandigheden zijn: overmaat CO_2, belichting met 6 lampjes (lichtintensiteit 6,18) en temperatuur 20° C. Onder deze omstandigheden is de temperatuur beperkende factor. In dit punt vallen dus alle krommen samen (zie fig. 12).

De bedoelde hoeveelheid celmateriaal bevat 40 à 50 M. celdraad en weegt, aan de lucht gedroogd, ± 1 m.gr.

---

*) Hierbij is een lineair verval van CO_2-concentratie in het assimilatievat aangenomen. Hoewel dit niet altijd het geval zal zijn, vallen de fouten, hierdoor ontstaan, zeker binnen de proeffouten.

Na het in rekening brengen van de verschillende correcties, zijn dus de gevonden assimilatiewaarden tot die van deze hoeveelheid herleid door vermenigvuldiging met een voor elke proevenserie verschillenden factor, dien ik *herleidingsfactor* heb genoemd; de aldus herleide waarden zijn in de tabellen in de laatste kolom aangegeven. Hierin is de waarde, die gediend heeft tot de berekening van den herleidingsfactor, cursief gedrukt.

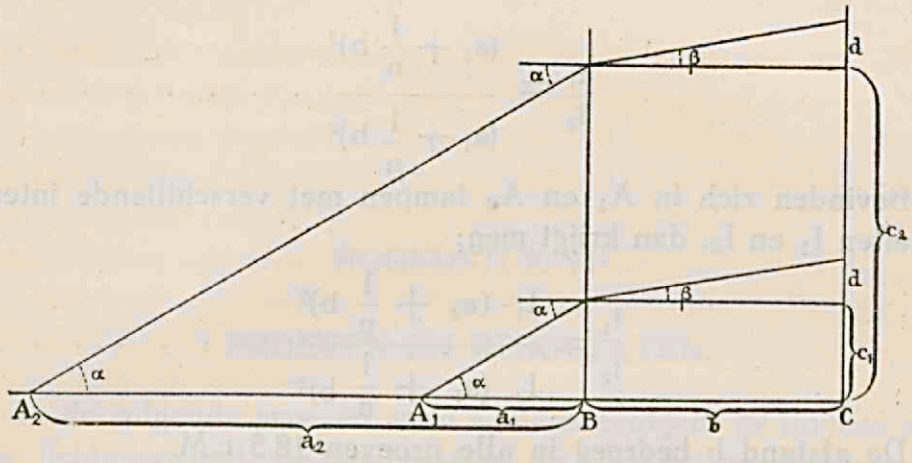
BEREKENING VAN DE LICHTINTENSITEIT.

Het was voor mij niet noodzakelijk de absolute lichtsterkte van de lampen te weten, maar wel de verhouding van de intensiteiten onderling.

De meting van het aantal meterkaarsen met een visueele methode is hiervoor niet geschikt. Want bij verschil van energieverdeeling in het spectrum van de lampen, kunnen twee intensiteiten, die voor het oog gelijk zijn, voor de assimilatie een verschillende waarde hebben.

Een bolometrische bepaling van de totale stralingsenergie is om dezelfde reden ongeschikt. De eenige juiste methode is, de wieren zelf als photometer te gebruiken. Bij de lage lichtintensiteit van één lampje is het licht beperkende factor (zie volgende hoofdstuk) en de assimilatie recht evenredig met de lichtintensteit. De intensiteit van één van de lampjes (n.l. lampje A) werd daarbij willekeurig = 1 gesteld en de intensiteit van de andere lampjes en ook die van de projectielamp in deze eenheid uitgedrukt.

De afstand van den gloeidraad van de lampjes tot den glazen wand van de thermostaat was in alle proeven gelijk, n.l. 3 cM. Bij alle proeven, waarin het licht beperkende factor was, bevonden de wieren zich steeds in het middelste $^1/_3$ gedeelte van het assimilatievat. Hoewel de afstand van de verschillende lampjes tot de wieren niet volkomen dezelfde was, bleef deze voor elk lampje in alle proeven gelijk. De afstand van het gloeilichaam van de projectielamp tot den glazen wand van de thermostaat bedroeg in de hier vermelde proef 75 cM., in de overige proeven 12 cM. Hoe de lichtintensiteit in het assimilatievat van dezen afstand afhangt, leert de volgende berekening (zie fig. 11).



Figuur 11.

Wanneer de glazen wand van de thermostaat zich bij B bevindt en het assimilatievat bij C, zal het licht van een lamp, die zich in A_1 bevindt, door de lucht den weg a_1 en door het water (via den spiegel) den weg b afleggen. De dikte van de beide glazen wanden wordt hierbij verwaarloosd. Een lichtbundel, die onder een hoek α uit de lamp treedt, heeft in het assimilatievat een doorsnede $c_1 + d$.

Wanneer de lamp verplaatst wordt naar A_2, dan heeft dezelfde lichtbundel in het assimilatievat een doorsnede $c_2 + d$. De intensiteiten van het licht aldaar in deze twee gevallen (i_1 en i_2) zijn omgekeerd evenredig met de tweede macht van deze doorsnede:

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{(c_2 + d)^2}{(c_1 + d)^2}.$$

Nu is $c_1 = a_1 \operatorname{tg} \alpha$ en $c_2 = a_2 \operatorname{tg} \alpha$

$$d = b \operatorname{tg} \beta.$$

Hieruit volgt:

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{\left(a_2 + \frac{\operatorname{tg}\beta}{\operatorname{tg}\alpha} b\right)^2}{\left(a_1 + \frac{\operatorname{tg}\beta}{\operatorname{tg}\alpha} b\right)^2}.$$

Bij kleine invalshoeken is $\frac{\operatorname{tg} \beta}{\operatorname{tg} \alpha}$ bij benadering gelijk aan $\frac{\sin \beta}{\sin \alpha}$, of de omgekeerde waarde van de brekingsindex n van water ($n = 1.33$).

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{(a_2 + \frac{1}{n} b)^2}{(a_1 + \frac{1}{n} b)^2} \quad \ldots\ldots\ldots \quad 1)$$

Bevinden zich in A_1 en A_2 lampen met verschillende intensiteiten I_1 en I_2, dan krijgt men:

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{I_1 \ (a_2 + \frac{1}{n} b)^2}{I_2 \ (a_1 + \frac{1}{n} b)^2} \quad \ldots\ldots\ldots \quad 2)$$

De afstand b bedroeg in alle proeven 18.5 c.M.

Worden nu $\frac{i_1}{i_2}$ in een assimilatieproef bepaald, dan kan men de verhouding van de lichtsterkte van de beide lampen $\frac{I_1}{I_2}$ berekenen.

De proevenserie, waarmede aldus de lichtintensiteiten voor alle lampen afzonderlijk werd gemeten, vindt men vermeld in tabel 6.

Hieruit berekende ik voor de projectielamp een lichtsterkte van 31.0 × die van lampje A.

In de volgende proeven bedroeg de afstand a voor de projectielamp 12 cM., waaruit volgens formule 1) een intensiteit van 13.2 in het assimilatievat werd berekend.

VERDERE FOUTENBRONNEN.

Als foutenbron moet nog genoemd worden het uitdrogen van de wieren. Hoewel in de circulatiestroom van de lucht een waschfleschje met water is ingeschakeld, komt het soms voor, dat het vloeistofvliesje, waarop de wieren zich bevinden, voor een gedeelte opdroogt. Ik vond in zulke gevallen een aanmerkelijke daling van het assimilatievermogen; de proeven waren dan waardeloos.

Er bevindt zich in de cultures een geringe hoeveelheid bacteriën; deze hoeveelheid zal niet steeds dezelfde zijn. Daaraan schrijf ik het toe, dat de gevonden waarden voor de respiratie naar verhouding niet steeds gelijk zijn. Daar de respiratie steeds vooraf wordt bepaald, meen ik dat de aanwezigheid van bacteriën geen foutenbron oplevert.

HOOFDSTUK VI.

PROEVEN EN RESULTATEN.

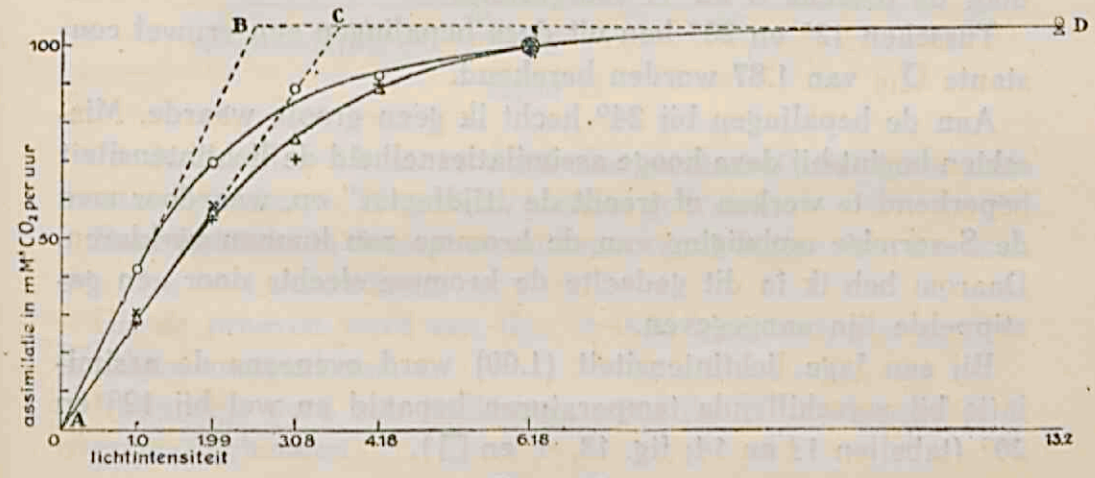
In de volgende proeven werd achtereenvolgens de invloed van de lichtintensiteit, de temperatuur en de CO_2-concentratie op de assimilatiesnelheid vastgesteld, waardoor een aantal correspondeerende krommen werd verkregen.

DE INVLOED VAN DE LICHTINTENSITEIT.

Door achtereenvolgens te belichten met 1, 2, 3, 4 of 6 lampjes of wel met de projectielamp, werd de lichtintensiteit gevarieerd. De temperatuur bedroeg in deze proeven 20° C.; de CO_2-concentratie werd in overmaat gehouden, d.w.z. zoo hoog, dat zij geen invloed had op de assimilatiesnelheid.

Uit een aantal voorproeven was gebleken, dat dit het geval was boven een concentratie van 40 × 0.001 pCt.

De resultaten vindt men graphisch voorgesteld in fig. 12, waarin op de abscis de lichtintensiteit, op de ordinaat de assimilatiesnelheid is afgezet.



Figuur 12.

De teekens + △ en × geven drie proevenseries weer met wieren op versche voedingsoplossing (resp. tabellen 7, 8 en 9); de teekens O (tabel 10) een proevenserie met wieren op een oude, uitgeputte voedingsoplossing. Hieruit blijkt, dat de wieren onder constante omstandigheden moeten worden gekweekt, om vergelijkbare resultaten te verkrijgen. Daarvoor werd dan ook gezorgd en steeds met versche voedingsoplossingen gewerkt.

Men ziet, dat bij de lichtintensiteit 6.18 de maximale assimilatie bij 20° reeds bijna bereikt is; een ruim tweemaal zoo groote lichtintensiteit kan nog slechts 5 pCt. verhooging van de assimilatiesnelheid teweeg brengen; practisch is de temperatuur hier dus beperkende factor.

Uit de figuur is tevens te zien, dat in normale gevallen de assimilatiesnelheid tot een lichtintensiteit van 1.99 daarmede recht evenredig is (de kromme is tot hiertoe een rechte lijn); bij die intensiteit is het licht dus nog beperkende factor.

De zeer goede overeenstemming tusschen de bepalingen uit drie verschillende proevenseries pleit voor de eenvormigheid van het celmateriaal, wat mij het recht geeft de assimilatie als maat te gebruiken voor de hoeveelheid cellen.

DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR.

De assimilatie werd bepaald bij een hooge lichtintensiteit (6.18), achtereenvolgens bij 12°, 16°, 20° en 24°.

Het resultaat van de proeven (tabel 11 en 12) wordt in fig. 13 door de teekens O en △ voorgesteld.

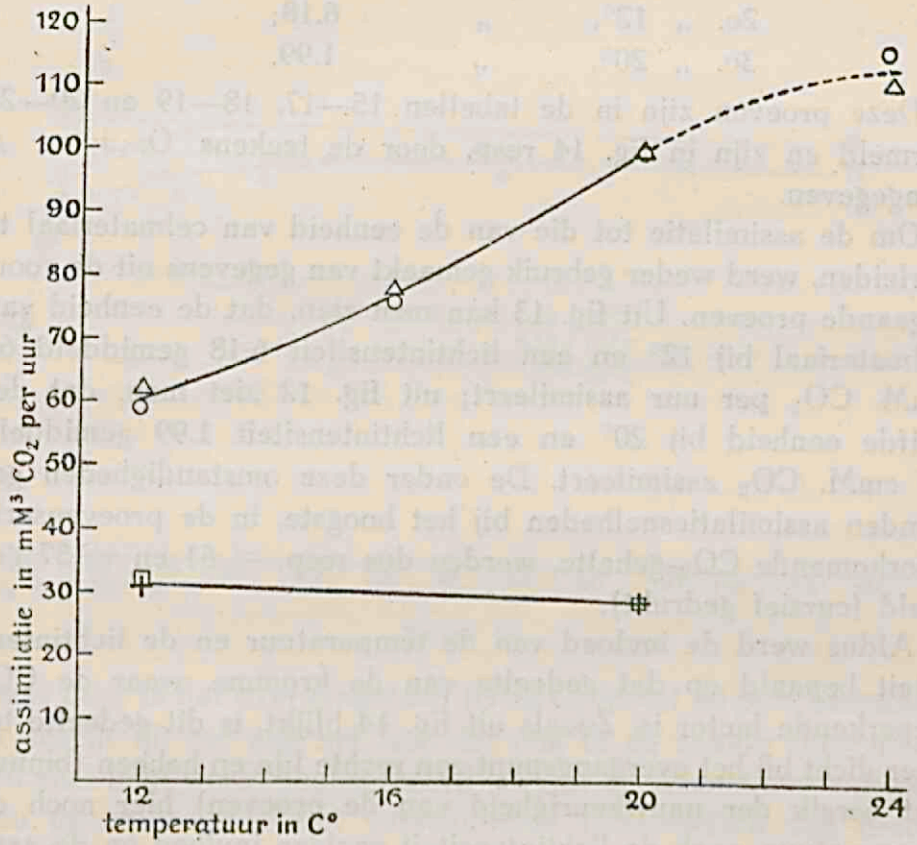
Tusschen 12° en 20° kan uit deze bepalingen een vrijwel constante Q_{10} van 1.87 worden berekend.

Aan de bepalingen bij 24° hecht ik geen groote waarde. Misschien begint bij deze hooge assimilatiesnelheid de lichtintensiteit beperkend te werken of treedt de „tijdfactor" op, waardoor men de S-vormige ombuiging van de kromme zou kunnen verklaren. Daarom heb ik in dit gedeelte de kromme slechts door een gestippelde lijn aangegeven.

Bij een lage lichtintensiteit (1.00) werd eveneens de assimilatie bij verschillende temperaturen bepaald en wel bij 12° en 20° (tabellen 13 en 14; fig. 13, + en □).

Om hierbij de assimilatiewaarde voor de eenheid van celmateriaal te vinden, werd gebruik gemaakt van de proeven, sub a vermeld (zie fig. 12).

Uit die proeven blijkt n.l., dat de eenheid van celmateriaal bij 20° en een lichtintensiteit 1.00 29 cmM. CO_2 per uur assimileert.



Figuur 13.

In de tabellen 13 en 14 werd dus de assimilatie onder deze omstandigheden = 29 gesteld (cursief gedrukt).

Daar het licht in deze proeven beperkende factor was, zou men een $Q_{10} = 1$ verwachten.

Uit de proeven werd een $Q_{10} = 0.90$ berekend, dus een behoorlijke overeenkomst.

Natuurlijk werd ook in deze proeven de CO_2-concentratie in overmaat gehouden.

DE INVLOED VAN DE CO_2-CONCENTRATIE.

Deze proeven werden begonnen met een overmaat van CO_2, dan werd de CO_2-concentratie verlaagd tot deze beperkend werd en de afhankelijkheid van de assimilatie daarvan bepaald, en wel onder drie verschillende omstandigheden, t.w.:

1o. bij 20°, lichtintensiteit 6.18;
2o. „ 12°, „ 6.18;
3o. „ 20°, „ 1.99.

Deze proeven zijn in de tabellen 15—17, 18—19 en 20—23 vermeld en zijn in fig. 14 resp. door de teekens O, + en △ aangegeven.

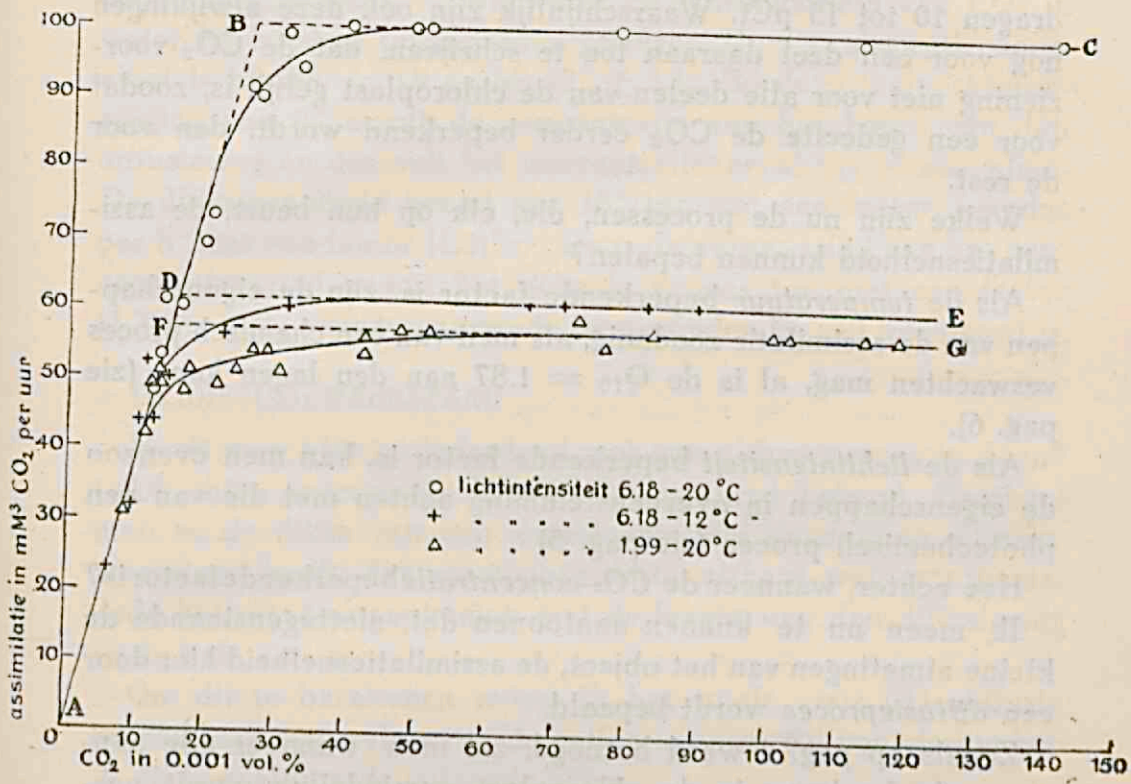
Om de assimilatie tot die van de eenheid van celmateriaal te herleiden, werd weder gebruik gemaakt van gegevens uit de voorafgaande proeven. Uit fig. 13 kan men zien, dat de eenheid van celmateriaal bij 12° en een lichtintensiteit 6.18 gemiddeld 61 cmM. CO_2 per uur assimileert; uit fig. 12 ziet men, dat dezelfde eenheid bij 20° en een lichtintensiteit 1.99 gemiddeld 57 cmM. CO_2 assimileert. De onder deze omstandigheden gevonden assimilatiesnelheden bij het hoogste, in de proevenserie voorkomende CO_2-gehalte, werden dus resp. = 61 en = 57 gesteld (cursief gedrukt).

Aldus werd de invloed van de temperatuur en de lichtintensiteit bepaald op dat gedeelte van de kromme, waar de CO_2 beperkende factor is. Zooals uit fig. 14 blijkt, is dit gedeelte tot zeer dicht bij het overgangspunt een rechte lijn en hebben (binnen het bereik der nauwkeurigheid van de proeven) hier noch de temperatuur, noch de lichtintensiteit eenigen invloed op de assimilatiesnelheid; immers hier (op de lijn AF) vallen de krommen voor hooge en lage temperatuur, zoowel als voor hooge en lage lichtintensiteit geheel samen.

CONCLUSIES UIT DE RESULTATEN.

Beziet men de gevonden resultaten in verband met wat in het eerste en tweede hoofdstuk werd gezegd, dan blijkt in de eerste plaats, dat B l a c k m a n's formuleering het gedrag van de assimilatie voor de afzonderlijke cel vrij juist weergeeft. In de figuren

12 en 14 zijn de „ideale B l a c k m a n-krommen" door stippellijnen aangegeven; de grootste afwijking is te vinden in fig. 12,



Figuur 14.

waar deze in het overgangspunt (B en C) 25 tot 30 pCt. bedraagt. Ik schrijf dit toe aan het feit, dat ook in de enkele chloroplast vrij veel licht wordt geabsorbeerd en dus de verschillende deelen van de chloroplast aan verschillende intensiteiten zijn blootgesteld, zoodat niet voor alle deelen gelijktijdig het licht beperkend wordt. Vooral het voor de assimilatie meest werkzame roode licht wordt sterk geabsorbeerd.

Het bezwaar, dat voor bladen in zoo sterke mate geldt, is blijkbaar zelfs bij een laag van één cel dik nog niet geheel overwonnen. Toch komt deze kromme vrij veel beter met B l a c k m a n's schema overeen, dan de kromme, die W a r b u r g (1919, fig. 11) geeft voor Chlorella. Ik vermoed daarom, dat in W a r b u r g's proeven nog een gedeelte van de wieren door de andere werd beschaduwd (zie pag. 20).

De krommen in fig. 14 geven een bijna ideaal Blackmanschema. De afwijkingen in de overgangspunten B, D en F bedragen 10 tot 15 pCt. Waarschijnlijk zijn ook deze afwijkingen nog voor een deel daaraan toe te schrijven, dat de CO_2-voorziening niet voor alle deelen van de chloroplast gelijk is, zoodat voor een gedeelte de CO_2 eerder beperkend wordt, dan voor de rest.

Welke zijn nu de processen, die, elk op hun beurt, de assimilatiesnelheid kunnen bepalen?

Als de *temperatuur* beperkende factor is, zijn de eigenschappen van de assimilatie zoodanig, als men van een chemisch proces verwachten mag, al is de $Q_{10} = 1.87$ aan den lagen kant (zie pag. 6).

Als de *lichtintensiteit* beperkende factor is, kan men evenzoo de eigenschappen in overeenstemming achten met die van een photochemisch proces (zie pag. 5).

Hoe echter, wanneer de *CO_2-concentratie* beperkende factor is?

Ik meen nu te kunnen aantoonen dat, niettegenstaande de kleine afmetingen van het object, de assimilatiesnelheid hier door een *diffusieproces* wordt bepaald.

Zooals op pag. 4 werd betoogd, zal men, wanneer alle aangevoerde koolzuur in de chloroplast onmiddellijk wordt verbruikt en de CO_2-druk aldaar practisch $= 0$ is, een rechte evenredigheid met de CO_2-concentratie van het milieu moeten verwachten.

Zulk een rechtlijnige afhankelijkheid vertoont inderdaad de lijn A F D B in fig. 14.

In dit deel van de kromme heeft volgens mijn proeven het licht geen invloed, zooals voor een diffusieproces begrijpelijk is.

Echter zou men geneigd zijn een invloed van de temperatuur te verwachten, daar voor diffusieprocessen een Q_{10} van 1.2 tot 1.3 wordt aangegeven.

Bij nader inzien is deze overweging echter niet juist. De celwand en het protoplasma, waardoor de CO_2 moet diffundeeren, kunnen we een oogenblik beschouwen als een waterig milieu. Om in de cel door te dringen, moet de CO_2 beginnen met in het buitenste laagje van den celwand op te lossen.

Men mag aannemen, dat in het allerbuitenste laagje van den celwand de CO_2-concentratie in evenwicht is met die van de aangrenzende lucht. *) Nu wordt de oplosbaarheid van CO_2 in water bij hoogere temperatuur *geringer*. De z.g. absorptiecoëfficiënt is bij 20° ± 0.9 en bij 12° ± 1.1. Bij deze temperatuursstijging van 8° wordt de concentratie aan het begin van den diffusieweg en dus ook het concentratieverval $^9/_{11}$ × zoo klein. De diffusiesnelheid neemt per 10° toe met een factor 1.3, dus per 8° met een factor $(1.3)^{8/10}$. Door de verandering van het concentratieverval neemt het geheele proces toe met een factor $(1.3)^{8/10} \times {}^9/_{11} = \pm 1$, waarmede de gevonden $Q_{10}=1$ verklaard is.

DE DIFFUSIEWEERSTAND.

Heeft men hier nu inderdaad met een diffusieproces te doen? Uit mijn proeven is de diffusieweerstand bekend. Berekent men nu de dikte van een waterlaagje, dat denzelfden diffusieweerstand heeft, dan moet deze dikte, althans wat grootheidsorde betreft, overeenkomen met de lengte van den diffusieweg in de cel.

Om dit te berekenen moest ik het totale voor CO_2-diffusie beschikbare oppervlak van de cellen kennen. Bij benadering heb ik dit bepaald op de volgende wijze.

De gezamenlijke hoeveelheid cellen, waarmede een assimilatieproef is gedaan, worden gespoeld in een kolfje met warme 10 pCt. gelatineoplossing, die daarna tot 100 gr. wordt bijgevuld. Deze oplossing wordt flink omgeroerd, zoodat een zeer gelijkmatige verdeeling van de wieren plaats vindt. De celdraden breken daarbij in kleine stukjes.

Nu worden eenige ccM. hiervan uitgegoten in een glazen schaaltje, waar de oplossing spoedig gelatineert. Een klein blokje wordt er uitgesneden en op een objectglaasje zorgvuldig tot op 0.1 m.gr. gewogen. Daarna wordt er een dekglaasje opgelegd,

*) Romell (1926 b) is van meening, dat dit niet juist is en dat het grensvlak de zetel is van een diffusieweerstand. Hij brengt hier, zij het ook onder voorbehoud, de door Bohr experimenteel bepaalde z.g. invasiecoëfficiënten in rekening. Aangezien Krogh (1919) heeft aangetoond, dat hetgeen men als invasiecoëfficiënt meent te bepalen, steeds berust op den diffusieweerstand van een zeer dun vloeistoflaagje, heeft het geen zin daarmede nog rekening te houden.

waaronder, na voorzichtig verwarmen, de gelatine zich tot een dun laagje uitspreidt.

Onder het microscoop wordt dit laagje met de kruistafel systematisch afgezocht en met behulp van een teekenspiegel elk celdraadje op een vel papier overgetrokken. Tevens wordt met een objectief-micrometer de aldus bereikte vergrooting vastgesteld.

De totale lengte van de op het papier getrokken lijntjes wordt met een curvimeter gemeten en die van de celdraadjes, in het blokje gelatine aanwezig, berekend. Aangenomen, dat de verdeeling in de gelatine volkomen regelmatig is, kan hieruit het gezamenlijke aantal meters celdraden, in de proef aanwezig, worden berekend.

Daar het van belang is, deze lengte voor de eenheid van celmateriaal te weten, wordt het gevonden aantal meters vermenigvuldigd met een herleidingsfactor, aan de laatste assimilatiebepaling van de proef ontleend. Men vindt zoo het aantal M. celdraad, dat bij overmaat CO_2, lichtintensiteit 6.18 en 20° C. 100 cmM. CO_2 per uur assimileert.

De gegevens uit twee dubbelbepalingen vindt men in onderstaande tabel.

TABEL 24.

No.	Assimatie-proef in Tabel.	Gewogen gelatine.	Gemeten lengte.	Totale lengte.	Herleidings-factor.	Lengte v. d. eenheid van celmateriaal.
1a	19	18,8 mgr.	21,2 mM.	112,9 M.	$\frac{61}{165}$	41.7 M.
b		15,8 „	14,6 „	92,5 „		34,2 „
2a	14	26,6 „	45,2 „	170,4 „	$\frac{29}{83}$	59,4 „
b		28,6 „	39,1 „	136,6 „		47,6 „
					Gemiddeld	45,7 M.

Neemt men aan, dat de cylindervormige celdraden tot halverwege uitsteken boven het vloeistoflaagje, waarop ze drijven, dan komt men tot een voor de CO_2-diffusie beschikbaar oppervlak van 6 qcM.

In de formule voor de diffusiesnelheid:

$$S = \frac{k\ q}{l}(C_1 - C_2)$$

zijn nu alle benoodigde grootheden bekend.

Voor het gemak voer ik de berekening uit voor een temperatuur van 15°, daar de absorptiecoëfficiënt van CO_2 in water dan juist 1 bedraagt; het aan de lucht rakende grenslaagje water heeft dan dezelde CO_2-concentratie als de lucht (C_1).

S is de hoeveelheid CO_2, welke per dag diffundeert, in willekeurige eenheden (ik neem hiervoor eenheden van 1 cmM.).

C_1—C_2 is het verschil in concentratie aan het begin en het eind van den diffusieweg, in dezelfde eenheden per ccM. uitgedrukt.

$C_2 = 0$ volgens onze voorstelling.

De grootheden S en C_1 zijn nu in fig. 14 te vinden; immers de lijn A B geldt voor alle temperaturen, dus ook voor 15°. Men ziet, dat bij een CO_2-concentratie van 10 × 0,001 pCt. ($C_1 = 0.1$) de diffusiesnelheid 40 cmM. per uur bedraagt ($S = 960$).

Vult men nu de waarden in voor de diffusieconstante van CO_2 in water bij 15° ($k = 1.4$ qcM./dag) en voor de doorsnede van den diffusieweg ($q=6$ qcM.), dan vindt men voor de dikte van het waterlaagje 8 μ.

Nu zijn de cellen, zooals gezegd, ± 8 μ dik; de dikte van de chloroplasten kan op sommige plaatsen reeds 4 μ bedragen. Daar hoogstwaarschijnlijk de CO_2 in celwand en protoplasma langzamer diffundeert dan in water, kan de overeenstemming, wat grootheidsorde betreft, bevredigend worden genoemd.

De hypothese, dat men hier met een diffusieproces heeft te doen, welke nu aan vier verschillende criteria (invloed van CO_2-concentratie, lichtintensiteit, temperatuur een grootheidsorde van diffusieweerstand) is getoetst, acht ik hiermede bewezen.

Warburg's meening, dat bij Chlorella de diffusie geen belemmering kan opleveren, houd ik voor onjuist, temeer, daar in Warburg's proeven de CO_2-beperking ongeveer bij dezelfde concentratie begint op te treden, als in de mijne. Wel vindt

Warburg bij CO_2-beperking een zeer hooge temperatuurcoëfficiënt ($Q_{10} \pm 5$); hij geeft hiervan echter slechts één bepaling (1919, l.c. tabel IV no. 1). Misschien heeft de schadelijke invloed van het alcalische buffermengsel hem parten gespeeld.

Ik heb berekend, dat de diffusiesnelheid recht evenredig is met de CO_2-concentratie buiten de cel, zoolang deze in de chloroplast 0 is. Omgekeerd kan men, aangenomen dat men met een diffusieproces te doen heeft, zeggen dat, zoolang rechtlijnige afhankelijkheid bestaat, de concentratie in de chloroplast practisch 0 is en zoodra de rechtlijnigheid ophoudt, de concentratie daarbinnen boven 0 begint te stijgen.

Nu ziet men uit fig. 14, dat de afwijkingen van de rechte lijn A B eerst beginnen, wanneer de maximale assimilatiesnelheid reeds bijna bereikt is. Bij een CO_2-concentratie binnen de chloroplast, overeenkomend met 0.001 pCt. CO_2 in de lucht, werkt de assimilatie reeds bijna op volle kracht. Men moet wel aannemen, dat op de plaats, waar de reactie, volgend op het diffusieproces, zich afspeelt, dan reeds bijna evenveel CO_2 aanwezig is als bij veel hooger CO_2-spanning.

Het assimileerend agens (hetzij chlorophyl, hetzij een enzym) bezit blijkbaar een enorme affiniteit tot koolzuur, zoodat het kans ziet, om bij een CO_2-spanning van 0.001 pCt. of $\frac{1}{100.000}$ atm. zich nog bijna quantitatief met CO_2 te verzadigen.

Ik kom hierop in het laatste hoofdstuk terug.

HOOFDSTUK VII.

HET OVERGANGSPUNT EN HET ASSUMILATIEGETAL. HET ASSIMILATIEQUOTIENT.

DE BETEEKENIS VAN HET OVERGANGSPUNT.

Het punt, waarbij twee factoren evenveel invloed hebben op de snelheid van de assimilatie, heb ik het *overgangspunt* genoemd (zie pag. 2). Het is het punt, waarbij twee processen, indien zij elk voor zich, ongehinderd konden plaatsgrijpen, dezelfde snelheid zouden hebben.

Het overgangspunt karakteriseert het praestatievermogen van twee processen ten opzichte van elkaar en daarmede tevens de verhouding van de in de plant aanwezige factoren, die deze processen beheerschen.

Het overgangspunt van CO_2-beperking in temperatuurbeperking bijvoorbeeld, bepaalt niet alleen een diffusiesnelheid ten opzichte van een reactiesnelheid, doch kan ook beschouwd worden als een maat voor de verhouding van een structuurelement (diffusieweerstand) tot een chemisch agens (Willstätter's „enzymfactor").

In een blad bijvoorbeeld zal, op grond van de structuur, de CO_2 veel moeilijker binnendringen dan in een Hormidiumcel. Bij een gelijke hoeveelheid „enzymfactor" zal dus het overgangspunt bij veel hooger CO_2-concentratie worden gevonden, dan bij Hormidium (de lijn A B in fig. 14 zal een grooteren hoek maken met de ordinaat).

Evenzoo geeft het overgangspunt van lichtbeperking in temperatuurbeperking niet alleen de verhouding weer tusschen een photochemische en een chemische reactiesnelheid, doch ook tusschen een photochemisch en een chemisch agens.

Ik meen daarom, dat het overgangspunt principieele waarde heeft. Het heeft echter slechts dan waarde, wanneer de uitwendige factoren, die op de processen in quaestie invloed uitoefenen, geheel zijn vastgelegd.

Dit is het geval voor het diffusieproces en het chemisch proces welke door de CO_2-concentratie en de temperatuur volkomen zijn gedefinieerd.

Anders is het bij het photochemisch proces, dat van de lichtintensiteit afhankelijk is. Om de snelheid van dit proces op deze wijze te definieeren, zou men moeten kennen:

1o. de lichtintensiteit in absolute eenheden;
2o. de energieverdeeling in het spectrum;
3o. de lichtverdeeling in de cel.

Op deze wijze kan de snelheid van het photochemisch proces dus onmogelijk worden gedefinieerd.

Nu kan men echter ook de *snelheid* van het chemisch proces bepalen in verhouding tot de *hoeveelheid* photochemisch agens (chlorophyl), in de plant aanwezig, al bepaalt men hierbij een verhouding van twee heterogene grootheden. Deze verhouding is het *assimilatiegetal* van Willstätter (1918). De definitie ervan luidt:

$$\frac{\text{assimilatie van } CO_2 \text{ in grammen per uur}}{\text{chlorophyl-gehalte in grammen.}}$$

Natuurlijk moet men het bepalen onder omstandigheden, waarbij de temperatuur beperkende factor is. Hierbij wordt stilzwijgend verondersteld, dat het chlorophyl in alle planten dezelfde activiteit bezit; op grond van de door Willstätter gevonden identiteit van het chlorophyl uit alle planten, heeft deze onderstelling een zekere mate van waarschijnlijkheid.

BEPALING VAN HET ASSIMILATIEGETAL.

Om het chlorophyl-gehalte te bepalen gebruikt Willstätter een colorimetrische methode. De standaardoplossing, hiervoor benoodigd, moet telkens versch gemaakt worden door verzeeping van een bepaalde hoeveelheid zuiver chlorophyl.

Nu is zuiver chlorophyl slechts met groote moeite te bereiden

en voor de meeste onderzoekers niet verkrijgbaar. Een tweede groot bezwaar is de instabiliteit van de standaardoplossing. *)

Weigert (1916) heeft echter een spectrophotometrische methode uitgewerkt, waarmede zonder standaardoplossing chlorophyl-concentraties kunnen worden bepaald.

Ik wil het principe van deze methode hier in 't kort weergeven.

Wanneer voor een klein golflengte-gebied $\lambda + d\lambda$ de wet van Lambert—Beer geldig is (wanneer bijv. bij verdunning de opgeloste kleurstof geen veranderingen door dissociatie e.d. ondergaat), geldt voor de lichtabsorptie door die kleurstof de door Bunsen aangegeven formule:

$$\varepsilon_\lambda = \left(\log \frac{I_0}{I}\right)_\lambda = k_\lambda cd.$$

Hierin beteekent ε_λ de z.g. extinctie, Io de intensiteit van den invallenden lichtbundel, I de intensiteit van den lichtbundel, die door de kleurstof wordt doorgelaten (de absorptie door het oplosmiddel niet medegerekend), c de concentratie in gr. per ccM., d de dikte van de absorbeerende laag in cM en k_λ een constante, bij een bepaalde kleurstof voor elke golflengte specifiek.

Bepaalt men de ε voor een aantal golflengten in het zichtbare spectrum, voor een oplossing van de concentratie c, dan kan men een extinctiekromme construeeren, door op de abscis de golflengten en op de ordinaat de gevonden extinctie af te zetten. Men krijgt bijv. een kromme met één of meer maxima, welke met absorptiebanden van de kleurstof overeenkomen.

Construeert men nu zulke extinctiekrommen voor de concentraties 2c en 4c, dan ziet men direct uit de formule, dat deze krommen bij elke λ resp. 2 en 4 $\times$ zoo hoog komen te liggen; de krommen krijgen een anderen vorm met in de richting van de ordinaat uitgerekte maxima.

Zet men echter op de ordinaat, in plaats van ε, log ε af, dan wordt elke vermenigvuldiging een optelling en verkrijgt men de krommen voor 2c en 4c door de eerste kromme evenwijdig aan

*) Kort vóór het beëindigen van dit onderzoek verscheen een artikel van Guthrie (1928), waarin een stabiele, anorganische standaardoplossing wordt aangegeven.

zichzelf in de richting van de ordinaat te verschuiven over een bedrag van log 2, resp. log 4.

Zulk een kromme, waarvan de vorm onafhankelijk is van de concentratie, karakteriseert een bepaalde kleurstof volkomen en wordt daarom door W e i g e r t *typische Farbkurve* genoemd.

Is deze kromme bekend voor de eenheid van concentratie en bepaalt men nu zulk een kromme voor een onbekende concentratie, dan kan men deze laatste berekenen, door den afstand te bepalen, over welke deze kromme moet worden verschoven, om de eerste tot bedekking te brengen.

Voor een van W i l l s t ä t t e r en S t o l l afkomstig mengsel van chlorophyl a en b in de natuurlijke verhouding bepaalde W e i g e r t nu de typische Farbkurve, in fig. 15 bij A afgebeeld.

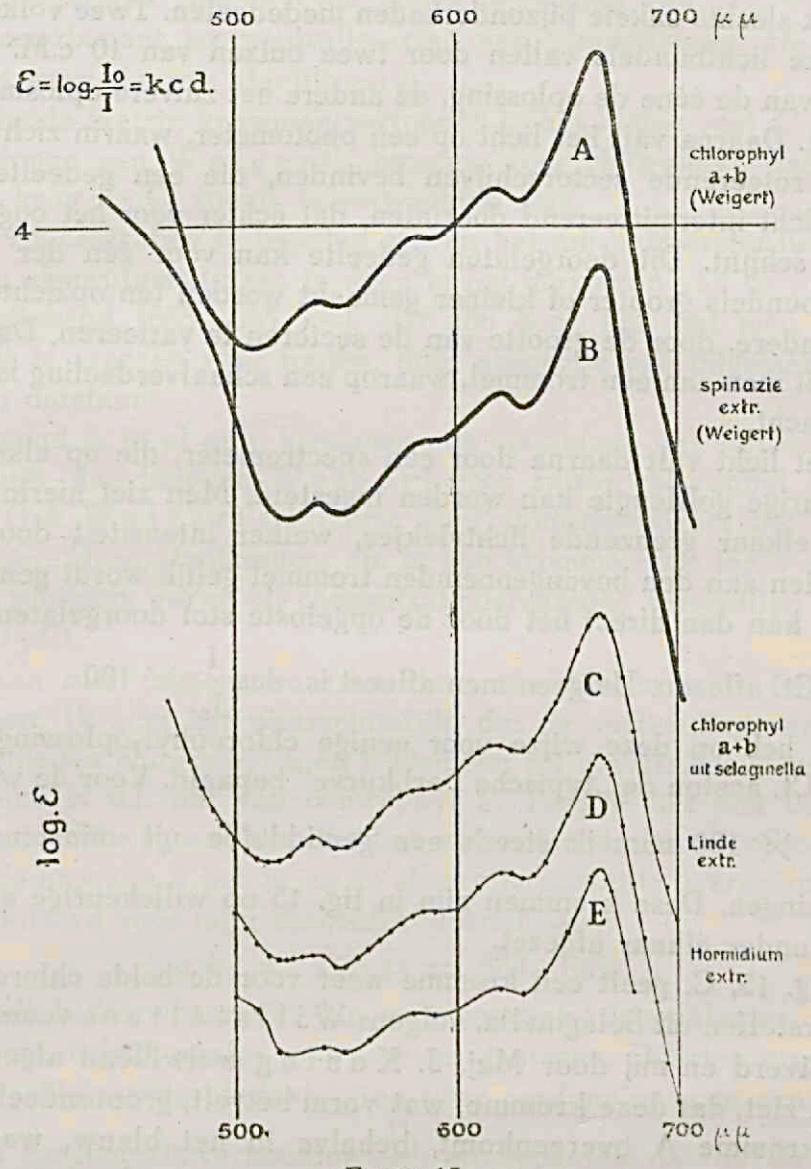
Deze kromme geldt voor het geval, dat bij een laagdikte van 1 cM. de concentratie 1 gr. per ccM. bedraagt.

Op een willekeurigen afstand daaronder is de kromme B afgezet, welke W e i g e r t verkreeg met een extract van spinaziebladen in 85 pCt. aceton. Legt men deze op de bovenste (dit gaat het beste met behulp van transparant papier), dan ziet men, dat in het golflengtegebied boven 550 $\mu\mu$ de beide krommen samenvallen. Daar beneden beginnen de in het bladextract aanwezige carotine en xanthophyl sterk te absorbeeren, zoodat in het blauw de kromme voor het bladextract veel hooger ligt. Hoewel het chlorophyl niet van de gele kleurstoffen is gescheiden, kan toch aldus de concentratie worden vastgesteld.

Het is op deze wijze, dat ik getracht heb het chlorophylgehalte van mijn wieren te bepalen. Ik heb dit eerst geprobeerd met een opstelling, bestaande uit een monochromator van v. C i t t e r t en een thermozuil van M o l l. Het bleek echter, dat het golflengtegebied van het te meten licht niet klein genoeg kon worden gemaakt, zonder aanzienlijke veranderingen in de opstelling aan te brengen, zoodat ik tot een ander instrument moest overgaan. Ik wil echter niet nalaten mijn groote erkentelijkheid te betuigen aan Prof. Dr. L. S. O r n s t e i n en Dr. P. H. v a n C i t t e r t voor de moeite, die zij zich hebben getroost om mij in te wijden in de techniek der spectrophotometrie.

Het toestel, waarmede ik ten slotte de chlorophylbepalingen

heb verricht, is een „Color Analyzer" van Keuffel and Esser Co.



Figuur 15.

Prof. Dr. N. Schoorl dank ik op deze plaats ten zeerste voor de bereidwilligheid, waarmede hij mij toestond dit prachtige instrument te gebruiken; evenzoo dank ik Prof. Dr. T. M. Kolthoff voor zijn hulp.

Wat de constructie van dit apparaat betreft, verwijs ik naar een korte beschrijving van van Tussenbroek (1927). Hier wil ik slechts enkele bijzonderheden mededeelen. Twee volkomen gelijke lichtbundels vallen door twee buizen van 10 c.M. lang, waarvan de ééne de oplossing, de andere het zuivere oplosmiddel bevat. Daarna valt het licht op een photometer, waarin zich twee snel roteerende sectorschijven bevinden, die een gedeelte van het licht intermitteerend doorlaten, dat echter voor het oog continu schijnt. Dit doorgelaten gedeelte kan voor één der beide lichtbundels grooter of kleiner gemaakt worden ten opzichte van de andere, door de grootte van de sectoren te varieeren. Daartoe draait men aan een trommel, waarop een schaalverdeeling is aangebracht.

Het licht valt daarna door een spectrometer, die op elke willekeurige golflengte kan worden ingesteld. Men ziet hierin twee aan elkaar grenzende lichtvlekjes, welker intensiteit door het draaien aan den bovengenoemden trommel gelijk wordt gemaakt. Men kan dan direct het door de opgeloste stof doorgelaten licht in pCt. aflezen. Hetgeen men afleest is dus $\frac{I}{I_0} \times 100$.

Ik heb op deze wijze voor eenige chlorophyl-oplossingen in 85 pCt. aceton de „typische Farbkurve" bepaald. Voor de waarde $\frac{I}{I_0} \times 100$ nam ik steeds een gemiddelde uit minstens vijf aflezingen. Deze krommen zijn in fig. 15 op willekeurige afstanden onder elkaar afgezet.

Fig. 15, C. geeft een kromme weer voor de beide chlorophylkleurstoffen uit Selaginella, volgens Willstätter's voorschrift gezuiverd en mij door Mej. J. Koning welwillend afgestaan. Men ziet, dat deze kromme, wat vorm betreft, grootendeels met de kromme A overeenkomt, behalve in het blauw, waar de eerste kromme aanzienlijk hooger ligt, wat op rekening van de nog aanwezige carotinoïden mag worden geschoven. Voor de zuiverheid van een chlorophyl-preparaat is zulk een kromme dus een mooie controle.

De beide onderste krommen geven de absorptie weer van extracten van een lindeblad en van een hoeveelheid Hormidium.

Daartoe werd het materiaal versch met aceton 85 pCt. geëxtraheerd; daarbij werd het in een mortiertje met amarilpoeder of diatomeeënaarde fijngewreven onder bijvoeging van een weinig calciumcarbonaat ter neutraliseering van plantenzuren. De oplossing werd daarna afgefiltreerd.

De beide laatste krommen vertoonen in het blauw veel grooter afwijkingen van W e i g e r t's kromme voor chlorophyl, dan de vorige kromme C, zooals te verwachten was.

Om concentraties te bepalen scheen het mij aanbevelenswaardig om absorptiemetingen te doen in het maximum van de roode absorptieband (663—665 $\mu\mu$), dat zóó hoog ligt, dat men niet behoeft te vreezen voor fouten, door absorptie van bijgemengde stoffen ontstaan.

Nu vond ik in al mijn krommen een maximum, dat een weinig lager ligt, dan hetgeen W e i g e r t voor zuiver chlorophyl aangeeft. Ook W e i g e r t's kromme voor spinazie-extract ligt hier iets lager. Deze afwijkingen, die in een kromme voor log ε zeer gering schijnen, geven bij concentratieberekening verschillen van 10—20 pCt.

Ik kan niet zeggen, waaraan deze afwijkingen zijn toe te schrijven. Ik acht het waarschijnlijk, dat de verhouding van de hoeveelheden chlorophyl a en b hier een rol speelt; het gemeten maximum is n.l. dat van chlorophyl a. Toch is het niet uitgesloten, dat W e i g e r t's methodiek zuiverder is, dan de mijne.

Uit de kromme A heb ik nu de absorptieconstante overgenomen als standaard voor mijn concentratiebepalingen:

$$\log k_\lambda = 4.78 \ (\lambda = 664—665).$$

Om de betrouwbaarheid van mijn concentratiebepalingen vast te stellen, heb ik eenige voorproeven genomen. Daartoe maakte ik van willekeurige bladextracten twee verdunningen in een bepaalde concentratieverhouding $\frac{C_1}{C_2}$ en bepaalde daarna de absorptie van deze oplossingen in een willekeurig gebied van het spectrum. Het resultaat vindt men in de tabellen 25, 26 en 27.

In de eerste twee tabellen is de gemiddelde fout voor de aldus bepaalde verhouding $\frac{C_1}{C_2}$ resp. 2½ en 4 pCt. De hoeveelheden

doorgelaten licht zijn in deze bepalingen vrij groot, in vele gevallen meer dan 50 pCt. Nu doet men de nauwkeurigste bepalingen (volgens W e i g e r t), indien ± 10 pCt. van het licht door de oplossing wordt doorgelaten. Men ziet dan ook, dat de resultaten in tabel 27 veel beter zijn, al is een fout van slechts 0.2 pCt. zeker beneden het gemiddelde.

Ik ben vervolgens overgegaan tot de bepaling van het assimilatiegetal. Daartoe deed ik eerst een assimilatiebepaling op de gewone wijze. Daarna werden de wieren aan de lucht gedroogd, van het glas afgekrabd en in een klein mortiertje fijngewreven onder toevoeging van ± 1 gr. diatomeeënaarde, een weinig calciumcarbonaat en 85 pCt. aceton, zoodat een dunne brei ontstond.

Op den geperforeerden bodem van een zeer klein B ü c h n e r-trechtertje werd een filtreerpapiertje gelegd en bedekt met een dun laagje diatomeeënaarde. Hier doorheen werd zoolang 85 pCt. aceton gezogen tot de vloeistof volkomen helder doorliep. Daarop werd het chlorophylextract afgefiltreerd, de oplossing in een zuigreageerbuis opgevangen en eenige malen zuiver oplosmiddel toegevoegd, totdat dit kleurloos doorliep. De oplossing werd in een geijkt maatkolfje bijgevuld tot 25 ccM. en de chlorophylconcentratie spectrophotometrisch bepaald. Daaruit werd dan het aantal m.gr. chlorophyl berekend in 25 ccM. oplosmiddel, d.i. dus de totale hoeveelheid, in de proef aanwezig.

De uitkomsten van deze bepalingen, benevens de berekende assimilatiegetallen, vindt men in tabel 28.

Het gemiddelde assimilatiegetal van 6.75, door mij gevonden, komt goed overeen met de bepalingen van W i l l s t ä t t e r, die voor normale bladen bij 25° assimilatiegetallen tusschen 5 en 12 vindt.

Zooals uit de tabel is te zien, vertoonen de afzonderlijke bepalingen onderling geen groote verschillen. Bij de uiterst geringe hoeveelheden koolzuur (cmM. per uur) en chlorophyl (duizendste m.grammen en minder), waar het hier om gaat, bedraagt de gemiddelde afwijking slechts ± 3.6 pCt. van de gemiddelde waarde. Des te meer spijt het mij, dat ik niet in de gelegenheid ben geweest, de waarde van den door W e i g e r t aangegeven absorptiecoëfficiënt beter te controleeren.

Het chlorophylgehalte van de eenheid van celmateriaal berekende ik op 27.1×10^{-6} gr.

BEPALING VAN HET ASSIMILATIEQUOTIENT.

Aan het einde van mijn onderzoek heb ik enkele bepalingen gedaan van het assimilatiequotient $\frac{O_2}{CO_2}$.

Om deze verhouding voor het assimilatieproces, onafhankelijk van de respiratie, te bepalen, nam ik eerst een donkerproef, waarbij CO_2-rijke lucht in het assimilatievat werd gezogen. Van de uitstroomende lucht werd het CO_2- en O_2-gehalte bepaald. Daarna geschiedde hetzelfde bij belichting. Uit de vermeerdering van de O_2 en de vermindering van de CO_2 in de uitstroomende lucht werd het assimilatiequotient berekend.

De proeven zijn vermeld in de tabellen 29 en 30, waarin de concentraties van de O_2, evenals die van de CO_2, in eenheden van 0.001 pCt. zijn aangegeven. Zooals men zien zal, vond ik waarden voor $\frac{O_2}{CO_2}$ van 1.09 en 1.13. Dit is in strijd met de ervaringen van Maquenne en Demoussy (1913) en van Willstätter en Stoll (1918), die voor het eigenlijk assimilatieproces steeds eene waarde van 1 vinden voor de verhouding $\frac{O_2}{CO_2}$.

Nu is Hormidium een organisme, dat olie als eerste zichtbaar assimilatieproduct heeft. Wanneer bij de assimilatie niet eerst suikers gevormd zouden worden, doch dadelijk olie zou worden gesynthetiseerd, zou men een quotient, hooger dan 1, mogen verwachten.

Ik hecht aan mijn eigen bepalingen geen beslissende waarde. Zij zouden herhaald moeten worden onder nauwkeurige contrôle van alle eventueele foutenbronnen. Ik deel ze hier in de eerste plaats mede, om te doen zien, dat ook voor dit doel mijn methodiek te gebruiken is. Toch kan ik niet nalaten, deze uitkomsten onder de aandacht van andere onderzoekers te brengen, daar het hier zeker een quaestie betreft, die de moeite waard is om nader te worden onderzocht.

HOOFDSTUK VIII.

THEORETISCHE BESCHOUWINGEN.

DE REGEL VOOR DE KETENPROCESSEN.

De eigenaardigheden van het assimilatieproces hebben we beschouwd als een speciaal geval van den algemeenen regel, welke voor opvolgende reacties geldt: de *langzaamste* reactie uit de keten beheerscht de snelheid, waarmede het eindproduct wordt gevormd.

Nu is in deze zegswijze iets paradoxaals, hoewel ieder begrijpt wat ermee bedoeld wordt. Want indien geen intermediaire producten worden opgehoopt, loopen alle reacties in de keten even snel. De „langzaamste" reactie zou men dus kunnen noemen die reactie, welke de langzaamste zou zijn, indien alle reacties vrij en ongehinderd konden verloopen.

Naar het mij voorkomt is de regel voor de ketenreacties zelf weer een speciaal geval van een veel algemeener regel, welke men overal terugvindt.

Ik zou deze aldus willen formuleeren: als een stroom, van welken aard ook, achtereenvolgens verschillende weerstanden ondervindt, wordt de stroomsnelheid beheerscht door de grootste van die weerstanden. Of het hier geldt een stroom van electriciteit of stof, of de verplaatsing geschiedt door convectie of diffusie, of dat zij is van intermoleculairen aard, zooals bij chemische reacties, steeds vindt men hetzelfde principe van toepassing.

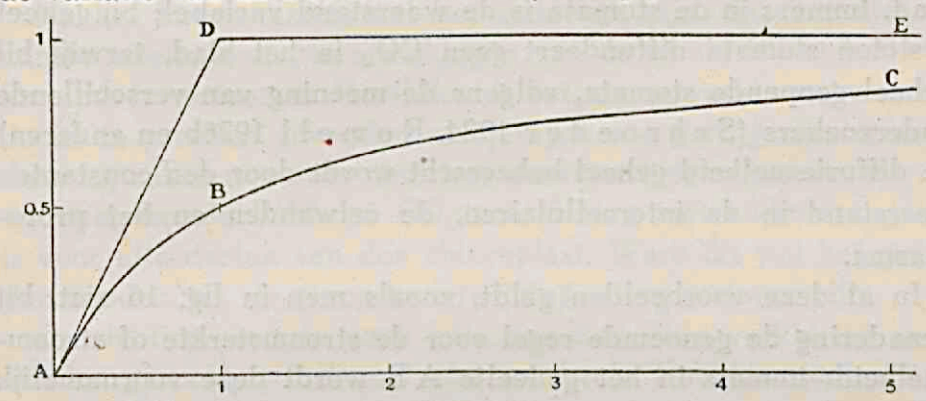
In al deze gevallen geldt de regel slechts *bij benadering* en gaat slechts op, indien één weerstand zeer veel grooter is dan de andere. Zijn twee of meer weerstanden van dezelfde grootheidsorde, dan treden er belangrijke afwijkingen op. In zulke gevallen kan een quantitatieve uitdrukking voor de stroomsterkte

of stroomsnelheid zeer ingewikkeld worden. Eenige eenvoudige gevallen wil ik hier echter bespreken.

Wanneer onder invloed van een electromotorische kracht E een electrische stroom gaat door twee in serie geschakelde geleiders met weerstanden R_1 en R_2, dan is de stroomsterkte I volgens de wet van O h m:

$$I = \frac{E}{R_1 + R_2}. \quad \ldots\ldots\ldots \quad 3)$$

Neemt men E en R_2 constant, bijvoorbeeld resp. 1 (volt) en 1 (ohm) en gaat men nu R_1 van ∞ tot 0 varieeren, dan kan men de variatie van de stroomsterkte I (in amp.) berekenen.



Figuur 16.

Een graphische voorstelling hiervan geeft fig. 16. Ik heb op de ordinaat afgezet de stroomsterkte I, op de abscis de omgekeerde waarde van den weerstand = het *geleidingsvermogen* $\frac{1}{R_1}$ van den eersten geleider. Laat men dit geleidingsvermogen toenemen, dan zal de stroomsterkte stijgen, doch des te minder, naarmate $\frac{1}{R_1}$ grooter wordt (A B C). Neemt men in plaats van een electrischen stroom een vloeistofstroom, welke achtereenvolgens twee even nauwe buizen passeert, dan geldt hiervoor volkomen dezelfde berekening. Men vervange slechts het aantal amp. door het aantal ccM. per tijdeenheid, de electromotorische kracht door het drukverval en de weerstanden R_1 en R_2 door de lengten l_1 en l_2 van de beide buizen, vermenigvuldigd met een zekere con-

stante. Varieert men nu de lengte l_1 en laat men l_2 constant, dan krijgt men voor de stroomsnelheid (aangenomen dat de wet van Poiseuille opgaat) weder een kromme van volkomen dezelfde gedaante.

Een derde geval, waarvoor deze formule geldigheid bezit, is voor twee op elkander volgende diffusieprocessen. Men vervangt dan E door het concentratieverschil $C_1—C_2$ aan het begin en het eind van den diffusieweg. Den diffusieweerstand in het eerste traject (R_1) kan men weder varieeren, terwijl die in het tweede traject (R_2) constant wordt gehouden.

Een voorbeeld hiervan is misschien de diffusie van CO_2 in een blad. Immers in de stomata is de weerstand variabel; bij geheel gesloten stomata diffundeert geen CO_2 in het blad, terwijl bij geheel geopende stomata, volgens de meening van verschillende onderzoekers (Schroeder 1924, Romell 1926b en anderen) de diffusiesnelheid geheel beheerscht wordt door den constanten weerstand in de intercellulairen, de celwanden en het protoplasma.

In al deze voorbeelden geldt, zooals men in fig. 16 ziet, bij benadering de genoemde regel voor de stroomsterkte of stroomsnelheid; immers in het gedeelte A B wordt deze voornamelijk beheerscht door den weerstand R_1, in het gedeelte B C voornamelijk door den weerstand R_2.

Zou men hier Blackman's formuleering willen toepassen, dan zou de stroomsnelheid uitsluitend afhankelijk zijn van den grootsten weerstand, terwijl de kleinste in 't geheel geen invloed zou hebben; volgens deze definitie zou dan de stroomsterkte door de kromme A D E worden voorgesteld.

Nu ziet men, dat in het overgangspunt B de berekende kromme juist 50 pCt. van de ideale Blackman-kromme (punt D) afwijkt.

Zou men het assimilatieproces met dit eenvoudige voorbeeld kunnen vergelijken, dan zou men daarbij in het overgangspunt eveneens afwijkingen van 50 pCt. mogen verwachten.

Romell grondt op overwegingen van geheel denzelfden aard zijn kritiek op Blackman's formuleering. Hij gebruikt dezelfde formule 3) in iets anderen vorm (l.c. p. 752) en geeft een model,

dat de samenwerking der factoren aanschouwelijk voorstelt: eenige in serie geschakelde elementen, welke een electrischen stroom leveren, die een motor drijft. De elementen kunnen elk tot geringer of grooter hoogte gevuld worden, waarvan de arbeidslevering van den motor afhankelijk is. Ook in dit model gaat het dus om eenige achter elkander geschakelde weerstanden, die gezamenlijk de stroomsterkte bepalen.

In principe heeft R o m e l l zeker gelijk, wanneer hij meent, dat steeds alle factoren gelijktijdig van invloed zijn op het assimilatieproces en dat theoretisch de ideale B l a c k m a n-kromme onbestaanbaar is.

Na het bovenstaande zal het duidelijk zijn, dat het niet de minste moeite kost, om afwijkingen van de ideale B l a c k m a n-kromme te verklaren. Moeilijker is het, om te verklaren, waarom de in de proeven gevonden afwijkingen *zoo gering* zijn, temeer, daar zij zeker nog voor een deel daaraan toegeschreven moeten worden, dat de licht- en CO_2-voorziening niet volkomen gelijk is voor alle deelen van den chloroplast. Ware dit wel het geval, dan zouden m.i. de gevonden afwijkingen nog geringer zijn.

De richting, waarin naar mijn meening deze verklaring moet worden gezocht, wil ik met een voorbeeld trachten duidelijk te maken.

Als voorbeeld wil ik nemen een diffusieproces, waarmede CO_2 in de plant diffundeert, gevolgd door de binding van CO_2 aan chlorophyl en de photochemische omzetting van koolzuurchlorophyl.

Wat deze binding betreft, neem ik aan dat er, zooals op pag. 5 werd verondersteld, een dissociatie-evenwicht bestaat tusschen koolzuur en chlorophyl:

$$CO_2 + \text{chlor.} \rightleftarrows CO_2\text{chlor.}$$

Ik wil nu op dit evenwicht de wet van de massawerking toepassen. Ik ben mij bewust, dat ik daarbij een kleine fout bega. Voor reacties in een grensvlak, zooals die, waar het hier om gaat, is n.l. de wet van de massawerking niet geldig, doch liggen de quantitatieve verhoudingen eenigszins anders. F r e u n d l i c h's formule voor de adsorptie-isotherm zou hier misschien van toepassing zijn.

Het volgende is dan ook slechts te beschouwen als een half-quantitatieve uiteenzetting.

Men krijgt dan voor het bovengenoemde evenwicht:

$$\frac{[CO_2] \cdot [\text{chlor.}]}{[CO_2\text{chlor.}]} = k,$$

waarin k de dissosiatieconstante voorstelt, of, als men de in totaal aanwezige hoeveelheid chlorophyl = 1 stelt:

$$\frac{[CO_2] \cdot [1 - CO_2\text{chlor.}]}{[CO_2\text{chlor.}]} = k.$$

De hoeveelheid chlorophyl, aan CO_2 gebonden, is dan:

$$[CO_2\text{chlor.}] = \frac{[CO_2]}{[k + CO_2]}.$$

In fig. 17 is op de abscis de CO_2-concentratie, op de ordinaat de concentratie van koolzuurchlorophyl afgezet; voor de dissociatieconstante k is resp. de waarde 1, 0.1 en 0.01 gekozen. Men krijgt dan de dissociatiekrommen a, b en c, welke den vorm hebben van een gelijkzijdige hyperbool.

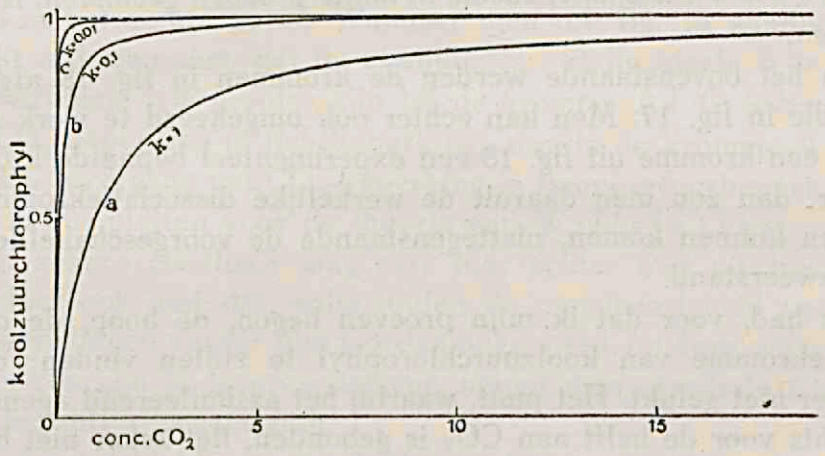
Neemt men aan, dat dit dissociatie-evenwicht zich spontaan instelt, dus geen tijd kost, dan zal de hoeveelheid koolzuurchlorophyl steeds aldus door de CO_2-concentratie in de chloroplast worden bepaald. Bij een zekere, constante lichtintensiteit mag men aannemen, dat de snelheid van het photochemisch proces recht evenredig is met de hoeveelheid koolzuurchlorophyl. De ordinaat in de figuur geeft dan niet alleen de concentraties van koolzuurchlorophyl aan, doch tevens de reactiesnelheden van het photochemisch proces, in afhankelijkheid van de CO_2-concentratie in de chloroplast.

Hoewel het niet mogelijk is de concentraties van koolzuurchlorophyl direct te bepalen, kan men deze dus toch te weten komen, door *de reactiesnelheden daarvoor als maat te nemen.* Op deze wijze zou het dus mogelijk zijn, de dissociatiekromme te bepalen.

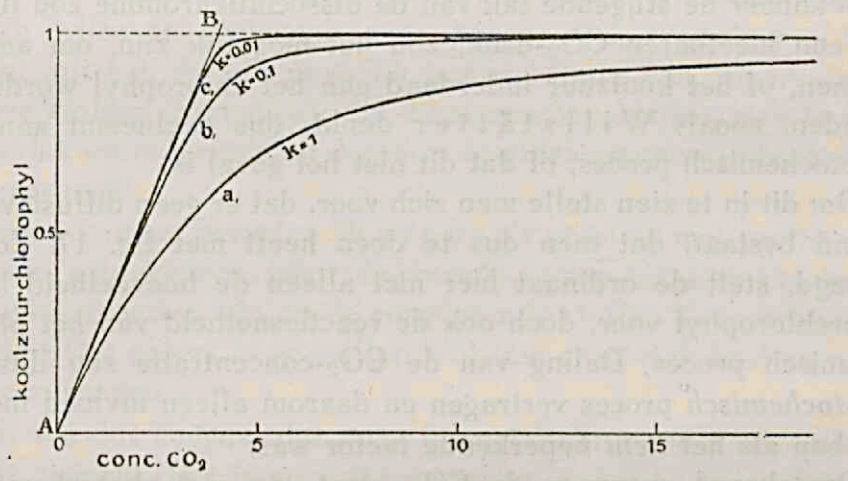
Dit alles geldt voor de CO_2-concentratie binnen de chloroplast. Men bepaalt echter niet deze, doch de CO_2-concentratie buiten de cel, welke steeds hooger is. Zooals we gezien hebben is de diffusiesnelheid (dezelfde als de reactiesnelheid) recht evenredig met

dit concentratieverschil; omgekeerd hoort een bepaald concentratieverschil bij elke diffusie- af reactiesnelheid.

Dit rechtlijnig verband geeft in fig. 18 de lijn A B, waaraan men direct kan zien, hoe groot bij elke reactiesnelheid het bijbehoorende concentratieverschil zijn moet.



Figuur 17.



Figuur 18.

Om nu te vinden hoe de reactiesnelheden van het photochemisch proces afhankelijk zijn van de CO_2-concentraties *buiten* de cel, moet men eenvoudig bij de concentraties in fig. 17 de bijbehoorende concentratieverschillen optellen; anders gezegd: men construeert nu de krommen met A B in fig. 18 als ordinaat. Men krijgt dan de krommen a_1, b_1 en c_1 (fig. 18).

Men ziet uit deze figuur duidelijk, dat, hoe kleiner de k wordt, d.w.z. hoe grooter de affiniteit van chlorophyl tot CO_2, hoe meer de kromme voor de reactiesnelheid de ideale Blackman-kromme nabij komt. *Een zeer groote affiniteit van het assimileerend agens tot CO_2 is dus in staat, om een vrijwel ideale Blackman-kromme, zooals in mijne proeven gevonden, te verklaren.*

In het bovenstaande werden de krommen in fig. 18 afgeleid uit die in fig. 17. Men kan echter ook omgekeerd te werk gaan. Gaf een kromme uit fig. 18 een experimenteel bepaalde kromme weer, dan zou men daaruit de werkelijke dissociatiekromme te weten kunnen komen, niettegenstaande de voorgeschakelde diffusieweerstand.

Ik had, voor dat ik mijn proeven begon, de hoop, de dissociatiekromme van koolzuurchlorophyl te zullen vinden; dit is echter niet gelukt. Het punt, waarbij het assimileerend agens nog slechts voor de helft aan CO_2 is gebonden, ligt zeker niet boven een CO_2-druk van 10^{-6} atm.

Wanneer de stijgende tak van de dissociatiekromme zou liggen bij een meetbaren CO_2-druk, zou het mogelijk zijn, om aan te toonen, of het koolzuur inderdaad aan het chlorophyl wordt gebonden, zooals Willstätter denkt, dus deelneemt aan het photochemisch proces, of dat dit niet het geval is.

Om dit in te zien stelle men zich voor, dat er geen diffusieweerstand bestaat, dat men dus te doen heeft met fig. 17. Zooals gezegd, stelt de ordinaat hier niet alleen de hoeveelheid koolzuurchlorophyl voor, doch ook de reactiesnelheid van het photochemisch proces. Daling van de CO_2-concentratie zou dus het *photochemisch* proces vertragen en daarom alleen invloed mogen hebben als het *licht* beperkende factor was.

Omgekeerd, wanneer de CO_2 eerst een niet-photochemische omzetting zou ondergaan, (zooals in Warburg's acceptortheorie) zou men zich kunnen voorstellen, dat het een dissocieerbare verbinding aanging met een „enzym", op dezelfde wijze als hierboven voor chlorophyl is uiteengezet. Dan zou verlaging van de CO_2-concentratie het *chemisch* proces vertragen, dus alleen invloed hebben, als de *temperatuur* beperkende factor was.

Deze verschijnselen liggen nu bij zulke lage CO_2-concentraties, dat ik niet heb kunnen vinden, welke van de beide veronderstellingen de juiste is. Of het nu chlorophyl is, of een „enzym", dat zulk een enorme affiniteit bezit voor CO_2, is nog niet uitgemaakt.

Toch heb ik een kleine indicatie gevonden, die wijst in de richting van het eerste geval. Wanneer men n.l. fig. 14 aandachtig bekijkt, zal men zien, dat de afwijkingen van de ideale Blackman-kromme iets grooter zijn bij de kromme AFG (overgang van CO_2-beperking in lichtbeperking), dan in de kromme ADE en ABC (overgang van CO_2-beperking in temperatuurbeperking). Dit zou dus pleiten voor de theorie van Willstätter.

Een zekere conclusie mag men hier echter niet uit trekken. Ik geloof ook niet dat, zelfs indien de nauwkeurigheid van de CO_2-bepalingen verder kon worden opgevoerd, op deze wijze het bewijs zou zijn te leveren, temeer, omdat men steeds last heeft van den diffusieweerstand.

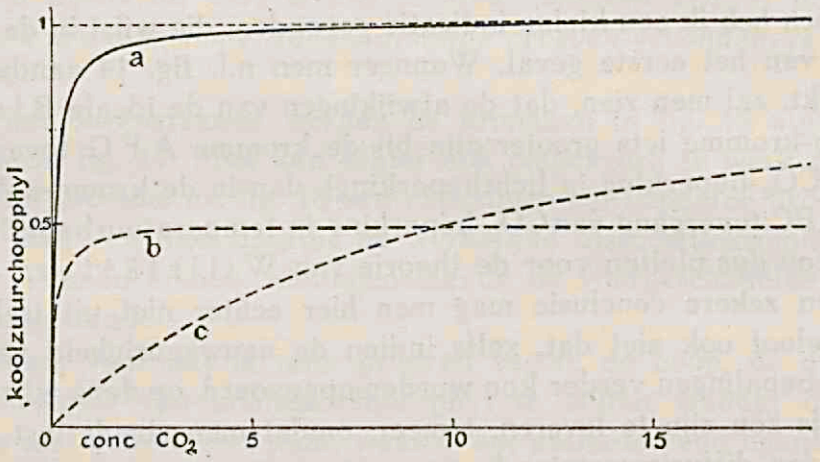
Daar het gebleken is, dat de dissociatiekromme niet op directe wijze kon worden bepaald, moest het mogelijk zijn, deze op kunstmatige wijze te verleggen naar hooger CO_2-spanningen. Het schijnt mij toe, dat dit mogelijk is met behulp van oppervlakteactieve stoffen (narcotica), die de eigenschap hebben zich in een grensvlak op te hoopen en daarvan de aldaar reageerende stoffen te verdringen.

Hierop immers berusten Warburg's proeven met urethanen, waaruit gebleken is, dat de reactie, waar het hier om gaat, grensvlak-reacties zijn en de reageerende stoffen (waarschijnlijk ook de CO_2) geheel of gedeeltelijk uit dat grensvlak kunnen worden verdrongen.

Dat wil dus zeggen, dat onze dissociatiekromme naar omlaag wordt gedrukt. Het is nu maar de vraag, op welke wijze dat gebeurt.

Wanneer in fig. 19 de kromme a weder de dissociatiekromme voorstelt onder normale omstandigheden (aangenomen $k = 0{,}1$), dan zou, bij aanwezigheid van een bepaalde concentratie van urethaan, deze kromme bijvoorbeeld overal tweemaal zoo laag kunnen liggen (kromme b).

Dit zou beteekenen, dat de helft van het aanwezige aantal chlorophylmoleculen van het koolzuur wordt afgesloten, wordt „geblokkeerd", terwijl de andere helft onveranderd beschikbaar blijft.



Figuur 19.

Het is echter ook mogelijk, dat de kromme niet naar beneden, maar naar rechts wordt gedrukt (kromme c). Dit zou beduiden, dat wel alle chlorophyl beschikbaar bleef, doch door toevoeging van urethaan de dissociatieconstante k aanzienlijk zou worden verhoogd (de kromme is geconstrueerd voor k = 10).

In dit laatste geval zou de stijgende tak van de kromme bij meetbare CO_2-concentraties komen te liggen en zou het mogelijk zijn experimenteel te bewijzen, of het koolzuur al of niet aan het photochemisch proces deelneemt.

Er zijn cijfers bij W a r b u r g, die in deze richting wijzen. W a r b u r g vermeldt n.l., ook bij de allerlaagste CO_2-spanningen, waarbij de CO_2-concentratie beperkende factor is, een sterk remmenden invloed van geringe hoeveelheden urethaan (1920, l.c. tabel 8).

Dit zou te verklaren zijn volgens kromme c, doch niet volgens kromme b.

De tijd ontbrak mij, om de proeven in deze richting voort te zetten.

MOGELIJKHEDEN VAN DE GEBRUIKTE METHODE VAN ONDERZOEK.

De gebruikte methode zou ik aldus willen karakteriseeren: in het ketenproces maakt men de afzonderlijke reacties één voor één „het langzaamst" door wijziging van de uitwendige omstandigheden en kan dan de eigenschappen van elk van deze reacties bestudeeren. Zooals gebleken is, is het mogelijk om zoo, zonder in de structuur van het organisme in te grijpen, verschillende phasen van het proces te onderzoeken, die scherp van elkander te scheiden zijn.

Het spreekt vanzelf, dat *alleen langzaam verloopende processen* op deze wijze kunnen worden gevonden. Spontaan verloopende reacties (bijv. ionen-reacties) zal men zoo niet vinden.

Om twee reacties van elkaar te kunnen onderscheiden *moeten zij van eigenschappen verschillen*, d.w.z. zij moeten op verschillende wijze afhankelijk zijn van één of meer uitwendige factoren. Twee reacties, die geheel dezelfde eigenschappen hebben, zullen met deze methode niet van elkaar kunnen worden gescheiden.

Over de *volgorde* van de verschillende processen is slechts in bijzondere gevallen iets te zeggen. Zoo is het bijvoorbeeld wel duidelijk, dat de assimilatie begint met het diffusieproces, doch heb ik de volgorde van het photochemisch en chemisch proces niet kunnen vaststellen.

De assimilatie bestaat hoogstwaarschijnlijk uit meer dan drie processen. Ik ben dan ook overtuigd, dat de analyse in dezelfde richting verder kan worden doorgevoerd. In de eerste plaats zal daarbij het chemisch proces in verschillende deelen moeten worden gesplitst.

Een vingerwijzing vindt men in de proeven van W a r b u r g, die bij stijgende temperatuur een zeer groote verandering van Q_{10} vond, waaruit men reeds tot den samengestelden aard van dit proces mag concludeeren. Bij een nauwkeurige bepaling van de temperatuurkromme van de assimilatie bijv. van 0° tot 25°, zal men misschien een sprongsgewijze verandering van de temperatuurcoëfficiënt vinden, op de wijze, zooals C r o z i e r (1924)

zich dat voor alle mogelijke levensprocessen voorstelt, waaruit men zal kunnen besluiten tot het bestaan van twee chemische reacties met verschillende Q_{10}.

De uitwendige factoren, van welker invloed men gebruik kan maken, zijn niet beperkt tot de CO_2-concentratie, de lichtintensiteit en de temperatuur. Want ook blauwzuur en urethanen, zooals door Warburg gebruikt, vallen onder dezelfde rubriek, mits hun werking reversibel is en geen veranderingen in de structuur van het organisme teweegbrengt.

Als verder mogelijke hulpmiddelen zou ik willen noemen ammoniumzouten, waarvan door Benecke (1921) een specifieke werking op het assimilatieproces wordt vermeld en de spanning van den waterdamp, waarvan ik een belangrijken invloed op het assimilatieproces heb meenen waar te nemen. De spanning van den waterdamp lijkt mij voor dit doel daarom zoo geschikt, omdat zij tot de „natuurlijke" invloeden kan worden gerekend en een organisme als Hormidium uitdroging zonder schade weerstaat, terwijl complicaties, zooals zij zich bij bladen voordoen door het sluiten van de stomata, hier zijn vermeden. Over onderzoekingen hieromtrent zie men het overzicht bij Stiles (1925, p. 108).

Tenslotte kan men trachten invloed uit te oefenen op de constitutie van de cel, door het organisme te laten opgroeien onder verschillende omstandigheden, bijvoorbeeld bij weglating van één of meer voedingszouten. Een poging tot analyse in deze richting vindt men bij Briggs (1923 b.). Men zie verder Stiles (p. 115).

Op al deze manieren is het misschien mogelijk, iets meer te weten te komen van den aard van de afzonderlijke processen, waaruit de assimilatie bestaat en het agens, waardoor ieder van hen wordt teweeggebracht.

SAMENVATTING.

De koolzuurassimilatie is een ketenreactie, bestaande uit minstens drie op elkander volgende processen, n.l. een diffusie, een photochemisch en een chemisch proces. Dit valt af te leiden uit Blackman's principe der beperkende factoren en verschillende andere verschijnselen. Deze processen kunnen elk afzonderlijk de snelheid van de assimilatie beheerschen.

Volgens een aantal onderzoekers vallen belangrijke afwijkingen van Blackman's formuleering te constateeren. Deze moeten echter bijna geheel worden toegeschreven aan het feit, dat de verschillende chloroplasten van een blad of plant niet in gelijke condities verkeeren wat licht en koolzuur betreft.

Een methode werd uitgewerkt, waarbij dit wel het geval is. Als materiaal werden ééncellige luchtwieren (Hormidium spec.) gebezigd, in een laag van één cel dik.

Het koolzuurgehalte van de lucht in het assimilatievat werd geregeld door de instroomende lucht te doen strijken langs een bufferoplossing van carbonaat en bicarbonaat. Het verbruik van koolzuur werd gasanalytisch bepaald.

In een aantal proeven werd de ivloed van de lichtintensiteit, de temperatuur en de CO_2-concentratie vastgesteld. De verkregen resultaten zijn vrij goed in overeenstemming met de door Blackman gegeven formuleering. De afwijkingen van de „ideale Blackman-kromme" zijn gering.

Tusschen 12° en 20° C. werd een Q_{10} van 1.87 gevonden, wanneer de temperatuur beperkende factor was; evenzoo een Q_{10} van $\pm$ 1, wanneer het licht beperkende factor was.

Wanneer de concentratie van het koolzuur beperkende factor

factor is, wordt de snelheid van de assimilatie, zelfs bij zeer kleine, ééncellige organismen, steeds door een diffusieproces beheerscht.

Het proces, dat in de reactieketen op het diffusieproces volgt, wordt veroorzaakt door een agens (vermoedelijk chlorophyl), dat een buitengewoon groote affiniteit tot koolzuur bezit. Bij een koolzuurspanning van $\frac{1}{100000}$ atm. heeft het zich reeds vrijwel quantitatief met koolzuur verzadigd.

Voor Hormidium werd het assimilatiegetal $\left(\frac{\text{gr. } CO_2 \text{ per uur}}{\text{gr. chlorophyl}}\right)$ vastgesteld. Daartoe werd het chlorophylgehalte langs spectrophotometrischen weg bepaald. Het assimilatiegetal bedroeg 6,75 bij 20° C.

Het assimilatiequotient $\frac{O_2}{CO_2}$ is bij Hormidium waarschijnlijk hooger dan 1, hetgeen misschien verband houdt met het feit, dat olie het eerst zichtbare assimilatieproduct is.

Het in de voorafgaande hoofdstukken beschreven onderzoek werd verricht in het Botanisch Laboratorium te Utrecht. Ik wil hier een woord van bijzonderen dank richten aan mijn promotor, Prof. Dr. F. A. F. C. W e n t, voor velerlei hulp en kritiek, doch bovenal voor het vertrouwen, in mij gesteld.

LITERATUURLIJST.

Benecke, W. Beiträge zum Problem der Kohlensäureassimilation. Zeitschr. f. Bot. *13*, p. 417, 1921.

Beyerink, M. W. Notiz über Pleurococcus vulgaris. Centralblatt f. Bacteriologie u. Parasitenkunde, Jena, 2e Abt, *4*, p. 785, 1898.

Blackman, F. F. Optima and Limiting Factors. Ann. of Bot. *19*, p. 281, 1905.

——— and Matthaei, G. L. C. Experimental Researches on Vegetable Assimilation and Respiration. IV. A Quantitative Study of Carbon Dioxide Assimilation and Leaf Temperature in Natural Illumination. Proc. Roy. Soc. London, B, *76*, p. 402, 1905.

——— and Smith, A. M. Experimental Researches etc. VIII. A new Method for Estimating the Gaseous Exchange of submerged Plants. Proc. Roy. Soc. London, B, *83*, p. 374, 1911.

——— and ———, Experimental Researches etc. IX. On Assimilation of submerged Water-Plants and its Relation to the Concentration of Carbon Dioxide and other Factors. Proc. Roy. Soc. London., B, *83*, p. 389, 1911.

Boysen Jensen, P. Studies on the Production of Matter in Light- and Shadow-Plants. Bot. Tidsskr. *36*, p. 219, 1918.

Briggs, G. E. Experimental Researches etc. XIII. The Development of Photosynthetic Activity during Germination. Proc. Roy. Soc. London, B, *91*, p. 249, 1920.

——— Experimental Researches etc. XV. The Development of Photosynthetic Activity during Germination of Different Types of Seeds. Proc. Roy. Soc. London, B, *94*, p. 12, 1922a.

——— Experimental Researches etc. XVI. The Characteristics of subnormal Photosynthetic Activity Resulting from Deficiency of nutrient Salts. Proc. Roy Soc. London, B, *94*, p. 20, 1922b.

Brown, W. H. The Theory of Limiting Factors. Philippine Journ. Sc. C. Bot., *13*, p. 345, 1918.

——— and Heise, G. W. The Application of Photochemical Temperature Coefficients to the Velocity of Carbon Dioxide Assimilation. Philippine Journ. Sc. C. Bot., *12*, p. 1, 1917a.

——— and ——— The Relation between Light Intensity and Carbon Dioxide Assimilation. Philippine Journ. Sc. C. Bot., *12*, p. 85, 1917b.

Crozier, W. J. The Critical Thermal Increment for the Locomotion of a Diplopod. Journ. Gen. Physiol. 7, p. 123, 1924.

Chodat, R. Monographies d'Algues en culture pure. Matériaux pour la Flore Cryptogamique Suisse, *4*, Fasc. 2., 1913.

Engelmann, T. W. Ueber Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Microspectrum. Bot. Zeit. *40*, p. 419, 1882.

———— Farbe und Assimilation. Bot. Zeit. *41*, p. 1, 1883.

———— Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. Bot. Zeit. *42*, p. 81, 1884.

Ewart, A. J. On Assimilatory Inhibition in Plants. Journ. Linn. Soc., Bot., *31*, p. 364, 1896.

———— Further Observations upon Assimilatory Inhibition. Journ. Linn. Soc., Bot., *31*, p. 554, 1897.

———— The Action of Cold and Sunlight upon Aquatic Plants. Annals of Bot., *12*, p. 363, 1898a.

———— The Action of Chloroform on CO_2-Assimilation. Annals of Bot., *12*, p. 415, 1898b.

Guthrie, J. D. A stable Colorimetric Standard for Chlorophyll Determinations. Amer. Journ. of Bot., *15*, p. 86, 1928.

Harder, R. Kritische Versuche zu Blackman's Theorie der begrenzenden Factoren bei der Kohlensäureassimilation. Jahrb. f. wiss. Bot., *60*, p. 531, 1921.

Honert, T. H. van den. Onderzoekingen over beperkende factoren bij de koolzuurassimilatie. Versl. Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam *37*, p. 295, 1928.

Horn, Trude. Das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt in seiner Abhängigkeit vom Wassergehalt. Bot. Arch., *3*, p. 137, 1923.

Irving, A. A. The Beginning of Photosynthesis and the Development of Chlorophyll. Annals of Bot., *24*, p. 805, 1910.

Kolthoff, T. M. Der Gebrauch von Farbenindicatoren. 2e Aufl. Berlin, 1923.

Krogh, Aug. The Rate of Diffusion of Gases through Animal Tissues, with some Remarks on the Coefficient of Invasion. Journ. of Physiol. *52*, p. 392, 1919.

———— A Gas Analysis Apparatus accurate to 0,001 % mainly designed for Respiratory Exchange Work. Biochem. Journ. *14*, p. 267, 1920.

Kruyt, H. R. Inleiding tot de Physische Chemie, de Kolloidchemie in het bizonder, voor Biologen en Medici, 3e druk. Amsterdam, 1926.

Lewis, William C. M'C. A System of Physical Chemistry, I, Kinetic Theory. London, 1918.

Lundegårdh, H. Der Kreislauf der Kohlensäure in der Natur. Jena, 1924.

Lundegårdh, H. Der Temperatur Factor bei Kohlensäureassimilation und Atmung. Biochem. Zeitschr. *154*, p. 195, 1924.

———— Die Kohlensäureassimilation der Zuckerrübe. Flora *121*, N. F. *21* p. 273, 1927.

Maquenne, L. et Demoussy, E. Sur la valeur des coefficients chlorophylliens et leur rapports avec les quotients respiratoires réels. Comp. rend. Acad. sc., *156*, p. 506, 1913.

Matthaei, G. L. C. Experimental Researches etc. III. On the Effect of Temperature on Carbon Dioxide Assimilation. Phil. Trans. Roy Soc. London, B, *197*, p. 47, 1904.

Pantanelli, E. Abhängigkeit der Sauerstoffausscheidung belichteter Pflanzen von äusseren Bedingungen. Jahrb. f. wiss. Bot., *39*, p. 167, 1903.

Pascher, A. Die Süsswasserflora Deutschlands, Oesterreichs und der Schweitz. Heft 6: Chlorophyceae III. Jena, 1914.

Plotnikow, J. Lehrbuch der allgemeinen Photochemie. Berlin und Leipzig, 1920.

Pringsheim, E. G. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Microorganismen. V Mitt. Methoden und Erfahrungen. Beitr. Biol. d. Pflanzen, *14* p. 283, 1926.

Romell, L. G. Über das Zusammenwirken der Productionsfactoren. Eine kritische Studie. Jahrb. f. wiss. Bot., *65*, p. 739, 1926a.

———— Über die Bedingungen des Kohlensäuretransportes zu den Chloroplasten. Flora, *121*, N. F. *21*, p. 125, 1926b.

Schroeder, H. Die Kohlendioxydversorgung der Chloroplasten. Flora, *117*, N. F. *17*, p. 270, 1924.

———— und Horn, Trude. Das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt in seiner Abhängigkeit vom Wassergehalt. Vorl. Mitteilg. Biochem. Zeitschr. *130*, p. 165, 1922.

Smith, A. M. The Temperature-coefficient of Photosynthesis: A Reply to Criticism. Annals of Bot., *33*, p. 517, 1919.

Spoehr, H. A. Photosynthesis. New York, 1926.

Stocker, O. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Laub- und Strauchflechten. Ein Beitrag zur experimentellen Ökologie und Geographie der Flechten. Flora, *121*, N. F. *21*, p. 334, 1927.

Stiles, W. Photosynthesis. London, 1925.

Thoday, D. Carbon Assimilation. South African Journ. Sc., *19*, p. 52, 1922.

Timiriaseff, C. The Cosmical Function of the Green Plant, (Croonian Lecture). Proc. Roy. Soc. London, B, *72*, p. 424, 1903.

Tussenbroek, M. J. van. Vergelijkend Onderzoek van verschillende Colorimeters. Chem. Weekbl. *24*, p. 240, 1927.

Ursprung, A. Über die Stärkebildung im Spectrum. Ber. deut. bot. Ges., *35*, p. 44, 1917.

———— Über die Bedeutung der Wellenlänge für die Stärkebildung. Ber. d. d. bot. Ges., *36*, p. 86, 1918a.

Ursprung, A. Über das Vorhandensein einer photochemischen Extinction beim Assimilationsprocess. Ber. d. d. Bot. Ges., *36*, p. 122, 1918b.

Walther, O. A. Zur Temperaturabhängigkeit der Assimilation bei Vicia Faba. Flora *121*, N. F. *21*, p. 301, 1927.

Warburg, O. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. I. Biochem. Zeitschr., *100*, p. 230, 1919.

———— Idem, II. Biochem. Zeitschr., *103*, p. 188, 1920.

———— Theorie der Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften, *9*, p. 354, 1921.

————, und Uyesugi, T., Über die Blackmansche Reaction. Biochem. Zeitsch., *146*, p. 486, 1924.

Weigert, F. Über Absorptionsspectren und über eine einfache Methode zu ihrer quantitativen Bestimmung. Ber. d. d. Chem. Ges., *49*, I, p. 1497, 1916.

Willstätter, R. und Stoll, A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin, 1918.

Yabusoe, M. Über den Temperaturkoeffizienten der Kohlensäureassimilation. Biochem. Zeitschr., *152*, p. 498, 1924.

TABELLEN

TABEL 2. 13—2—'27.

Bepaling van de snelheid, waarmede CO_2 door caoutchouc wordt opgenomen en afgegeven, in cmM. per uur. Temp. 20° C.

A. 10 gr. rijwielbinnenband, 1 m.M. dik, oppervlak 2 × 86,5 qcM.

B. 19 gr. vacuumslang, wanddikte 4 m.M., totaal oppervlak 62 qcM.

1. Absorptie in 100 % CO_2.
2. Afgifte in 0 % CO_2.

Aantal minuten na het begin van de proef.	A		B	
	1	2	1	2
5	280	185	33	45
10	190	100	30	30
15	130	85	30	24
20	105	60	30	17
25	85	45	31	16
30	60	36	30	14
35	50	30	32	
40	40	24	31	
45	30	20	30	
50	20	16	29	
55	15	13	28	
60	9	9	27	
65	7	7	26	
70	5	6	26	
75	4	4	25	
80			24	
100			19	
120			16	

TABEL 3.

CO_2-gehalte (in 0,001 %) van lucht, in evenwicht met oplossingen van Na_2CO_3 en $NaHCO_3$ bij 30° C.

Na_2CO_3 in grammen p. L.	0,325		0,259		0,182		0,126	
$NaHCO_3$ in grammen p. L.	0,175		0,241		0,318		0,374	
	Datum	Analyses	Datum	Analyses	Datum	Analyses	Datum	Analyses
	29-8-'27	90	23-1-'28	203	23-1-'28	498	5-1-'28	1005
		92		202		497		1006
	30-8-'27	92		205		499		1005
		93		203		496		1004
	1-12-'27	86		211		496		1011
		90		208		497		1010
		90	10-2-'28	206		500		1007
	15-12-'27	85		209		496		1006
		89		202		496		1001
		92		200		495		1004
		92		196				
	5-1-'28	92		196				
		92		204				
		88		205				
		86		203				
		92		201				
		90						
Gemiddeld		90		204		497		1006
Berekend ± . . .		71		169		419		856

TABEL 5.

Gegevens omtrent de groeisnelheid, uit verschillende tabellen vereenigd.

Datum.	Uit tabel.	Temperatuur.	Licht-intensiteit.	Groei per uur in %.	Gemiddelde groei per uur in %.
21-1-'28	16	20° C	6,18	1,38	
15-1-'28	20	20° C	1,99	1,32	
17-2-'28	22	20° C	1,99	0,60	1,04
21-2-'28	23	20° C	1,99	0,68	
11-1-'28	6	20° C	1,00	1,22	
8-2-'28	18	12° C	6,18	0,50	0,42
11-2-'28	19	12° C	6,18	0,34	

TABEL 6. 11-1-'28.

IJking van de lichtsterkte der lampjes door assimilatiebepalingen. Temp. 20° C. Groeicorrectie berekend uit Nos. 2 en 8 (1,22 % per uur).

No.	Uur.	Lamp.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Assim.	Groeicorr. %	Verhouding licht-intensiteit.
					Analyses.	Gemidd.			
1	1.00	0	100	204	220 220	220			
2	2.20	A	„	„	144 141	142	78	0	1,00
3	3.35	B	„	„	133 133	133	87	1,5	1,10
4	5.10	C	„	„	139 136	138	82	3,5	1,02
5	6.40	D	„	„	138 140 138	139	81	5,5	0,99
6	10.25	E	„	„	127 127	127	93	10,0	1,09
7	11.35	F	„	„	134 136	135	85	11,5	0,98
8	12.45	A	„	„	132 133	132	88	13,0	1,00
9	2.05	Proj. lamp afst. 75 cM.	„	„	120 120	120	100	14,5	1,12

TABEL 7. (Fig. 12). 20-12-'27.

Invloed van de lichtintensiteit. Temp. 20° C.

Herleidingsfactor $\frac{100}{273}$

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groei corr. %	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	2.00	0	100	460	476 479	478	10			
2	3.45	1	„	„	401 404	403	9	76	0	28
3	5.15	1.99	„	„	326 328	327	7	154	1,5	56
4	9.00	3,08	„	„	264 264	264	6	218	5	76
5	10.55	4,18	„	„	222 221	222	5	261	7	89
6	12.30	6,18	„	„	187 185	186	4	298	9	*100*
7	2.15	13,2	„	„	171 172	171	3	314	10,5	104

TABEL 8. (Fig. 12). 23-12-'27.

Invloed van de lichtintensiteit. Temp. 20° C.

Herleidingsfactor $\frac{100}{142}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groeicorr. %	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	2.50	0	120	210	220 219	220	3			
2	4.20	1	„	„	187 186	187	2	41	0	29
3	5.35	1,99	„	„	154 152	153	2	81	1	57
4	12.35	3,08	„	„	129 131	130	1	110	8	71
5	1.55	4,18	„	„	106 104	105	1	140	9,5	91
6	3.15	6,18	„	„	93 89	91	1	157	11	*100*
7	4.40	13,2	„	„	82	82	1	168	12	106

TABEL 9. (Fig. 12). 13-1-'28.

Invloed van de lichtintensiteit. Temp. 20° C.

Herleidingsfactor $\frac{100}{227}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groeicorr. %	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	12.00	0	100	460	482 481 480	481	11			
2	3.00	1	„	„	411 413	412	10	70	0	31
3	4.30	1,99	„	„	349 343 347	348	8	136	1,5	59
4	6.10	6,18	„	„	251 252 252	252	6	234	3	*100*

TABEL 10. (Fig. 12). 21-12-'27.

Invloed van de lichtintensiteit. Temp. 20° C.

Oude voedingsbodem.

Herleidingsfactor $\frac{100}{170}$

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groeicorr. %	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	4.00	0	100	460	479 479	479	10			
2	5.55	1	„	„	409 409	409	9	71	0	42
3	7.45	1,99	„	„	360 360	360	8	121	2	70
4	9.30	3,19	„	„	324 326	325	7	157	3,5	89
5	11.50	4,18	„	„	317 315	316	7	166	6	92
6	1.20	6,18	„	„	299 299	299	7	183	7,5	*100*
7	2.50	13,2	„	„	289 287	288	7	194	9	105

TABEL 11. (Fig. 13). 24-1-'28.

Invloed van de temperatuur. Lichtintensiteit 6,18

Q_{10} van de respiratie aangenomen 1,8

Herleidingsfactor $\frac{100}{392}$.

No.	Uur.	Licht.	Temp.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Respiratie.		Corr. lek.	Assim.	Groeicorr. %	Assim. herleid.
						Analyses.	Gemidd.	Bepaald.	Berekend.				
1	11.40	0	11.95°	100	0	28 28	28	28		0			
2	1.40	6.18	„	„	497	285 287	286		28	6	233	0	59
3	3.50	„	16,0°	„	„	223 224	224		35	5	303	1	76
4	6.15	„	20,0°	„	„	133 133	133		45	3	406	3,5	*100*
5	7.30	„	23,9°	„	„	76 75	76		57	2	476	5	116

TABEL 12. (Fig. 13). 9-2-'28.

Invloed van de temperatuur. Lichtintensiteit 6,18

Herleidingsfactor $\frac{100}{411}$.

No.	Uur.	Licht.	Temp.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Respiratie.		Corr. lek.	Assim.	Groeicorr. %	Assim. herleid
						Analyses.	Gemidd.	Bepaald.	Berekend.				
1	12 30	0	12 °	100	0	35 36	36	37		1			
2	2.30	6,18	„	120	497	311 308	310		37	7	254	0	62
3	3.50	„	16 °	„	„	258 258	258		42	6	323	1	78
4	5.00	„	20 °	„	„	184 187 184	185		49	4	419	2	*100*
5	6.10	„	24 °	„	„	146 145	146		56	3	474	4	111
6	7.15	„	„	100	0	54 55	55	56		1			

TABEL 13. (Fig. 13). 27-1-'28.

Invloed van de temperatuur. Lichtintensiteit 1,0.

Herleidingsfactor $\frac{29}{105}$.

No.	Uur.	Licht.	Temp.	Snelheid lichtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groei corr. %	Assim. herleid.
						Analyses.	Gemidd.				
1	3.25	0	12 °	120	204	231 230	231	5			
2	4.40	1,0	„	„	„	139 139	139	3	112	0	31
3	5.50	„	20 °	„	„	151 151	151	3	106	1	*29*
4	7.00	0	„	„	„	240 236	238	5			

TABEL 14. (Fig. 13). 14-2-'28

Invloed van de temperatuur. Lichtintensiteit 1,0.

Herleidingsfactor $\frac{29}{82}$.

No.	Uur.	Licht.	Temp.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Corr. lek.	Assim.	Groei corr. %	Assim. herleid.
						Analyses.	Gemidd.				
1	1,40	0	12 °	100	0	33 31	32	0			
2	3,20	1,0	„	„	209	148 148	148	3	90	0	32
3	4,50	„	20 °	„	„	160 159	160	3	83	1,5	*29*
4	6,05	0	„	„	0	37 36	37	0			

TABEL 15. (Fig. 14). 18-1-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie. Temp. 20° C.
Lichtintensiteit 6,18.
Herleidingsfactor $\frac{100}{223}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Assim.	Groeicorr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	12.00	0	100	0	28 29	29				
2	1.35	6,18	150	204	76 74	75	223	0	77	*100*
3	4.45	„	100	„	23 23	23	210	3	25	91
4	6.05	„	110	„	30 27 32	30	220	4,5	32	94
5	7.15	„	50	„	12 11	12	125	5,5	13	53
6	10.20	„	80	„	18 17	18	178	9	20	73

TABEL 16. (Fig. 14). 21-1-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie. Temp. 20° C.
Lichtintensiteit 6,18.
Groeicorrectie berekend uit Nos. 3 en 6. (1,38 % per uur.)
Herleidingsfactor $\frac{100}{266}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
					analyses.	gemidd.				
1	1.15	0	100	0	35 35	35				
2	3.15	6,18	80	204	18 19	18	184	0	19	69
3	4.25	„	150	„	47 47	47	270	1,5	50	*100*
4	5.50	„	50	„	11 11	11	132	3,5	12	48
5	8.25	„	140	„	27 27	27	283	7	30	99
6	9.30	„	160	„	46 44	45	289	8,5	48	*100*

TABEL 17. (Fig. 14). 2-3-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie. Temp. 20° C.
Lichtintensiteit 6,18.
Herleidingsfactor $\frac{100}{127}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u. analyses.	CO_2 u. gemidd.	Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 concentr.	Assim. herleid.
1	11.30	0	100	0	29 29	29				
2	2.15	6,18	140	209	139 138	139	127	0	140	*100*
3	3.30	„	100	„	112 110	111	127	1	112	99
4	5.45	„	60	„	37 39	38	132	3,5	39	100
5	8.25	„	50	„	25 25	25	121	6	26	90
6	11.15	„	70	90	11 12	12	84	9	13	61

TABEL 18. (Fig. 14). 8-2-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.
Temp. 12° C. Lichtintensiteit 6,18.
Herleidingsfactor $\frac{61}{169}$.
Groeicorrectie berekend uit de Nos. 2 en 7. (0,50 % per uur.)

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u. analyses.	CO_2 u. gemidd.	Assim.	Groei corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
1	12.30	0	100	0	28 30	29				
2	2.30	6,18	120	204	88 86	87	169	0	89	*61*
3	4.00	„	80	„	30 28	29	169	1	31	60
4	5.40	„	70	„	20 19	20	158	1,5	22	56
5	8.15	„	50	„	11 10	11	126	3	12	44
6	10.15	„	60	„	13 13	13	144	4	14	50
7	1.00	„	120	„	80 80	80	178	5	82	*61*

TABEL 19. (Fig. 14). 11-2-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.

Temp. 12° C. Lichtintensiteit 6,18.

Herleidingsfactor $\frac{61}{160}$.

Groeicorrectie berekend uit de Nos. 2 en 7. (0,34 % per uur.)

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u. analyses.	CO_2 u. gemidd.	Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
1	2.50	0	100	0	19 19	19				
2	4.15	6,18	100	209	67 69	68	160	0	70	*61*
3	5.30	„	120	90	9 9	9	116	0,5	10	45
4	8.00	„	50	„	4 6	5	61	1	6	23
5	9.30	„	80	„	7 8	8	85	1,5	9	32
6	12.10	„	150	„	11 9 11	10	139	2,5	11	52
7	1.35	„	100	209	64 62	63	165	3	65	*61*

TABEL 20. (Fig. 14). 15-1-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.

Temp. 20° C. Lichtintensiteit 1,99.

Herleidingsfactor $\frac{57}{162}$.

Groeicorrectie berekend uit de Nos. 2 en 7 (1,32 % per uur.).

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
					analyses.	gemidd.				
1	1.00	0	100	0	36 34	35				
2	2.50	1,99	120	204	99 97	98	162	0	100	57
3	4.05	„	100	„	69 70	70	169	1,5	72	59
4	6.00	„	80	„	40 40	40	166	4	42	56
5	8.30	„	60	„	11 11	11	151	8	13	49
6	10.50	„	50	„	11 9	10	132	10	11	42
7	12.40	„	120	„	81 81	81	183	13	83	57

TABEL 21. (Fig. 14). 20-1-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.
Temp. 20° C. Lichtintensiteit 1,99.
Herleidingsfactor $\frac{57}{145}$.

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u. analyses.	CO_2 u. gemidd.	Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
1	12.10	0	100	0	30 31	31				
2	4.00	1,99	60	204	25 24	25	138	0	26	54
3	5.20	„	120	90	12 10 11 12	11	126	1,5	12	49
4	6.25	„	130	„	11 12	11	132	2,5	13	51
5	7.15	„	60	„	6 9 6 8	7	81	3,5	8	31
6	10.15	„	70	204	41 39	40	146	6	42	54
7	11.55	„	120	90	100 100	100	156	8	102	57

TABEL 22. (Fig. 14). 17-2-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.
Temp. 20° C. Lichtintensiteit 1,99.

Herleidingsfactor $\frac{57}{146}$.

Groeicorrectie berekend uit de Nos. 2 en 6 (0,60 % per uur).

No.	Uur.	Licht.	Snelheid luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u.		Assim.	Groeicorr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
					Analyses.	Gemidd.				
1	1.00	0	100	0	35 35	35				
2	4.40	1,99	120	209	117 117	117	146	0	118	57
3	6.30	„	80	„	74 75	75	142	1	76	55
4	9.00	„	55	„	28 29	29	134	2,5	30	51
5	11.—	„	50	„	19 20	20	130	3,5	21	49
6	12.40	„	120	„	112 110	111	153	5	113	57

TABEL 23. (Fig. 14). 21-2-'28.

Invloed van de CO_2-concentratie.
Temp. 20° C. Lichtintensiteit 1,99.

Herleidingsfactor $\frac{57}{95}$.

Groeicorrectie berekend uit de Nos. 2 en 7 (0,68 % per uur).

No.	Uur.	Licht.	Snelh. luchtstroom.	CO_2 i.	CO_2 u. analyses.	CO_2 u. gemidd.	Assim.	Groei-corr. %	Gecorr. CO_2 conc.	Assim. herleid.
1	2.50	0	100	0	35 34	35				
2	4.30	1,99	150	90	50 50	50	95	0	51	57
3	5.50	„	60	„	14 16	15	80	1	16	48
4	9.05	„	70	„	15 16	16	87	3	17	51
5	11.00	„	80	„	23 23	23	89	4,5	24	51
6	12.30	„	90	„	28 26	27	92	5,5	28	52
7	1.45	„	150	„	46 46	46	101	6,5	47	57

TABEL 25. 5-3-'28.

Spectrophotometrische bepaling van de concentratie van bladkleurstoffen in oplossingen 1 en 2, concentratieverhouding $\frac{C_1}{C_2} = 2$

λ in $\mu\mu$	Oplossing No.	$\frac{I}{I_0} \times 100$	$\varepsilon = \log. \frac{I_0}{I}$	$\frac{C_1}{C_2}$ berekend.
645	1	15,0	0,824	2,00
	2	38,8	0,411	
640	1	22,8	0,642	2,03
	2	48,2	0,317	
635	1	28,6	0,544	2,10
	2	55,0	0,260	
630	1	30,8	0,510	2,03
	2	56,0	0,252	
625	1	29,8	0,526	2,04
	2	55,2	0,258	
620	1	27,8	0,556	2,03
	2	53,2	0,274	
615	1	26,5	0,577	2,03
	2	52,0	0,284	
610	1	27,3	0,564	2,04
	2	53,0	0,276	
605	1	29,8	0,526	2,10
	2	56,2	0,250	
600	1	35,5	0,450	2,07
	2	62,0	0,218	
			Gemiddeld	2,05
			Fout $\pm$	2,5 %

TABEL 26. 8-3-'28.

Spectrophotometrische bepaling van de concentratie van bladkleurstoffen in oplossingen 3 en 4,

concentratieverhouding $\frac{C_3}{C_4} = 2$.

λ in $\mu\mu$	Oplossing No.	$\frac{I}{I_0} \times 100$	$\varepsilon = \log. \frac{I_0}{I}$	$\frac{C_3}{C_4}$ berekend.
650	3	11,3	0,949	2,02
	4	34,0	0,469	
645	3	17,7	0,753	2,04
	4	42,8	0,369	
640	3	23,6	0,627	2,13
	4	50,8	0,294	
635	3	30,8	0,511	2,10
	4	57,2	0,243	
630	3	34,8	0,458	2,09
	4	60,4	0,219	
6 5	3	34,7	0,460	2,07
	4	59,8	0,223	
620	3	33,8	0,470	2,08
	4	59,4	0,226	
			Gemiddeld	2,08
			Fout +	4 %

TABEL 27. 24-9-'27.

Spectrophotometrische bepaling van de concentratie van bladkleurstoffen in oplossingen 5 en 6,

concentratieverhouding $\frac{C_5}{C_6} = 1{,}5$.

λ in $\mu\mu$	Oplossing No.	$\frac{I}{I_0} \times 100$	$\varepsilon = \log. \frac{I_0}{I}$	$\frac{C_5}{C_6}$ berekend.
666	5	4,95	1,314	1,469
	6	13,00	0,895	
664	5	4,25	1,380	1,497
	6	12,20	0,922	
662	5	4,55	1,350	1,524
	6	13,25	0,886	
			Gemiddeld	1,497
			Fout —	0,2 %

TABEL 28.

Bepaling van het assimilatiegetal.

Temp. 20° C. Lichtintensiteit 6,18.
Chlorophyl opgelost in 25 ccM aceton 85 %.
Laagdikte d = 10 cM.

No.	Datum.	Assimilatie in cmM CO_2 p.u.	$\frac{I}{I_0} \times 100$ (λ 664—665)	$\varepsilon = \log.\frac{I_0}{I}$	m.gr. chlorophyl.	Assimilatie-getal.	Afwijking van het gemiddelde.
1	21-2-'28	191	5,19	1,785	0,0533	6,56	— 2,8 %
2	23-2-'28	130	16,37	0,786	0,0326	7,29	+ 8,0 %
3	23-2-'28	183	6,37	1,196	0,0496	6,75	± 0 %
4	28-2-'28	139	12,52	0,902	0,0374	6,81	+ 0,9 %
5	28-2-'28	161	7,57	1,121	0,0465	6,34	— 6,1 %
					Gemiddeld	6,75	± 3,6 %

TABEL 29. 5-3-'28.

Bepaling van het assimilatiequotient. Temp. 20° C.

No.	Licht	Snelh. lucht-stroom	CO_2 i.	CO_2 u.		O_2 u.	
				analyses.	gemidd.	analyses.	gemidd.
1	0	100	1006	1031		20560	
				1033	1028	20540	20549
				1021		20547	
2	6,18	„	„	553		21068	
				545	549	21077	21072
				CO_2 = 479		O_2 = 523	
				$\frac{O_2}{CO_2}$ = 1,09			

TABEL 30. 8-3-'28.

Bepaling van het assimilatiequotient. Temp. 20° C.

No.	Licht	Snelh. lucht-stroom	CO_2 i.	CO_2 u.		O_2 u.	
				analyses.	gemidd.	analyses.	gemidd.
1	0	100	1006	1037		20579	
				1034	1035	20560	20568
				1035		20565	
2	6,18	„	„	564		21100	
				555	559	21120	21105
				558		21096	
				CO_2 = 476		O_2 = 537	
				$\frac{O_2}{CO_2}$ = 1,13			

STELLINGEN.

I.

Wanneer de koolzuurconcentratie beperkende factor is, wordt de snelheid van de koolzuurassimilatie bij een groene plant steeds door een diffusieproces beheerscht.

II.

Wanneer de koolzuurdruk in de chloroplast meer dan 10^{-5} atm. is, heeft het chlorophyl in de levende plant zich bijna geheel aan koolzuur gebonden.

III.

Het chlorophyl in de levende plant is in een lipoïd opgelost en in een grenslaag polair geadsorbeerd volgens de theorie van Langmuir en Harkins.

IV.

Het feit, dat E. G. Pringsheim en F. Mainx voor de chemotaxis van Polytoma uvella Ehrb., bij homologe reeksen van verschillende stoffen met stijgend moleculairgewicht, een optimale werkzaamheid vinden bij een koolstofketen van vier atomen, moet volgens de optimumtheorie van Blackman verklaard worden uit een stijgende en een dalende kromme; de stijgende kromme stelt de toenemende oppervlakte-activiteit voor, de dalende kromme de afnemende permeabiliteit van het protoplasma voor stoffen met grooter moleculairgewicht.

Planta, Bd. I, 1926, p. 583.

V.

De aggregatietheorie van Hill geeft geen bevredigende verklaring van de S-vormige dissociatiekromme van haemoglobine.

VI.

De alles-of-niets-wet kan ook voor Vertebraten niet als algemeen geldig worden beschouwd.

VII.

Ten onrechte houdt Stomps de z.g. patanas op Ceylon voor tropische alpenweiden.

VIII.

Terecht neemt Versluys aan, dat binnen de orde der Selachii een sprongsgewijze verandering van het aantal kieuwbogen heeft plaatsgehad.

IX.

Terecht zoekt Loeb de zwellingsverschijnselen van gelatine te verklaren met behulp van een Donnan-evenwicht.