



Onderzoeken over de bioluminescentie der lichtbacteriën

<https://hdl.handle.net/1874/362711>

ONDERZOEKINGEN OVER DE
BIOLUMINESCENTIE DER
LICHTBACTERIËN

ONDERZOEKINGEN OVER DE BIOLUMINESCENTIE DER LICHTBACTERIËN

RECHTSGESCHIEDT

ONDERZOEKINGEN OVER DE BIOLUMINESCENTIE
DER LICHTBACTERIËN.

GERHART JOHANN MEIJER VAN DER BERG

THE UNIVERSITY OF UTAH LIBRARY

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT



1394 2846

Diss. Utrecht 1942

ONDERZOEKINGEN OVER DE BIOLUMINESCENTIE DER LICHTBACTERIËN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR MAGNIFICUS L. VAN VUUREN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTE-
REN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT
VAN DE SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP

MAANDAG 23 NOVEMBER 1942,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

GERRIT JOHANN MEINE VAN DER KERK
GEBOREN TE DIEREN

KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT

AAN MIJN OUDERS

AAN MIJN VROUW EN DOCHTERTJE

Bij de voltooiing van mijn proefschrift betuig ik U, Hooggeleeraren, Oud-Hooggeleeraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde te Utrecht mijn groote dank voor de wetenschappelijke vorming, welke ik aan deze Universiteit heb genoten.

In het bijzonder gaat daarbij mijn dank uit naar U, Hooggeleerde K ö g l, Hooggeschatte Promotor. Ik heb het steeds als een bijzonder voorrecht beschouwd mij onder Uwe leerlingen te mogen tellen. Hoewel dit onderzoek buiten Uw Laboratorium en niet onder Uwe directe leiding werd uitgevoerd, hebt Gij er van de aanvang af in toegestemd als mijn Promotor op te treden en mij bij het werk ook meermalen Uw steun verleend. Dat Gij, ook toen het onderzoek een meer biophysische richting insloeg, bereid waart Uwe toezegging gestand te doen, stemt mij tot groote erkentelijkheid.

Hooggeleerde M i l a t z, met groote vreugde denk ik terug aan de gastvrijheid en vriendschap, die ik in het Fysisch Laboratorium heb mogen onder vinden. Voor Uwe critische belangstelling voor de meer physische gedeelten van mijn proefschrift betuig ik U mijn oprechte dank.

Dankbaar gedenk ik de leiding, welke Gij, Hooggeleerde K l u y v e r, aanvankelijk tezamen met Professor Dr. L. S. O r n s t e i n, naderhand onder moeilijke omstandigheden alléén, aan het onderzoek hebt gegeven. Ik acht het een groot voorrecht, dat ik in de afgelopen jaren in zoo ruime mate van Uwe veelzijdige kennis heb mogen profiteeren. Zeer erkentelijk ben ik U voor de warme belangstelling, welke Gij voor het tot stand komen van dit proefschrift hebt getoond en voor de vele tijd, welke Gij hieraan ten koste hebt willen leggen.

Met groote weemoed gedenk ik het verscheiden van Professor O r n s t e i n op 20 Mei 1941.

Ik heb er naar gestreefd dit onderzoek, dat hij niet meer voltooid heeft mogen zien, doch dat nog mede onder zijn leiding werd aangevangen, in zijn geest voort te zetten en te beëindigen.

Dat het onderzoek tot een goed resultaat kon worden gebracht dank ik voor een belangrijk deel aan de groote medewerking, welke Mej. A. v a n d e r B u r g, phil. docta, in het bijzonder wat betreft de uitwerking der physische meetmethodieken, hierbij heeft willen verleenen. Maar ook de goede onderlinge verstandhouding en de geest van samenwerking, welke in de Biophysische Researchgroep in zijn geheel steeds hebben geheerscht, zijn voor het welslagen van het werk van veel beteekenis geweest. Ik stel er dan ook prijs op hier de namen te vermelden van hen, die in het tijdvak, waarin ik bij de Biophysische Researchgroep werkzaam was, hiervan eveneens gedurende kortere of langere tijd deel uitmaakten: Dr. E. C. W a s s i n k, Mevr. Dr. L. E. Æ. W a s s i n k- v a n L u m m e l, Dr. Ir. K. L. v a n S c h o u w e n b u r g, Dr. Ir. P. B. R o t-

tier, biologen, en Mej. A. van der Burg, Dr. E. Katz, Dr. F. Dorre-
stein, Dr. J. A. H. Kersten en K. H. J. Bokhove, physici.

Voorts verzoek ik Mej. E. G. Pannebakker, analyste, en het per-
soneel van het Physisch Laboratorium, van wie ik steeds de meest aangename
medewerking mocht ondervinden, mijn dank te willen aanvaarden voor de in
zoo ruime mate verleende technische hulp.

Tenslotte wil ik niet nalaten aan de Directie van de Koninklijke Industriële
Maatschappij v.h. Noury en Van der Lande N.V. mijn erkentelijkheid
te betuigen voor de faciliteiten, mij bij de voorbereiding van dit proefschrift
verleend.

INHOUD

	pag.
INLEIDING.	1
 HOOFDSTUK I.	
INLEIDENDE OPMERKINGEN OVER HET VERSCHIJNSEL DER BIOLUMINESCENTIE.	3
 HOOFDSTUK II.	
DE BESTAANDE INZICHTEN AANGAANDE DE AARD VAN HET BIOLUMINESCENTIE-PROCES EN VAN DE DAARBIJ BETROKKEN MOLECULEN.	
§ 1. Bioluminescentie als enzymatisch proces	5
§ 2. Het chemisch onderzoek en de eigenschappen van luciferase en luciferine	9
 HOOFDSTUK III.	
HET MECHANISME VAN DE LICHTGEVENDE REACTIE.	
§ 1. De primair door Harvey ontwikkelde voorstelling	16
§ 2. Recente onderzoekingen over het mechanisme van de licht- gevende reactie	18
§ 3. Critische beschouwing van de tot dusver gegeven reactie- schema's, in het bijzonder wat betreft de vraag naar het licht- emitterende molecule	21
 HOOFDSTUK IV.	
HET VRAAGSTUK VAN DE AFSCHIEDING VAN HET LICHT- GEVEND SYSTEEM UIT DE BACTERIECEL.	
§ 1. De in de litteratuur beschreven pogingen	24
§ 2. Eigen proeven tot het verkrijgen van lichtende preparaten uit lichtbacteriën	25
§ 3. Verdere mogelijkheden en proeven	28
§ 4. Slotbeschouwing	30
 HOOFDSTUK V.	
BIOLUMINESCENTIE EN LACTOFLAVINE.	
§ 1. De beteekenis van lactoflavine voor de lichtemissie.	32
§ 2. De isoleering van lactoflavine als kristallijn lactoflavine-te- traacetaat uit <i>Ph. phosphoreum</i>	35
§ 3. Conclusie en mogelijkheid tot verder onderzoek	41

HOOFDSTUK VI.

DE INVLOED VAN UITWENDIGE BESTRALING OP HET
LICHTEND VERMOGEN VAN LICHTGEVENDE ORGANISMEN.

§ 1. Inleiding	43
§ 2. Bespreking van de principieele mogelijkheid om uit het bestralingseffect het absorptiespectrum van het lichtabsorbeerende molecule te bepalen	45
§ 3. Bespreking van enkele overeenkomstige onderzoekingen uit de litteratuur	48

HOOFDSTUK VII.

DE SAMENHANG TUSSCHEN DE EXPERIMENTEEL VAST
TE STELLEN PHOTOCHEMISCHE WERKING EN DE ABSORP-
TIECOEFFICIENT VAN HET RECEPTORMOLECULE

51

HOOFDSTUK VIII.

VOORLOOPIGE PROEFNEMINGEN.

§ 1. Methode.	55
§ 2. De bestralingsproeven	58
§ 3. De intensiteitsmetingen en de berekening van de specifieke photochemische werkingen	64
§ 4. Pogingen tot uitbreiding der proefnemingen over meer golflengten	68

HOOFDSTUK IX.

DE DEFINITIEVE METHODE TER BEPALING VAN HET PHO-
TOCHEMISCHE INACTIVEERINGSSPECTRUM.

§ 1. De grondslagen der methode	70
§ 2. De gebruikte bacteriecultures	71
§ 3. De bestraling van de bacteriecultures	75
§ 4. Het bepalen van de intensiteit van het bacterieelicht voor en na de bestraling en de berekening van de photochemische werking.	80
§ 5. De meting van de spectrale energieverdeeling in het op de bacteriecultuur geworpen spectrum; berekening van de specifieke photochemische werking.	87
§ 6. Onderzoek naar de invloed van de lichtverstrooiende werking der gebruikte plaatcultures op de verrichte metingen	92

HOOFDSTUK X.

HET PHOTOCHEMISCHE INACTIVEERINGSSPECTRUM VAN
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM.

§ 1. Bestralingsproef met de kwartsspectograaf onder toepassing van intensiteitsvariatie.	94
---	----

	pag.
§ 2. Bestralingsproeven met de kwartsspectrograaf onder toepassing van tijdsvariatie	98
§ 3. Bestralingsproeven met de glasspectrograaf	102
§ 4. Samenvatting van de verkregen uitkomsten	107

HOOFDSTUK XI.

VERDERE BESTRALINGSPROEVEN MET *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

§ 1. Het verloop van de lichtintensiteit na afloop der bestraling (de herstelreactie)	110
§ 2. Het quantitative verloop van de herstelreactie	113
§ 3. Nadere beschouwing van de formuleering der photochemische werking in verband met de herstelreactie	117
§ 4. De betekenis van zuurstof voor de photochemische reactie	118

HOOFDSTUK XII.

BESTRALINGSPROEVEN MET *PHOTOBACTERIUM SPLENDIDUM* EN *PHOTOBACTERIUM FISCHERI*.

121

HOOFDSTUK XIII.

EENIGE OPMERKINGEN OVER DE MOLECULAIRE ABSORPTIE-COEFFICIENT VAN DE PHOTO-GEVOELIGE STOF EN OVER HET QUANTENRENDEMENT VAN DE PHOTOCHEMISCHE REACTIE BIJ BESTRALING VAN *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

126

HOOFDSTUK XIV.

NADERE INTERPRETATIE VAN DE VERKREGEN RESULTATEN.

§ 1. Is het bestralingseffect aan een sensibilisatorwerking toe te schrijven?	129
§ 2. Discussie leidende tot een nadere karakteriseering van het photo-gevoelige molecule	133
§ 3. Hypothese aangaande de chemische structuur van dehydro-luciferine en van luciferine	136

SUMMARY	144
ZUSAMMENFASSUNG	150
LITTERATUUROPGAVE	156

INLEIDING.

Meer dan een halve eeuw is thans verlopen sinds het tijdstip, waarop de Fransche physioloog R a p h a ë l D u b o i s door een fundamenteel belangrijke proefneming de aard van het bioluminescentie-proces vaststelde. Doordat hij het bewijs kon leveren, dat de lichtproductie in sommige gevallen ook buiten het levende organisme — d.w.z. met behulp van daaraan ontleende praeparaten — kon verlopen, kwam vast te staan, dat de bioluminescentie in wezen een chemoluminescentie is.

Ondanks het groote aantal onderzoeken, dat hiermede werd ingeluid, is de vraag naar het chemisme van het bioluminescentie-proces evenwel nog allerm minst volledig tot oplossing gebracht.

De Biophysische Researchgroep Utrecht-Delft, welke in 1935 onder leiding van Prof. Dr. L. S. O r n s t e i n en Prof. Dr. A. J. K l u y v e r hare werkzaamheden aanving, heeft eveneens gemeend o.m. het vraagstuk van de stralings-emissie door de levende cel ter hand te moeten nemen. De indrukwekkende luminescentie der lichtbacteriën scheen haar hiervoor een bij uitstek gunstig studie-object op te leveren.

Toen schrijver van dit proefschrift tegen het einde van 1938 in de groep werd opgenomen, kreeg hij tot taak te trachten het vraagstuk dezer luminescentie langs meer direct chemische weg aan te vatten. Van de aanvang af was het echter duidelijk, dat hieraan groote moeilijkheden waren verbonden, in zooverre dat de rechtstreeksche isoleering van componenten van het lichtgevend systeem uit lichtbacteriën nauwelijks uitvoerbaar schijnt, zoo lang men er niet in is geslaagd het lichtemissie-proces dezer bacteriën ook extracellulair te doen verlopen. Hernieuwde pogingen om dit te bereiken, waren dus in de eerste plaats aangewezen.

Op grond van de resultaten van E y m e r s en v a n S c h o u w e n b u r g (26, 28) scheen voorts een systematisch onderzoek naar de aard der fluoresceerende bestanddeelen der lichtbacteriën alsmede naar de beteekenis van lacto-flavine voor de lichtemissie gerechtvaardigd te zijn. Als onderdeel van dit programma werd o.m. besloten tot de isoleering van het in de bacteriën voorkomende flavine, waarvoor evenwel moest worden vastgesteld, dat dit identiek is met het in de levende natuur zoo algemeen verspreide lacto-flavine. Hoewel het overige, in samenwerking met eenige andere groepsleden, ondernomen onderzoek in deze richting wel tot eenige van belang zijnde resultaten leidde, openden deze ten aanzien van het bioluminescentie-vraagstuk geen nieuwe perspectieven. Om deze reden zijn de bij dit onderzoek verkregen uitkomsten in dit proefschrift buiten beschouwing gebleven; zij zullen te zijner tijd elders worden gepubliceerd.

Inmiddels had zich evenwel een nieuw gezichtspunt voorgedaan, dat de mogelijkheid scheen te openen langs indirecte weg iets te leeren kennen aangaande de chemische aard van één der componenten van het lichtemitterend systeem der lichtbacteriën. Door de groepsleden Mej. A. van der Burg en Dr. Ir. K. L. van Schouwenburg was namelijk in 1939 terloops de waarneming gedaan, dat uitwendige bestraling een doovend effect heeft op de lichtemissie der bacteriën en tevens, dat dit effect duidelijk afhankelijk is van de kleur van het ingestraalde licht. In beginsel lag hierin de mogelijkheid opgesloten te komen tot de vaststelling van het absorptiespectrum van een photo-gevoelige component van het lichtemitterend systeem.

Het grootste deel van dit proefschrift is nu gewijd aan een verslag over het in deze richting ingestelde onderzoek, dat dus gekenmerkt is door de zeker opmerkelijke omstandigheid, dat daarin de twee hoofdproblemen der radiobiologie, namelijk de emissie van straling door en de invloed van bestraling op levende materie, gelijktijdig aan éénzelfde organisme zijn bestudeerd.

HOOFDSTUK I.

INLEIDENDE OPMERKINGEN OVER HET VERSCHIJNSEL DER BIOLUMINESCENTIE.

Het verschijnsel, dat sommige levende wezens in staat zijn voor het menschelijk oog waarneembare straling uit te zenden, is reeds van oudsher bekend in landen waar vuurvliegen en glimwormen voorkomen. De ontdekking, dat ook het lichten van de zee, van halfvergaan hout, van doode visch en van vleesch aan levende wezens moet worden toegeschreven, is van veel latere datum en valt ongeveer samen met de vervolmaking van het microscoop.

Bioluminescentie is minder zeldzaam dan men aanvankelijk geneigd is te denken; speciaal in de warmere landen wordt het veelvuldig waargenomen. H a r v e y geeft in zijn monografie „The Nature of Animal Light” een overzicht van de lichtgevende organismen uit het planten- en dierenrijk, waarbij het treft, dat in het dierenrijk het verschijnsel het meest en het grilligst is verbreid.

H a r v e y typeert het voorkomen van lichtende vormen in de natuur als volgt ¹⁾: „Apparently there is no rhyme or reason in the distribution of „luminescence throughout the plant or animal kingdom. It is as if the various „groups had been written on a blackboard and a handful of sand cast over „the names. Where each grain of sand strikes, a luminous species appears. The „Cœlenterates ²⁾ have received most sand.”

Bij de planten beperkt zich het voorkomen van lichtende soorten tot enkele lagere vormen, alle behorende tot de klassen van de schimmels en de bacteriën.

Bij de schimmels komen vrijwel uitsluitend onder de plaatzwammen lichtende soorten voor. De bekendste zijn wel *Armillaria mellea*, welke zwam veelal verantwoordelijk is voor het lichten van hout, *Clitocybe olearia* en *Mycena polygramma*.

De lichtende bacteriën zijn vrijwel alle zoutwater- (of tenminste brakwater-) vormen. De meest bekende soorten zijn *Photobacterium phosphoreum*, *Ph. Fischeri*, *Ph. splendidum* en de als *Vibrio S o n n e n s c h e i n* beschreven zoetwatervorm.

Bij de tusschen de planten en de dieren in staande Dinoflagellaten komen lichtende Peridineeën voor.

In de dierenwereld treft men zeer veel lichtende vormen aan, echter niet bij hogere dieren dan de visschen. De volgende hoofdvormen en klassen tellen lichtende vertegenwoordigers:

¹⁾ loco cit. blz. 11.

²⁾ = holtedieren.

De Protozoën (oerdieren), o.a. *Noctiluca miliaris* (de zeevonk), welke in onze streken de voornaamste bewerker van het lichten der zee is.

De Coelenteraten (holtedieren).

De Echinodermen (stekelhuidige dieren).

De Mollusken (weekdieren), o.a. de lichtende boormossel *Pholas dactylus*.

De Crustaceaeën (schaaldieren); hieronder worden zeer veel lichtende vormen aangetroffen, waaronder de meest bekende en best bestudeerde vorm, het lichtgevende kreeftje *Cypridina hilgendorffii*.

De Myriapoden (duizendpooten).

De Insecten; ook hieronder komen betrekkelijk veel lichtende vormen voor, o.a. de vuurvliegen (*Pyrophorus*, *Lampyrus*, *Photinus* en *Photuris*).

De Visschen; alleen onder de haaien en de beenvisschen. Bij de visschen komen veel lichtende vormen voor die niet zelf lichten, doch hun lichtend vermogen danken aan symbiontisch aanwezige lichtbacteriën.

Bij de schimmels en de bacteriën is, voor zoover men heeft kunnen nagaan, het lichtend vermogen diffuus over de geheele cel verdeeld, terwijl het licht continu wordt uitgezonden. Men is er bij de plantaardige organismen nog nimmer in geslaagd het lichtemitterend systeem van de celstructuur te scheiden.

Bij de lichtgevende organismen in het dierenrijk zijn de photogene cellen doorgaans slechts op bepaalde plaatsen van het lichaam vereenigd tot lichtgevende organen en treedt bovendien het lichten dikwijls eerst na voorafgaande prikkeling, dus discontinu, op (bijv. bij de vuurvliegen). Bij enkele dieren is de lichtproductie niet gebonden aan de celstructuur, doch vindt excretie van het luminesceerend systeem plaats.

HOOFDSTUK II.

DE BESTAANDE INZICHTEN AANGAANDE DE AARD VAN HET BIOLUMINESCENTIE-PROCES EN VAN DE DAARBIJ BETROKKEN MOLECULEN.

De vraag naar het chemisme van het bioluminescentie-proces is, ondanks ruim vijftig jaren onderzoek, tot dusverre niet tot oplossing gebracht. Eensdeels vindt dit ongetwijfeld zijn oorzaak in de moeilijkheid om een voldoende hoeveelheid voor chemisch onderzoek geschikt uitgangsmateriaal ter beschikking te krijgen. Voorts is ook de instabiliteit *in vitro* van de stoffen, welke bij de lichtemissie zijn betrokken, mede oorzaak van het betrekkelijk geringe succes, dat het chemisch onderzoek tot dusverre heeft opgeleverd.

De eenige groep van lichtgevende organismen, welke men zich in betrekkelijk groote hoeveelheden kan verschaffen, vormen de lichtbacteriën. Als uitgangsmateriaal voor het chemisch onderzoek naar de aard van de moleculen, welke bij het bioluminescentie-proces zijn betrokken, zijn deze echter weinig geschikt, aangezien alle pogingen om het lichtgevend proces te scheiden van de bacteriecel — een *conditio sine qua non* voor iedere rechtstreeksche studie van het chemisme van het luminescentie-proces — tot dusverre zijn mislukt.

Voor de bestudeering van de plaats van het lichtgevend proces in het celmetabolisme en voor het op indirecte wijze verkrijgen van een nader inzicht in het verloop van de lichtemitterende reactie vormen lichtbacteriën daarentegen een zeer bruikbaar proefobject.

Gezien het feit, dat de tot dusverre verkregen ervaringen er op wijzen, dat in alle lichtgevende organismen het lichtgevend systeem uit overeenkomstige bestanddeelen is opgebouwd, lijkt het ons minder gewenscht de bespreking van het chemisme van het bioluminescentie-proces te splitsen in twee afzonderlijke gedeelten, waarvan het ééne betrekking zou hebben op extracellulaire en het andere op intracellulaire luminescentie. Wij zien des te gereeder van deze splitsing af, omdat over en weer de resultaten van de bestudeering der extracellulaire en der intracellulaire luminescentie elkaar sterk hebben beïnvloed.

§ 1. Bioluminescentie als enzymatisch proces.

In 1667 toonde Boyle (12) aan, dat voor het optreden van bioluminescentie de aanwezigheid van lucht noodzakelijk is. Nadat de samenstelling van de lucht was bekend geworden, bleek het de zuurstof te zijn, die een essentiële rol in het bioluminescentie-proces speelt (zie o.a. Harvey (52)).

Een tweede belangrijke ontdekking, eveneens van oude datum, was de

waarneming van de Reaumur (100) in 1723, dat het door een bepaalde mollusk afgescheiden lichtgevende slijm bij snel indrogen ophield met lichten, doch dat het lichtend vermogen na bevochtiging met water weer terugkeerde. Hetzelfde toonde Spallanzani (109) in 1794 aan voor een lichtende kwal.

Na deze twee fundamenteele ontdekkingen: de noodzakelijkheid van lucht (zuurstof) en van water voor het optreden van de bioluminescentie, duurde het circa 150 jaar alvorens men weer een vondst deed, welke voor het begrijpen van het bioluminescentie-proces van beteekenis was.

In 1885 namelijk verrichtte Dubois (20) een uiterst belangrijke proef, waardoor hij het enzymatisch karakter van het bioluminescentie-proces rechtstreeks kon aantonen. Hij bracht het lichtgevende orgaan van de vuurvlieg *Pyrophorus noctilucus* in heet water, het licht doofde tengevolge hiervan onmiddellijk uit; hierna werd het verkregen extract tot op kamertemperatuur afgekoeld. Vervolgens wreef hij een tweede lichtgevend orgaan in koud water fijn, waarbij het lichten langzamerhand in intensiteit afnam en tenslotte geheel ophield. Mengde hij nu tenslotte de twee bovengenoemde orgaanextracten, dan verkreeg hij opnieuw licht. Hetzelfde experiment voerde hij uit met het lichtgevend orgaan van de mossel *Pholas dactylus*, eveneens met positief resultaat (21).

In 1887 (22) gaf Dubois een verklaring van de waargenomen verschijnselen, die tot op de huidige dag ongeschokt stand heeft kunnen houden. Volgens Dubois bevindt zich in het heet water-extract een thermostabiele stof, door hem *luciferine* genoemd, die onder lichtemissie kan worden geoxydeerd door tusschenkomst van een enzym *luciferase*, dat thermolabiel is. De luciferase bevindt zich, tezamen met luciferine in het koud water-extract; het luciferine daarin wordt onder lichtemissie geoxydeerd, terwijl de luciferase in actieve vorm overblijft. Door extractie met heet water wordt de luciferase geïnactiveerd en blijft daarentegen het luciferine onaangetast. Bij het mengen van de twee extracten treden luciferine en luciferase in actieve vorm samen met zuurstof, hetgeen oxydatie van het luciferine onder lichtemissie tengevolge heeft. Volgens Dubois katalyseert dus het enzym luciferase de oxydatie van luciferine door moleculaire zuurstof; deze reactie vindt plaats onder lichtemissie.

Deze klassieke proeven van Dubois werden nadien met vrijwel alle lichtende organismen herhaald, echter slechts in betrekkelijk weinig gevallen met positief resultaat.

Behalve met de vuurvlieg *Pyrophorus noctilucus* en de mossel *Pholas dactylus*, gelukte de luciferine-luciferase proef nog met andere vuurvliegen (40), met het schaaldier *Cypridina hilgendorffii* (43), met de worm *Odontosyllis* (47) en met de visch *Malacocephalus* (61). Van de in totaal dertig à veertig lichtgevende dieren, welke door Harvey in dit opzicht werden onderzocht, gelukte het slechts voor de bovengenoemde het enzymatisch karakter van het lichtgevend proces direct aan te toonen (47, 53).

De lichtende plantaardige organismen — bacteriën en schimmels — hebben tot dusverre aan alle pogingen er lichtgevende celvrije preparaten uit te ver-

krijgen weerstand geboden, hoewel men zich speciaal wat de lichtbacteriën betreft zeer veel moeite heeft gegeven. In hoofdstuk IV komen wij nader op de in deze richting gedane onderzoeken terug. Bij de lichtbacteriën ontbreekt dus het directe bewijs voor het enzymatisch karakter van het lichtgevend proces. Dit neemt niet weg dat men, als resultaat van het aan de lichtbacteriën verrichte onderzoek, toch algemeen aanneemt, dat het bioluminescentie-proces in lichtbacteriën volkomen vergelijkbaar is met dat in organismen, waarbij de luminescentie zich ook buiten de cel kan afspelen.

Een der eerste onderzoeken, welke in dit opzicht duidelijke aanwijzingen gaven, was het onderzoek van Gerretsen (35), waarin deze o.a. de invloed van bestraling met ultraviolet licht op lichtbacteriën naging.

Gerretsen onderwierp *Ph. phosphoreum* aan de inwerking van ultraviolette straling (van een kwiklamp) en toonde aan, dat door een bestraling van een pas geënte gelatinecultuur van *Ph. phosphoreum* gedurende slechts twee minuten (op bepaalde afstand van de lamp) de ontwikkeling van koloniën geheel werd voorkomen. Blijkbaar hadden tengevolge van de bestraling alle aanvankelijk aanwezige lichtbacteriën hun reproductie-vermogen verloren.

Bij bestraling gedurende twintig minuten van een goed gegroeide en goed lichtende plaatcultuur van *Ph. phosphoreum* (op dezelfde afstand van de lamp als bij de eerste proef) bleek, dat na afloop der bestraling de cultuur in geen enkel opzicht in lichtintensiteit was gedaald. Slechts langzamerhand nam de lichtintensiteit van het bestraalde cultuurgedeelte af, waarbij na zes à acht uur volledige uitdooving optrad. Naastgelegen onbestraalde cultuurgedeelten zonden dan nog een helder licht uit.

Uit de vernietiging van het reproductie-vermogen na een bestralingstijd van twee minuten eenerzijds en de klaarblijkelijke ongevoeligheid van de lichtfunctie zelfs voor een bestralingstijd van twintig minuten anderzijds, concludeerde Gerretsen, dat men in de bestraling met ultra-violet licht een middel bezit, om bij volledig behoud van de lichtfunctie de lichtbacteriën van hun reproductie-vermogen te berooven. Hij toonde tevens aan, dat deze werking slechts optreedt met straling van zeer korte golflengte; glas, mica en zelfs een gelatinehuidje van 0.1 mm dikte hielden de actieve straling geheel tegen.

Door op de beschreven wijze een scheiding te bewerkstelligen tusschen het reproductie-vermogen en het lichtgevend vermogen en door aan te toonen, dat na de bestraling de lichtfunctie dezelfde gevoeligheid bezit voor temperatuurveranderingen als daarvoor, maakte hij het enzymatisch karakter van het lichtproces in de lichtbacteriën waarschijnlijk en wel concludeerde hij

- 1e dat het ontstaan van een „Leuchtstoff” in de bacteriecel op een enzymatisch proces berust;
- 2e dat de oxydatie van deze „Leuchtstoff” eveneens geschiedt onder invloed van een enzym (een oxydase).

Latere onderzoeken over het lichtemitterend proces in lichtbacteriën hebben geleid tot een nadere aanduiding van de plaats van dit proces temidden der andere enzymatische celprocessen en hebben tevens bijgedragen tot verdieping van ons inzicht aangaande het mechanisme van de lichtgevende reactie. De bespreking hiervan stellen wij echter uit tot hoofdstuk III.

Over de specificiteit van luciferine en luciferase lopen in de litteratuur de meeningen nogal uiteen. Dubois (21) geeft voor *Pholas dactylus* op,

dat het hieruit bereide luciferine-preparaat niet alleen licht geeft met *Pholas-luciferase*, doch tevens met koud water-extracten en bloed uit verschillende niet-lichtende organismen. Bovendien vond hij, dat *Pholas-luciferine* door verschillende anorganische oxydantia onder lichtemissie kan worden geöxydeerd.

Geheel afwijkend hiervan vindt Harve y (42, 53), dat *Cypridina-luciferine* slechts door tusschenkomst van *Cypridina-luciferase* onder lichtemissie kan worden geöxydeerd. *Cypridina-luciferine* en -luciferase zijn dus zeer specifiek op elkaar ingesteld. Ook waarnemingen van Harve y aan andere lichtgevende organismen wijzen in de richting van een groote specificiteit.

Hoezeer wij thans ook gewend zijn juist bij enzymreacties een hooge specificiteit aan te treffen, toch trekken deze waarnemingen de aandacht, doordat men geneigd is aan te nemen, dat de (laag-moleculaire) luciferinen van alle lichtgevende organismen zoo al niet gelijk, dan toch zeker zeer nauw verwant zullen zijn, zoodat men in deze eerder quantitatieve dan kwalitatieve verschillen zou verwachten.

Intusschen gelukte het Harve y bij zeer verwante dieren met de luciferine- en de luciferase-preparaten bij combinatie over en weer licht te krijgen (42). Hierbij deed hij de merkwaardige ontdekking, dat in zoo'n geval de kleur van het uitgezonden licht karakteristiek is voor het organisme, dat de luciferase heeft geleverd. Zoo vond hij bij combinatie van de luciferinen en de luciferasen uit de roodachtig lichtende vuurvlieg *Photinus* en de geelachtig lichtende vuurvlieg *Photuris*:

Photinus-luciferine $\times$ *Photinus-luciferase* $\rightarrow$ roodachtig licht.

Photinus-luciferine $\times$ *Photuris-luciferase* $\rightarrow$ geelachtig licht.

Photuris-luciferine $\times$ *Photuris-luciferase* $\rightarrow$ geelachtig licht.

Photuris-luciferine $\times$ *Photinus-luciferase* $\rightarrow$ roodachtig licht.

In 1924 (49) voerde Harve y dezelfde proef uit met twee nauw verwante lichtende kreeftjes (*Cypridina* en *Cypridina*) met overeenkomstig resultaat.

Aangezien het waarnemen van kleurverschillen bij kleine lichtintensiteiten zeer moeilijk is en onder deze omstandigheden intensiteitsverschillen op het oog de indruk kunnen wekken van kleurverschillen (Purkinje-effect), heeft Harve y zijn proeven met grootere luciferase-concentraties herhaald. Ook in dit geval vond hij dezelfde kleurverschillen, zoodat hij concludeerde, dat het waargenomen verschijnsel reëel was.

Hoewel voor een juist inzicht inzake de vraag naar de specificiteit der uit verschillende organismen verkregen luciferinen en luciferasen een nieuw onderzoek zeker gewenscht is, lijkt het noodzakelijk op grond van de thans ter beschikking staande gegevens onderscheid te maken tusschen de luciferinen en luciferasen van verschillende herkomst. Op voorstel van Harve y plaatst men voor het betreffende luciferine- of luciferase-preparaat de naam van het organisme waaruit het is verkregen. Indien wij evenwel in de hieronder volgende uiteenzetting spreken over luciferine en luciferase zonder meer, bedoelen wij hiermede steeds *Cypridina-luciferine* en *Cypridina-luciferase*, omdat het

chemisch onderzoek naar de aard van het luminescentie-proces en van de moleculen, welke erbij zijn betrokken, vrijwel uitsluitend is verricht aan het lichtende Japansche zeekreeftje *Cypridina hilgendorfi*.

Zooals reeds is opgemerkt, heeft H a r v e y juist bij *Cypridina*-luciferine en -luciferase een hooge mate van specificiteit gevonden. Aangezien wij geen ander luciferase-preparaat hadden dan dat, afkomstig van *Cypridina*, kon de specificiteit ten opzichte van luciferase niet worden geverifieerd. Wel echter kunnen wij de opgave van H a r v e y bevestigen, dat de oxydatie van luciferine onder lichtemissie uitsluitend langs enzymatische weg is te realiseeren. Wij hebben namelijk met geen enkel der gebruikelijke anorganische oxydatie-middelen, hetzij in neutraal, hetzij in alkalisch milieu, luciferine onder licht-emissie kunnen oxydeeren.

§ 2. Het chemisch onderzoek en de eigenschappen van luciferase en luciferine.

Van de twee componenten van het lichtgevend systeem — de luciferase en het luciferine — is luciferine verreweg het beste bestudeerd. Dit behoeft geen verwondering te wekken, aangezien weldra bleek, dat luciferase eiwit-natuur bezit, terwijl luciferine als dialyseerbare stof tot de laag-moleculaire verbindingen moest worden gerekend en een onderzoek hiervan dus chemisch de beste kansen bood. Men heeft zich dan ook voornamelijk toegelegd op de isoleering in zuivere toestand van luciferine en het vaststellen van zijn chemische structuur, waarbij echter tot op heden noch het één, noch het ander volledig met succes is bekroond.

a. Luciferase.

Luciferase, het enzym dat de oxydatie van de laag-moleculaire stof luciferine door moleculaire zuurstof katalyseert, wordt door verwarming gedenatureerd, dialyseert niet, is oplosbaar in water, verdunde zout-, zuur- en alkali-oplossingen, is onoplosbaar in organische oplosmiddelen en wordt door trypsine aangetast. Het bezit dus geheel het karakter van een eiwit en als zoodanig van een albumine.

D u b o i s rekende luciferase enzymatisch tot de oxydasen, omdat luciferase-preparaten in staat zijn de voor oxydasen karakteristieke oxydaties van guajac, p-phenyleendiamine en andere, uit te voeren. Terecht merkte H a r v e y echter op, dat de met onzuivere luciferase-preparaten verrichte proeven van D u b o i s geenszins bewijzend zijn: oxydasen komen zeer algemeen voor en hun aanwezigheid in een onzuiver luciferase-preparaat moet niet uitgesloten worden geacht.

Ook systematisch lijkt ons de kenschetsing van luciferase als een oxydase, welke overigens algemeen wordt aanvaard (2, 11, 95), niet juist. Weliswaar vormt moleculaire zuurstof de specifieke acceptor en is geen enkel ander oxydatiemiddel in staat de oxydatie van luciferine bij aanwezigheid van luciferase onder lichtemissie te doen verlopen, doch anderzijds mist luciferase de voor oxydasen karakteristieke gevoeligheid voor sporen HCN. De lichtreactie is n.l. niet gevoelig voor HCN-concentraties, die sterk remmend werken op de ademhaling. Hieruit kan met vrij groote zekerheid worden afgeleid, dat het luciferase-molecule géén zwaar metaal bevat (zooals b.v.

voor het fermenthaemine van Warburg, de polyphenoloxydase van Kubowitz en andere oxydasen is aangetoond). In het door Oppenheimer (95) gegeven systeem van enzym-classificering behoort luciferase dan te worden geplaatst tusschen de dehydrogenasen en de oxydasen in de klasse der oxhydrasen, waarvan de gemeenschappelijke kenmerken zijn: substraat-specifieke, dehydrogeneerende enzymen, welke waarschijnlijk metaalvrij zijn (zij zijn ongevoelig voor HCN, CO en dergelijke metaalgiften); de acceptorspecificiteit bepaalt zich uitsluitend of vrijwel uitsluitend tot moleculaire zuurstof.

Met de zuivering van luciferase heeft men tot dusverre slechts geringe vorderingen gemaakt. Een ruwe luciferase-oplossing verkrijgt men door *Cypridina*-poeder met koud water te extraheeren en nadat het extract is uitgelicht de onoplosbare bestanddeelen door filtratie of centrifugatie af te scheiden. Voor de verdere zuivering van deze ruwe enzym-oplossingen zijn de volgende methoden toegepast:

1. Harvey (45) precipiteerde de luciferase, tezamen met andere proteïnen, door verzadiging van de oplossing met ammoniumsulfaat. Na oplossen van het neerslag in water, werden de laag-moleculaire bestanddeelen door dialyse verwijderd.

2. Kanda (69) voegde aan de ongezuiverde luciferase-oplossing een 2 %-ige oplossing van sublimaat toe, totdat zich geen neerslag meer vormde. De luciferase bleef hierbij in het filtraat.

Geen der beide methoden voerde echter tot een zuiver preparaat.

b. *Luciferine*.

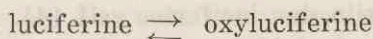
Hoewel ook het luciferine nog niet in zuivere toestand is verkregen, heeft men, vrijwel uitsluitend door de onderzoeken van Harvey en zijn medewerkers, toch eenig inzicht verkregen in zijn chemische structuur.

Aanvankelijk meende Harvey luciferine tot de albumosen te moeten rekenen: het is oplosbaar in water en alcoholen, onoplosbaar in vetoplosmiddelen, het is dialyseerbaar en geeft positieve eiwitreacties. Zijn onderzoeken waren echter verricht met ongezuiverde *Cypridina*-extracten en lieten bovengenoemde conclusie niet toe. In 1929 toonde Kanda (70) aan, dat luciferine weliswaar niet met vetoplosmiddelen uit gedroogde *Cypridina*'s is te extraheeren, doch dat het na extractie met methanol uit vet-vrije gedroogde *Cypridina*'s wel oplosbaar is in benzol. Hieruit leidde Kanda af, dat luciferine een phospholipoïde zou zijn, een opvatting die naderhand door Anderson echter afdoende kon worden weerlegd. In 1932 deelde Kanda (71) mede, dat hij erin was geslaagd een kristallijn luciferine-preparaat in handen te krijgen, zonder echter verdere details te vermelden. In 1935 trok Harvey (57) zijn aanvankelijke opvatting omtrent de chemische natuur van luciferine weer in, zonder nochtans in staat te zijn andere suggesties te doen.

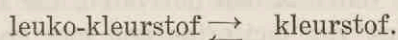
De oudere onderzoeken over de aard en de eigenschappen van luciferine hebben, zooals men uit het bovenstaande ziet, weinig positiefs opgeleverd. Toch was Harvey tot één belangrijk inzicht gekomen en wel betreffende de wijze, waarop het luciferine wordt geoxydeerd (44, 48). Hij merkte op, dat bij de

oxydatie van luciferine géén afbraak van het luciferine-molecule plaats vindt, doch dat het oxydatieproduct, door hem oxyluciferine genoemd, slechts weinig van het oorspronkelijke luciferine kan verschillen, aangezien het met reductie-middelen gedeeltelijk weer in luciferine is terug te voeren. H a r v e y vond later, dat luciferine, zoowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van luciferase, door moleculaire zuurstof wordt geoxydeerd, in het eerste geval onder licht-emissie, in het tweede geval echter niet. Verder waren de meest uiteenlopende oxydatiemiddelen in staat het luciferine, eveneens zonder lichtemissie, te oxydeeren. In al deze gevallen nam H a r v e y één oxydatieproduct, het oxyluciferine, aan.

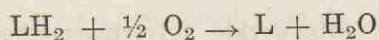
Hij stelde zich voor, dat de overgang



volkomen vergelijkbaar zou zijn met de overgang



De oxydatie van luciferine, voorgesteld door L H₂, schreef hij als:



en de reductie van oxyluciferine L als:



De tot dusverre beschreven pogingen om de chemische natuur van luciferine te benaderen waren verricht aan slechts weinig gezuiverde extracten. Een groote stap voorwaarts beteekenden de onderzoeken van A n d e r s o n. Deze stelde opnieuw pogingen in het werk om luciferine in zuivere toestand te isoleeren en bestudeerde nader de oxydatie van luciferine door moleculaire zuurstof, al of niet bij aanwezigheid van luciferase en door oxydatiemiddelen.

Eerst werkte A n d e r s o n echter een voor de isoleeringspogingen noodzakelijke betrouwbare quantitatieve test uit, waarbij hij uitging van de waarneming van S t e v e n s (110), dat de totale hoeveelheid uitgezonden licht evenredig is met de aanvankelijke hoeveelheid luciferine en slechts weinig afhangt van de hoeveelheid luciferase of de luciferase-concentratie. De photometrische bepalingsmethode van S t e v e n s was echter betrekkelijk onnauwkeurig en bovendien tijdroovend.

Bij de door A n d e r s o n uitgewerkte testmethode (3) werd het licht opgevangen op een photocel en werd de veroorzaakte photostroom gebruikt voor het opladen van een condensator. De eindlading hiervan werd bepaald met een electrometer volgens L i n d e m a n n en was een maat voor de totale hoeveelheid licht, welke bij de reactie was uitgezonden.

A n d e r s o n bevestigde de resultaten van S t e v e n s, dat, binnen de grenzen van bepaalde luciferine- en luciferase-concentraties, de totale hoeveelheid uitgezonden licht een directe maat is voor de bij het begin der reactie aanwezige hoeveelheid luciferine.

Het bleek echter, dat de totale hoeveelheid licht behalve van het aanvankelijk aanwezige luciferine, ook sterk afhankelijk was van uitwendige factoren, waarvan de belangrijkste zijn: de pH, de temperatuur en de zoutconcentratie

(speciaal de NaCl-concentratie) in de oplossing. Anderson verkreeg betrouwbare uitkomsten, door deze uitwendige factoren volkomen te standaardiseeren.

De eerste isoleeringspogingen van Anderson berustten op de gedachte — welke ook reeds door Harvey (54, 58) experimenteel was getoetst — te trachten niet het zeer autoxydabele luciferine te isoleeren, doch oxyluciferine. Deze pogingen mislukten, aangezien het tegen de verwachting niet mogelijk bleek het oxyluciferine door middel van waterstof en fijn verdeeld platina of met natriumhydrosulfiet ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) weer met bevredigende opbrengst te reduceeren tot actief luciferine.

Meer succes had een poging luciferine om te zetten in derivaten, welke minder autoxydabel zijn dan luciferine zelf (4). Door inwerking van benzoylchloride of azijnzuuranhydride op een oplossing van luciferine in butanol ontstonden onder bepaalde voorwaarden derivaten, die aan deze eisch voldeden. Uit de benzoyl-verbinding van luciferine kon met goede opbrengst door verwarming met verdund HCl het vrije luciferine worden terug verkregen.

De door Anderson uitgewerkte zuiveringsmethode verliep als volgt: gedroogde, fijn gemalen *Cypridina*'s werden, na voor-extractie met aether en benzol, bij gewone temperatuur in waterstof-atmosfeer geëxtraheerd met methanol. Na filtratie en toevoeging van butanol werd de methanol in vacuum bij kamertemperatuur afgedistilleerd. Aan de butanol-oplossing voegde hij vervolgens benzoylchloride toe. Na eenige tijd staan werd de overmaat benzoylchloride door wasschen met water ontleed. Na opnemen van de butanol-oplossing in een overmaat water extraheerde hij het benzoylderivaat van luciferine met aether. Na verdamping van de aether werd de benzoyl-verbinding door verwarming met $\frac{1}{2}$ m HCl in waterstof-atmosfeer verzeepd. Na extractie van het benzoëzuur en het butylbenzooat met aether kon vervolgens het luciferine met butanol uit de HCl-oplossing worden geëxtraheerd. De benzoyleering werd hierna nog eens op dezelfde wijze uitgevoerd.

De opbrengst van iedere benzoyleeringscyclus bedroeg $\pm 80\%$.

Met behulp van deze methode slaagde Anderson erin luciferine-preparaten te verkrijgen, die een activiteit bezaten ± 2000 maal zoo hoog als die van het *Cypridina*-poeder, waarvan hij was uitgegaan. Dit zijn tevens de zuiverste preparaten, welke tot dusverre in de — mij toegankelijke — literatuur zijn beschreven.

Aan deze preparaten bestudeerde Anderson thans nader de chemische eigenschappen van luciferine (5). Hierbij bleek, dat na oxydatie van luciferine met moleculaire zuurstof bij aanwezigheid van luciferase (de lichtreactie), toevoeging van reductiemiddelen ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ of $\text{Pt} + \text{H}_2$) slechts een zeer geringe terugvorming van actief, d.w.z. met luciferase $+ \text{O}_2$ lichtgevend, luciferine ten gevolge had.

Anderzijds oxydeerde hij luciferine met een aantal oxydatiemiddelen (o.a. cerisulfaat en kaliumferricyanide) waarbij een oxydatieproduct ontstond, dat met luciferase $+ \text{O}_2$ geen licht meer gaf. Voegde hij nu echter na niet te lange tijd een der bovengenoemde reductiemiddelen toe en vervolgens O_2 , dan zond het reactiemengsel weer licht uit in een mate, waaruit bleek, dat het oorspronkelijke luciferine voor het grootste deel in actieve toestand was terug gevormd.

Hiermede had A n d e r s o n het belangrijke feit ontdekt, dat in het luciferine-molecule twee gescheiden oxydatiemogelijkheden aanwezig zijn:

1. Een reversibele „donkere” oxydatie met O_2 (bij afwezigheid van luciferase) of met oxydatiemiddelen;
2. Een irreversibele lichtgevende oxydatie met O_2 bij aanwezigheid van luciferase.

Naar aanleiding hiervan stelde A n d e r s o n voor om de door H a r v e y ingevoerde naam oxyluciferine, welke voor beide oxydatieproducten was bedoeld, te laten vallen en het eindproduct van de reversibele oxydatie van luciferine geoxydeerd luciferine te noemen; voor het eindproduct van de irreversibele oxydatie stelde hij het geven van een naam uit, totdat de eigenschappen nader bekend zouden zijn.

Een belangwekkend door A n d e r s o n naar voren gebracht gezichtspunt is, dat luciferine, geheel afgezien van zijn specifieke activiteit in de lichtreactie, met het geoxydeerde luciferine zou kunnen behooren tot de klasse der oxydo-reductie systemen, welke, zooals bekend is, een belangrijke rol spelen in het proces der biologische oxydatie. Wij zullen in het volgende hoofdstuk zien, dat dit gezichtspunt van A n d e r s o n speciaal voor de bestudeering van het bioluminescentie-proces in lichtbacteriën vruchtbaar is geweest.

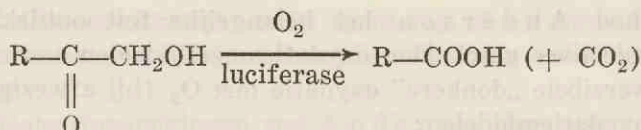
A n d e r s o n putte uit het verrichte onderzoek ook nog een suggestie betreffende de chemische natuur van luciferine.

Uit de vorming van benzoyl- en acetylderivaten onder de beschreven omstandigheden volgt de aanwezigheid van actieve waterstof in het luciferine-molecule. Deze actieve waterstof kan gebonden zijn aan stikstof, zwavel of zuurstof. A n d e r s o n merkte op, dat de oxydatie en de reductie van luciferine eenige punten van overeenkomst vertoont met die van zekere in de natuur voorkomende sulphydryl- en hydroxybenzolderivaten (B a l l (7)). De oxydatie-reductiepotentiaal van het luciferine-systeem stemt nu bovendien vrijwel overeen met die van sommige poly-oxybenzolderivaten. A n d e r s o n s onder voorbehoud gegeven conclusie luidde dan ook, dat de aanwezigheid van een poly-oxybenzolstructuur in het luciferine-molecule mogelijk moet worden geacht.

In een recent onderzoek, eveneens uit de school van H a r v e y, hebben C h a k r a v o r l y en B a l l e n t i n e (14) een belangrijke vondst gedaan met betrekking tot dat gedeelte van het luciferine-molecule, dat direct bij de luminescente oxydatie is betrokken.

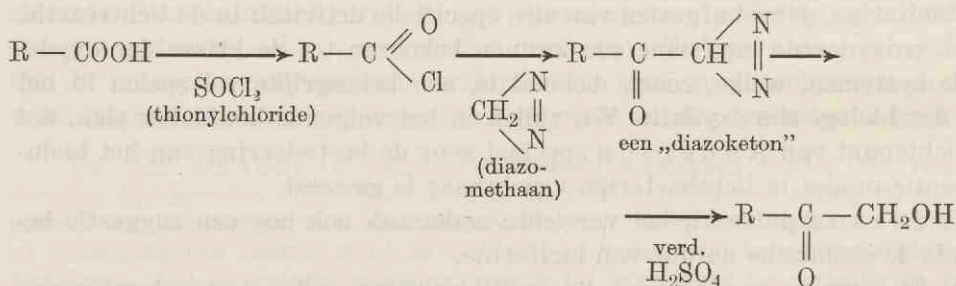
Toepassing van ultra-microanalyse (31) op de meest gezuiverde luciferine-preparaten van A n d e r s o n (4) toonde slechts de aanwezigheid van koolstof, waterstof en zuurstof aan; de proeven op stikstof, zwavel, halogenen en asch vielen alle negatief uit.

Uitgaande van de waarnemingen van A n d e r s o n betreffende de irreversibele oxydatie bij de lichtgevende reactie en de omstandigheden waaronder de benzoyleering plaats vindt, benevens van de door G i e s e en C h a s e (37) gevonden irreversibele inactivering van luciferine door blauwzuur, stelden zij de hypothese op, dat luciferine een keto-hydroxy-groep (een ketol-groep) zou bevatten, die bij de lichtgevende reactie op de volgende wijze oxydatief zou worden afgebroken:



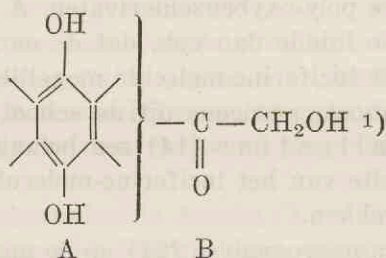
Zij maakten de aanwezigheid van een keto-groep bovendien nog waarschijnlijk door aan te toonen, dat door toevoeging van hydroxylamine-acetaat aan de luciferine-preparaten een microkristallijn neerslag ontstaat, dat inactief is ten opzichte van luciferase, doch dat na zure hydrolyse weer licht geeft met dit enzym.

Chakravorly en Ballentine merkten op, dat indien hun hypothese juist was, zij uit in de lichtreactie geoxydeerd luciferine door de volgende serie reacties weer een actief luciferine-preparaat moesten terug krijgen:

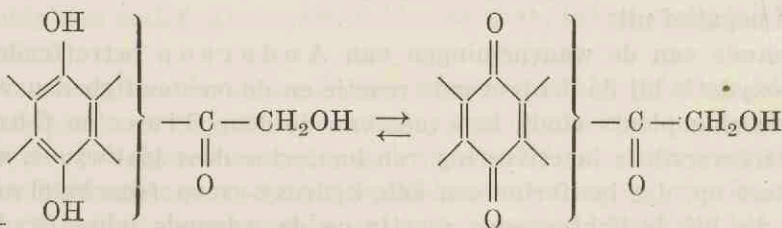


Zij testten het reactieproduct, door na behandeling met H_2S (als reductiemiddel) luciferase toe te voegen en vervolgens lucht door te leiden. De test viel positief uit: de oplossing lichtte duidelijk op en het was hun blijkbaar gelukt, door de beschreven reacties het luciferine, althans gedeeltelijk, te regenereren.

Het resultaat van hun onderzoek en van de onderzoekingen van Anderson werd vastgelegd in de volgende schematische en partieele structuurformule voor luciferine:

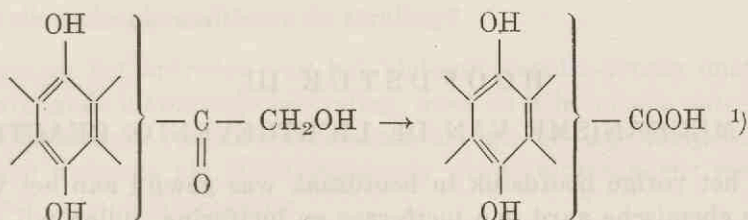


De oxydatie van A stelt de reversibele „donkere” oxydatie voor door O_2 (zonder luciferase) of oxydatiemiddelen:



1) Voor de parastand der OH-groepen worden noch door Anderson noch door Chakravorly en Ballentine argumenten genoemd, evenmin voor het aantal OH-groepen.

De oxydatieve afbraak van B door O_2 bij aanwezigheid van luciferase stelt de irreversibele lichtgevende oxydatie van luciferine voor:



Wegens gebrek aan uitgangsmateriaal — *Cypridina hilgendorfi* wordt slechts in Japan in voldoende hoeveelheid aangetroffen — stellen de auteurs zich voor langs synthetische weg de genoemde resultaten te bevestigen en de complete structuur van luciferine te bepalen.

1) Hoewel dit door Chakravorly en Ballentine niet nadrukkelijk wordt opgemerkt, ligt het zeer voor de hand hierbij tevens oxydatie van de poly-phenol-groepering aan te nemen.

HOOFDSTUK III.

HET MECHANISME VAN DE LICHTGEVENDE REACTIE.

Terwijl het vorige hoofdstuk in hoofdzaak was gewijd aan het verkregen inzicht in de chemische aard van luciferase en luciferine, zullen wij ons thans bezig houden met de vraag, op welke wijze deze twee componenten met elkaar reageeren en welk molecule uiteindelijk verantwoordelijk is voor de lichtemissie.

Achtereenvolgens zullen worden besproken de voorstelling, welke H a r v e y op grond van zijn oudere onderzoekingen aangaande het mechanisme van de lichtgevende reactie had ontwikkeld en de uitbreiding, welke deze voorstelling door het onderzoek van de laatste jaren heeft ondergaan. Tenslotte volgt dan nog een critische beschouwing, waarbij wij, mede aan de hand van eenige eigen waarnemingen, nader zullen ingaan op de vraag, welk molecule voor de lichtemissie verantwoordelijk moet worden gesteld.

§ 1. De primair door H a r v e y ontwikkelde voorstelling.

In tegenstelling met het onderzoek naar de chemische aard der stoffen, welke bij het bioluminescentie-proces zijn betrokken, heeft men bij de bestudeering van het mechanisme van de lichtgevende reactie vooral in de laatste tijd veelal gebruik gemaakt van lichtbacteriën als proefobject, hoewel men daarbij toch geheel is uitgegaan van het inzicht, waartoe H a r v e y door bestudeering van het *Cypridina* luciferine-luciferase systeem was gekomen.

In dit verband herinneren wij er aan, hoe H a r v e y vond, dat slechts bij aanwezigheid van luciferase de oxydatie van luciferine door moleculaire zuurstof tot lichtemissie leidt. H a r v e y meende nu, dat weliswaar luciferine het specifieke substraat vormt voor luciferase in de lichtgevende reactie, doch dat de lichtemissie zelve door het luciferase-molecule geschiedt. Hij had hiervoor de volgende argumenten:

1. oxydatie van luciferine bij afwezigheid van luciferase leidt niet tot lichtemissie;
2. bij kruisingsproeven met luciferinen en luciferasen van verwante organismen (zie § 1 van hoofdstuk II) bepaalt de herkomst van de luciferase de kleur van het geëmitteerde licht.

Volgens de huidige fysische opvattingen wordt de emissie van licht veroorzaakt, doordat een molecule, hetwelk op één of andere wijze in de aangeslagen toestand is geraakt, onder emissie van een quant zijn overmaat energie weer afgeeft.

Voor het verkrijgen van een inzicht in de luminescente reactie tusschen luciferine, luciferase en zuurstof zijn de volgende vragen van belang:

- a. door welke oorzaak geraakt bij deze reactie een molecule in de aangeslagen toestand en
- b. welk molecule emitteert de straling?

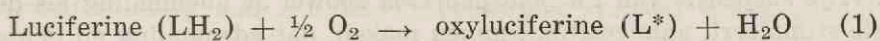
Aangezien het optreden van het bioluminescentie-proces onafhankelijk is van voorafgaande uitwendige bestraling, moet de lichtemissie optreden, doordat de bij een chemische reactie vrijkomende energie bij lage temperatuur via een aangeslagen molecule als stralingsenergie wordt uitgezonden; men noemt dit verschijnsel *chemoluminescentie*.

D u b o i s heeft reeds vroeg (22) de bioluminescentie herkend als een chemoluminescente oxydatie-reactie.

Theoretisch bestaan er nu nog twee mogelijkheden aangaande het molecule, dat uiteindelijk de straling emitteert: in de eerste plaats kan het zijn, dat het primair aangeslagen molecule zelf het lichtquant uitstraalt, doch in de tweede plaats kan ook het primair aangeslagen molecule door botsing met een geheel ander molecule dit laatste in de aangeslagen toestand en vervolgens tot luminescentie brengen.

H a r v e y meende nu om de onder 1 en 2 genoemde redenen, dat weliswaar het luciferine bij de oxydatie in de aangeslagen toestand zou ontstaan, doch dat dit zijn aanslagenergie vervolgens zou afgeven aan het luciferase-molecule, waarop dit dan het lichtquant zou emitteeren.

In 1935 (57) preciseerde hij zijn voorstelling in het hieronder volgende reactie-schema:



L* en A* duiden resp. aangeslagen oxyluciferine- en luciferase-moleculen aan.

Dit reactieschema is thans, zooals ook reeds door v a n S c h o u w e n b u r g (106) werd betoogd, in verschillende opzichten onbevredigend:

1. Na de publicatie van dit schema is door de onderzoekingen van A n d e r s o n en van C h a k r a v o r l y en B a l l e n t i n e bekend geworden, dat de lichtgevende oxydatie van luciferine een minder eenvoudig verloop heeft, dan aanvankelijk door H a r v e y werd aangenomen.
2. Het van de normale reversibele oxydatie afwijkende verloop van de lichtgevende oxydatie van luciferine onder invloed van luciferase is moeilijk te combineeren met de ondergeschikte rol, die het luciferase-molecule bij de eigenlijke oxydatiereactie (1) speelt.
3. De argumenten, welke H a r v e y heeft voor zijn stelling, dat uiteindelijk de luciferase het lichtgevend molecule is (namelijk de op blz. 8 beschreven kruisingsproeven), zijn slechts zwak. Bovendien zijn er, zooals wij reeds zagen, van andere lichtgevende organismen luciferinen bekend, die wel buiten aanwezigheid van luciferase door anorganische oxydatiemiddelen onder lichtemissie kunnen worden geoxydeerd; dit geldt bijvoorbeeld voor het *Pholas*-luciferine (21).

De hierna te beschrijven onderzoeken hebben geleid tot een wijziging van het primair door H a r v e y gegeven reactieschema, waardoor althans de onder 1 en 2 genoemde bezwaren konden worden opgeheven.

§ 2. Recente onderzoeken over het mechanisme van de lichtgevende reactie.

Zooals reeds is opgemerkt, heeft de studie van het bioluminescentie-proces der lichtbacteriën krachtige indirecte argumenten opgeleverd voor de aanwezigheid daarin van een luciferine-luciferase systeem van overeenkomstige aard, als dat van de bekende extra-cellulaire luminescenties. Bovendien hebben deze onderzoeken ons inzicht verschaft in de vraag naar de plaats van de lichtgevende reactie in de stofwisseling der lichtbacteriën.

Reeds sedert lange tijd vroeg men zich af, of het lichtgevend proces al of niet was verbonden met het ademhalingsproces der lichtbacteriën, waarbij men op grond van bepaalde experimentele aanwijzingen eensdeels geneigd was een dergelijk verband aan te nemen [S a c h s (103), B e i j e r i n c k (10), H a r v e y (46), J o h n s o n (65)], doch anderzijds een samenhang tusschen beide processen van de hand wees [M o l i s c h (94), H a r v e y (56), R o o t (101), T a y l o r (112), S h o u p (108)].

De vroegere medewerkers van de Biophysische Researchgroep van S c h o u w e n b u r g en E y m e r s (27, 106) hebben enerzijds op grond van de waarneming, dat toevoeging van een veradembaar substraat aan een substraatvrije suspensie van *Ph. phosphoreum* zoowel de ademhaling als de lichtemissie stimuleert, aannemelijk kunnen maken, dat ademhaling en lichtemissie van hetzelfde dehydrogeneerend systeem der bacteriecel afhankelijk zijn, doch anderzijds door remmingsproeven met blauwzuur en aethylurethaan kunnen bewijzen, dat de lichtemitterende reactie naast het sterk blauwzuur-gevoelige deel der ademhaling (de haemine-ademhaling) een apart zuurstofverbruikend proces is en dat deze processen om de zuurstof concurreeren.

Het totale zuurstofverbruik van *Ph. phosphoreum* kon — afgezien van een geringe voor blauwzuur niet gevoelige restademhaling — worden gesplitst in een haemine-ademhaling en een lichtademhaling, waarbij deze laatste nog weer in twee gedeelten uiteenviel, te weten, een zeer gering zuurstofverbruik direct behorende bij de lichtemissie en een veel grooter zuurstofverbruik verbonden met een „donkere” reversibele oxydatie-reductie van het systeem luciferine/geoxydeerd luciferine.

V a n S c h o u w e n b u r g geeft dus aan luciferine de rol van waterstof-transporteur in het ademhalingssysteem der bacteriecel, welke opvatting hoofdzakelijk is gebaseerd op het inzicht, waartoe A n d e r s o n (5) was gekomen naar aanleiding van de door hem ontdekte twee oxydatie-mogelijkheden in het molecule van *Cypridina*-luciferine.

Een belangrijke consequentie, welke uit het genoemde reactieschema voortvloeit is, dat de maximale intensiteit van het bacterieelicht niet door de hoeveelheid luciferine, doch door de capaciteit van de luciferase wordt bepaald.

Onderzoeken van J o h n s o n leidden evenwel in dit opzicht tot een

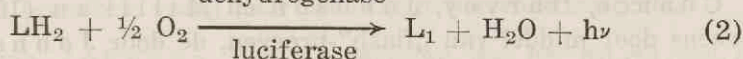
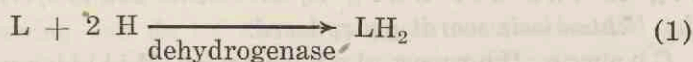
afwijkende conclusie. Hij constateerde (66), dat een suspensie van pepton-vrij gewassen cellen van *Ph. Fischeri* in fructose-bevattende fosfaatbuffer na eenige uren aereeren $\pm 90\%$ van zijn lichtintensiteit had verloren, doch dat gedurende die tijd de ademhaling vrijwel constant was gebleven.

Hij besloot, dat blijkbaar een essentieel constitueens van het lichtemitterend systeem — mogelijkwerwijs het luciferine — wordt verbruikt en veronderstelde, dat een uit zijn voedingsmedium gehaalde cel een bepaalde hoeveelheid luciferine bezit, welke in de loop van de tijd irreversibel in de lichtreactie wordt geoxydeerd, terwijl de cel met behulp van koolhydraat alléén niet in staat is om nieuw luciferine te synthetiseeren.

In een volgend onderzoek (67) gaf Johnson een nadere uitwerking van de genoemde veronderstelling.

Bij aereeren van twee suspensies van *Ph. Fischeri*, de één met, de ander zonder glucose, had de laatste voortdurend een lagere lichtintensiteit dan de eerste. Werd na zekere tijd aan de laatste suspensie eveneens glucose toegevoegd, dan steeg zijn lichtintensiteit in korte tijd boven die van de eerste suspensie op dat moment. De totale hoeveelheid licht, welke van de aanvang af gerekend, na eenige uren door de beide suspensies was uitgezonden, bleek echter ongeacht de verdeling over de tijd dezelfde te zijn.

Johnson ziet de fructose, resp. de glucose als waterstofdonator voor de vorming van een stof, noodig voor de lichtemissie, waarvan het primaire substraat al in de cel aanwezig is. Als zoodanig neemt hij een molecule L aan, dat met medewerking van het dehydrogeneerend systeem wordt gehydreerd tot luciferine LH_2 . De lichtgevende reactie voert dan, naar analogie van de waarnemingen van Anderson bij *Cypridina*, tot een niet-reversibel geoxydeerd product, voorgesteld door L_1 .



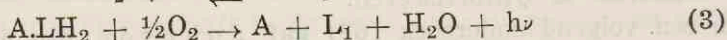
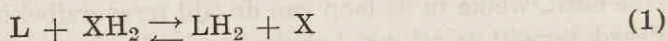
Johnson heeft de opvatting, dat zoowel de totale hoeveelheid uitgezonden licht als de lichtintensiteit op ieder moment worden bepaald door de hoeveelheid luciferine en dat niet, zooals van Schouwenburg meende, de lichtintensiteit door de capaciteit van de luciferase wordt bepaald.

Een door Johnson, van Schouwenburg en van der Burg (68) uitgevoerd onderzoek bracht een nadere uitwerking en verdieping van de beschreven reactieschema's. Zij onderzochten aan suspensies van lichtbacteriën het verschijnsel van de „flash”, waaronder men verstaat de plotselinge zeer hoge lichtintensiteit — hooger dan de stationnaire lichtintensiteit bij onafgebroken aeratie — welke optreedt, indien zuurstof wordt toegevoerd aan een suspensie, waarvan tengevolge van zuurstof-tekort het licht is uitgedoofd. De lichtintensiteit bereikt na ca $\frac{1}{2}$ sec. zijn maximale waarde, neemt vervolgens exponentieel af, om na ongeveer 4 sec. zijn eindwaarde te hebben bereikt.

Ter verklaring namen zij aan, dat tijdens de anaerobiose een overmaat luciferine wordt opgehoopt; bij toevoeging van zuurstof uit zich dit in een hoo-

gere reactie-snelheid en dus in een hogere lichtintensiteit dan in de stationaire toestand. Het bleek, dat de bij de „flash” uitgezonden extra hoeveelheid licht bij niet al te korte tijden — ca 10 à 20 sec. — onafhankelijk is van de tijd van anaerobiose en dat dus de hoeveelheid opgehoopte luciferine snel een eindwaarde bereikt. Het optreden van de „flash” bewees tevens, dat luciferase in de lichtreactie zeker niet altijd de beperkende factor is.

De „flash”-proeven leidden tot de opstelling van het volgende schema:



Vergelijking (1) geeft de functie weer, welke het dehydrogeneerend systeem van de cel in de lichtreactie speelt: een stof L, welke wij *dehydro-luciferine* zullen noemen, wordt door de waterstofdonator XH_2 gereduceerd tot luciferine LH_2 .

Volgens vergelijking (2) vormt luciferine een dissociabele verbinding met het luciferase-molecule A.

Volgens vergelijking (3) wordt daarna het complex $A.LH_2$ door moleculaire zuurstof onder lichtemissie geoxydeerd. Hierbij ontstaat weer actieve luciferase en — volgens Anderson — het irreversibel geoxydeerde eindproduct L_1 van de lichtgevende reactie.

In vergelijking (2) ligt de mogelijkheid opgesloten, dat in bepaalde gevallen de capaciteit van de luciferase de beperkende factor voor de lichtintensiteit kan zijn.

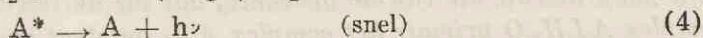
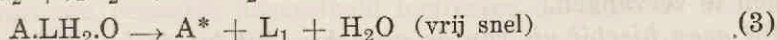
Essentieel in het reactieschema van Johnson, van Schouwenburg en van der Burg is, dat *slechts aan luciferase gebonden luciferine onder lichtemissie wordt geoxydeerd*.

Chance, Harvey, Johnson en Millikan (15) waren in staat, eveneens door middel van „flash”-proeven, de door Johnson en zijn medewerkers in lichtbacteriën waarschijnlijk gemaakte, vóór de lichtgevende oxydatie plaatsvindende, binding tussen luciferine en luciferase, voor *Cypridina*-luciferine en -luciferase *in vitro* te bewijzen. Zij toonden namelijk aan, dat het lichten later optreedt, wanneer luciferine en luciferase eerst afzonderlijk met zuurstof worden gemengd en daarna worden gecombineerd, dan wanneer luciferine en luciferase eerst anaeroob worden gemengd en vervolgens met zuurstof worden samengebracht.

Uit het kinetisch verloop van de „flash” viel verder af te leiden, dat de eigenlijke oxydatie-reactie nog weer uiteenvalt in twee gedeelten. Eerst vereenigt het complex $A.LH_2$ zich zeer snel met zuurstof tot een geoxygeneerd complex $A.LH_2.O^1$), dat dan vervolgens oxydatief uiteenvalt onder emissie van licht.

1) Harvey en medewerkers hebben hier een niet geheel correcte schrijfwijze gevolgd, aangezien zij hebben bedoeld, dat één molecule A. LH_2 zich bindt met een half molecule zuurstof en niet met een atoom zuurstof. Juister ware A. $LH_2 \cdot \frac{1}{2}O_2$ of een verdubbeling daarvan.

Zij stellen zich het schematisch verloop van het lichtgevend proces als volgt voor:



In het geval van de lichtbacteriën zou aan de gegeven vergelijkingen dan nog de vergelijking



moeten voorafgaan.

Door Schoepfle (104) bij verschillende temperaturen verrichtte „flash” proeven met *Ph. Fischeri* toonden, dat het door Harvey en medewerkers voorgestelde verloop van de eigenlijke oxydatiereactie eveneens van toepassing is op de bioluminescentie der lichtbacteriën. Tot hetzelfde resultaat kwam Schoepfle (105), door de invloed van het narcoticum veronal en het de ademhaling stimulerende dinitrophenol op het kinetisch verloop van de „flash” na te gaan.

Het zwakke punt van het gegeven reactieschema is ongetwijfeld de kwestie, welk molecule uiteindelijk verantwoordelijk moet worden gesteld voor de lichtemissie. In § 1 van dit hoofdstuk wezen wij er op, dat de desbetreffende, reeds in het oorspronkelijke schema van Harvey aangenomen, voorstelling vatbaar is voor critiek.

In de volgende paragraaf zal het reactieschema, wat dit punt betreft, aan een nadere beschouwing worden onderworpen.

§ 3. Critische beschouwing van de tot dusver gegeven reactieschema's, in het bijzonder wat betreft de vraag naar het lichtemitterende molecule.

Het schema van Johnson had het bezwaar, dat het de rol van luciferase volkomen in het midden liet; in het schema van Johnson, van Schouwenburg en van der Burg is er naar gestreefd dit bezwaar te ondervangen door aan te nemen, dat LH_2 en A zich tot een dissociabele molecuulverbinding A.LH_2 kunnen vereenigen. Alléén de oxydatie van het complex A.LH_2 zou tot lichtemissie leiden.

Er moet intusschen op worden gewezen, dat in deze voorstelling een nadere specificatie van het lichtemitterend molecule achterwege is gelaten.

In dit verband zij opgemerkt, dat in het schema van Johnson en zijn medewerkers weliswaar tot uitdrukking komt, dat de luciferase van zeer nabij bij het lichtemitterend proces is betrokken, doch dat Harvey zoowel in zijn eerste als in zijn meest recente schema een stap verder is gegaan, door op grond van de in § 1 van hoofdstuk II beschreven kruisingsproeven de luciferase zelve als het lichtemitterende molecule aan te wijzen. In § 1 van dit hoofdstuk hebben wij echter betoogd, dat de voor deze extreme opvatting aangevoerde argumenten geenszins afdoende zijn.

Een reactieschema, dat ook wat deze kwestie betreft in staat is een met de experimentele gegevens in overeenstemming zijnde voorstelling te geven, kunnen wij baseeren op het reactieschema van H a r v e y en zijn medewerkers, door daarin de vergelijkingen (3) en (4) door de hierna af te leiden vergelijkingen te vervangen.

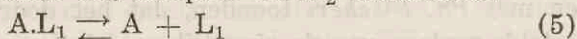
Wij gaan hierbij uit van de gedachte, dat bij de inwendige oxydatie van het complex $A.LH_2.O$ primair het complex $A.L_1$ ontstaat en wel in aangeslagen toestand.



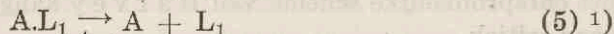
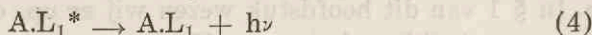
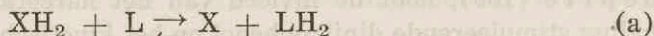
Vervolgens geeft het complex $A.L_1^*$ onder emissie van straling zijn aanslagenergie af:



Het complex $A.L_1$ is evenals het complex $A.LH_2$ dissociabel:



Het complete schema, waarbij vergelijking (a) de functie van het dehydrogeneerend systeem ten dienste van de lichtemissie aangeeft, luidt dan:



Karakteristiek voor dit schema is, dat noch het luciferase-molecule, noch het irreversibel geoxydeerde luciferine-molecule afzonderlijk verantwoordelijk worden gesteld voor de lichtemissie, doch dat wordt aangenomen, *dat het lichtquant door het aangeslagen complex $A.L_1^*$ wordt geëmitteerd.*

Deze voorstelling geeft tevens een ongedwongen verklaring van de in § 1 van hoofdstuk II beschreven kruisingsproeven van H a r v e y.

Het is duidelijk, dat door de oxydatie van de complexen $A^1.LH_2$ en $A^2.LH_2$, waarin dus twee verschillende luciferase-moleculen A^1 en A^2 zijn aangenomen en waarbij resp. de complexen $A^1.L_1^*$ en $A^2.L_1^*$ ontstaan, de grootte van het uitgezonden quant mede door de aard van het betreffende luciferase-molecule zal worden bepaald.

In dit verband moge worden gewezen op de verschuiving, welke het absorptie- en het fluorescentie-spectrum van een laag-moleculaire verbinding veelal vertoont, indien deze aan een hoog-moleculaire stof, bijv. een dragereiwit, wordt gebonden. Hierbij blijkt, dat de grootte van de verschuiving hoofdzakelijk door de aard van de betreffende hoog-moleculaire stof wordt bepaald.

Men vergelijke bijv. de onderzoeken van Vermeulen, Wassink en Reman (113) en van Katz en Wassink (76) over de fluorescentie- en absorptiespectra van chlorophyll-eiwit complexen.

1) Reeds Johnson (67) merkte op, dat het geenszins is uitgesloten, dat het molecule L_1 , hoewel het voor de lichtreactie zijn bruikbaarheid heeft verloren, nog een algemeene functie als waterstofoverdrager in de stofwisseling der lichtbacterie-cel zou bezitten.

De bovenbeschreven, op zuiver theoretische overwegingen gefundeerde, nadere uitwerking van het reactieschema van H a r v e y c.s. konden wij door een eenvoudige proef nog aan waarschijnlijkheid doen winnen.

H a r v e y (46¹)) had geconstateerd, dat een zekere hoeveelheid luciferase slechts van een bepaalde hoeveelheid luciferine de oxydatie onder licht-emissie katalyseert en besloot op grond hiervan, dat de luciferase bij deze reactie wordt verbruikt.

Het nader uitgewerkte reactieschema veroorlooft ons echter, dit verbruik van de luciferase slechts te zien als een reversibele inactivering, door blokkeering van het luciferase-oppervlak door het oxydatieproduct L_1 .

Deze mogelijkheid werd als volgt experimenteel nagegaan.

Uit twee *Cypridina*'s bereidden wij, door fijnwrijven met koud water en filtreren van het extract, 25 cm³ luciferase-oplossing. Door koken van 20 fijn-gewreven *Cypridina*'s met 10 cm³ water en filtreren van het extract, werd een geconcentreerde luciferine-oplossing verkregen.

Bij 1 cm³ luciferase-oplossing voegden wij 1 cm³ van de afgekoelde luciferine-oplossing, waarbij onmiddellijk een vrij intensief lichten optrad. Nadat het mengsel was uitgelicht, werd een tweede cm³ luciferine-oplossing toegevoegd, enz., waarbij de intensiteit van het na iedere toevoeging optredende licht allengs minder werd.

Bij de zesde toevoeging van luciferine trad géén lichten meer op, zoodat het geleek, of thans de luciferase was verbruikt.

Na nog een cm³ luciferine-oplossing te hebben toegevoegd, dialyseerden wij het mengsel gedurende 2 maal 24 uur in de ijskast tegen gedestilleerd water; na 24 uur werd het water ververscht. Bij deze dialyse werd er voor gezorgd, dat het volumen van het reactiemengsel hetzelfde bleef.

Na beëindiging der dialyse brachten wij de oplossing weer op kamertemperatuur en voegden opnieuw 1 cm³ luciferine-oplossing toe. Onmiddellijk trad een vrij intensief lichten op, hetgeen bewees, dat de oplossing actieve luciferase bevatte.

Door deze proef is dus in hooge mate aannemelijk gemaakt, dat het door H a r v e y geconstateerde verbruik van luciferase slechts schijnbaar is en dat de luciferase-activiteit afneemt door blokkeering van het luciferase-oppervlak door een laag-moleculair oxydatieproduct van luciferine.

De beschreven proef vormt een aanmerkelijke steun voor de realiteit van verg. (5) van het reactieschema en zodoende tevens voor die van de geheele door ons gegeven nadere uitwerking van het schema van H a r v e y c.s.

Resumeerende mogen wij vaststellen, dat het door gecombineerd onderzoek van de extra-cellulaire en de intra-cellulaire luminescenties mogelijk is gebleken een schema op te stellen voor het verloop van de lichtgevende reactie, dat op alleszins bevredigende wijze met alle experimenteele gegevens overeenstemt en dat ons tevens in staat stelt extra-cellulaire en intra-cellulaire luminescentie van uit één gezichtspunt te beschouwen.

1) l.c. blz. 123.

HOOFDSTUK IV.

HET VRAAGSTUK VAN DE AFSCHIEDING VAN HET LICHTGEVEND SYSTEEM UIT DE BACTERIECEL.

Het directe chemische onderzoek van het bioluminescentie-proces in lichtbacteriën staat of valt met de mogelijkheid om, hetzij het lichtgevend systeem in zijn geheel, hetzij één der componenten daarvan in actieve vorm af te scheiden van de levende cel.

Zooals wij in § 1 van hoofdstuk II reeds opmerkten, hebben evenwel alle tot dusverre beschreven pogingen om lichtende celvrije preparaten uit lichtbacteriën te bereiden tot een negatief resultaat geleid.

Aangezien wij als uitgangsmateriaal voor ons onderzoek vrijwel uitsluitend de beschikking hadden over lichtbacteriën, was het van belang desalniettemin deze mogelijkheid nogmaals na te gaan.

De tot dit doel ondernomen proeven werden echter evenmin met succes bekroond. Achtereenvolgens geven wij een overzicht van de betreffende literatuur en een korte beschrijving van de eigen proeven.

§ 1. De in de literatuur beschreven pogingen.

De mislukking van alle pogingen om het lichtemitterend proces van de levende bacteriecel te scheiden, bracht reeds Beijerinck (8) in 1891 ertoe te besluiten, dat het lichten was gebonden aan het levende protoplasma en gezien de onontbeerlijkheid van pepton voor de groei en het lichten van lichtbacteriën sprak hij de meening uit, dat de lichtemissie optreedt bij de overgang van de peptonen in „levende stof”, het protoplasma.

Macfadyan (91) trachtte het lichtend systeem van de levende cel te scheiden, door de lichtbacteriën in vloeibare lucht te brengen. De cellen weerstonden een verblijf van zes uur bij — 190° C., zonder dat hun lichtintensiteit of hun reproductie-vermogen, nadat zij weer op gewone temperatuur waren gebracht, in het minst was geschaad. Fijnwrijven bij — 190° C. voerde niet alleen tot vernietiging der bacteriecellen, doch tevens tot het verlies van het lichtgevend vermogen.

Het uitvoerigst hebben zich ook met dit onderdeel van het bioluminescentievraagstuk weer Harvey en zijn medewerkers bezig gehouden. Wij zien af van een bespreking van hun oudere publicaties (41, 59) en gaan alleen in op het meest uitgebreide en tevens meest recente onderzoek van Korr (77).

Korr onderwierp onder zorgvuldige uitsluiting van zuurstof drie verschillende soorten van lichtbacteriën — een zoetwaterbacterie *V. phosphorescens* en twee zoutwatervormen nl. *Achr. Fischeri* en een niet nader gekarakterisi-

seerde soort — aan diverse inwerkingen, waarbij de celstructuur volkomen verloren ging. Noch na cytolyse met behulp van vetoplosmiddelen of hypotonische oplossingen, noch na mechanisch fijnwrijven of na intensieve bestraling met ultra-korte geluidsgolven, nam hij bij toelaten van zuurstof het optreden van licht waar.

Bij het nagaan van de vraag, welke functies van de cel door de genoemde inwerkingen verloren waren gegaan, vond Korr, dat de verkregen preparaten nog slechts een zeer gering reductie-vermogen vertoonden t.o.v. methyleenblauw, doch dat de Nadi-test — de oxydatie van α -naphтол en dimethyl-p-phenyleendiamine tot indophenol, kenmerkend voor de indophenol-oxydase (het fermenthaemine van Warburg) — positief uitvalt. Uit zijn proeven bleek dus, dat zijn preparaten vrijwel géén dehydrogenase-activiteit bezaten.

Volledigheidshalve moeten wij opmerken, dat er in de literatuur één opgave is, waarin een positieve luciferine-luciferaseproef met preparaten uit lichtbacteriën is beschreven. Het betreft de in § 1 van hoofdstuk II reeds genoemde publicatie van Gerretsen uit 1920 (35). Gerretsen vermeldde hierin, dat de door hem, volgens de klassieke methode van Dubois (20), uitgevoerde luciferine-luciferaseproef bij *Ph. phosphoreum* negatief uitviel, doch dat hij met preparaten uit *Ph. javanense*, een lichtbacterie welke op de gewone wijze van visch uit de Indische wateren was geïsoleerd, een zeer zwak positief resultaat had verkregen.

Na Gerretsen hebben zich nog verscheidene onderzoekers aan het probleem van de verkrijging van extra-cellulaire luminescentie uit lichtbacteriën gewijd (o.a. Harvey en Korr), echter zonder het gewenste resultaat.

Wij moeten dus, afgezien van de nog niet geverifieerde, incidenteele waarneming van Gerretsen aan *Ph. javanense* beshuiten, dat het verkrijgen van lichtende, celvrije preparaten uit lichtbacteriën tot dusverre niet is gelukt.

§ 2. Eigen proeven tot het verkrijgen van lichtende preparaten uit lichtbacteriën.

Wij hebben ons op het standpunt gesteld, dat het weinig zin had de recente en onder de meest zorgvuldige voorzorgsmaatregelen verrichte proeven van Korr te herhalen en besloten, in navolging van Macfadyan (91), een poging te doen om door behandeling van lichtbacteriën met vloeibare lucht het lichtemitterend systeem van de levende cel af te scheiden en wel om twee redenen:

- 1e de behandeling met vloeibare lucht moge wellicht groote structuurveranderingen teweeg brengen, voor chemische verandering heeft men echter bij de temperatuur van vloeibare lucht nauwelijks bevreesd te zijn;
- 2e de voor korte tijd door Lynen (90) verrichte stofwisselingsproeven met gist, welke met vloeibare lucht was behandeld, alsmede de door genoemden onderzoeker daaraan verbonden beschouwingen, openden

ook voor het probleem van de extra-cellulaire luminescentie nieuwe gunstige perspectieven.

L y n e n bracht versche, aan substraten „verarmde”, gist in vloeibare lucht en vergeleek, nadat de gist weer op kamertemperatuur was gebracht, de ademhaling en de gisting hiervan met die van onbehandelde, versche gist. Bij suspendeeren van dezelfde hoeveelheden versche en bevroren gist in gelijke hoeveelheden water, bleken ademhaling en gisting van de bevroren gist zeer gering te zijn, vergeleken met die van versche gist. Volgens L y n e n moest deze geringe activiteit van de bevroren gist niet worden toegeschreven aan beschadiging van de enzymen zelve of aan beschadiging van het enzymverband, doch aan de concentratieveranderingen, welke de afzonderlijke componenten van het enzymstelsel in de reactieve fase hadden ondergaan. L y n e n bewees zijn opvatting met de volgende proeven.

Bij centrifugeeren van de bevroren en weer op kamertemperatuur gebrachte gist kreeg hij een scheiding in twee lagen, nl. een geel gekleurde, zwak opalescente vloeistof en de vaste celbestanddeelen. De aldus verkregen celvloeistof kwam in haar enzymatische eigenschappen in groote trekken overeen met het perssap volgens B u c h n e r en met maceratiesap.

Bij het bevroeringsproces worden blijkbaar de celmembranen vernietigd, de natuurlijke permeabiliteitsomstandigheden worden verstoord en de oplosbare bestanddeelen van het enzymstelsel kunnen buiten het celverband treden.

L y n e n vond nu evenwel, dat indien men de bij het centrifugeeren verkregen vaste celbestanddeelen niet in water, doch in de genoemde celvloeistof suspendeerde, waardoor dus als het ware oplosbare en onoplosbare celbestanddeelen weer vrijwel in hun natuurlijke concentraties naast elkander aanwezig waren, een stelsel werd verkregen, waarvan de enzymatische activiteit volkomen op één lijn stond met die van versche gist.

Het welslagen van L y n e n's pogingen, door bevroering een cel-desintegratie te bewerkstelligen met vrijwel volledig behoud van de enzymatische activiteit, is voor het door ons beschouwde probleem van zooveel belang, omdat bij de tot dusverre beschreven pogingen tot het verkrijgen van extra-cellulaire luminescentie uit lichtbacteriën, met name ook bij de proeven van K o r r, geen rekening werd gehouden met de bij vernietiging der cellen tegelijkertijd optredende verdunning. K o r r toch voerde de in § 1 reeds genoemde cytolyse en de bestraling met ultra-korte geluidsgolven uit met suspensies van lichtbacteriën, waarbij dus onmiddellijk na de destructie van de cel de daarin aanwezige oplosbare bestanddeelen een aanzienlijke verdunning ondergingen.

Geheel afgezien nog van de vraag, of K o r r er al of niet in is geslaagd luciferine en luciferase in actieve vorm af te scheiden van de bacteriecel, kan dus het mislukken van zijn pogingen om extra-cellulaire luminescentie uit lichtbacteriën te verkrijgen, ook reeds worden verklaard vanuit het door L y n e n naar voren gebrachte gezichtspunt.

Dit zou de oorzaak kunnen zijn, dat de door K o r r bereide celvrije preparaten géén of slechts een zeer geringe dehydrogenase-activiteit bezaten.

Aangezien nu de bevroeringsmethode volgens L y n e n, in tegenstelling tot de door K o r r toegepaste destructie-methoden, in principe scheen te kunnen leiden tot een zoodanige desintegratie van het celverband, dat daarbij de enzymatische activiteit blijft behouden, leken de kansen op een positief resultaat geenszins denkbeeldig.

De voor de proeven benodigde lichtbacteriën (*Ph. phosphoreum* ¹⁾) werden gekweekt in wijdmondsche glazen flesschen van 10 liter, welke om overschuimen te voorkomen slechts voor ongeveer de helft met de cultuurvloeistof werden gevuld.

De cultuurvloeistof had de volgende samenstelling:

30 gram keukenzout,
20 gram pepton-Poulenc,
20 gram glycerine,

opgelost in leidingwater tot een volumen van 1 liter.

Na het oplossen werd de pH met een verdunde oplossing van NaOH gebracht op ca 7.4, waarna de cultuurvloeistof werd gesteriliseerd.

Toevoeging van 20 cm³ steriel gistwater per liter cultuurvloeistof had een zeer gunstig effect op de groei en de lichtintensiteit van de bacteriën. Ter bekorting van de „lag-time” entten wij zwaar.

Het kweeken geschiedde bij een temperatuur van 16 à 18° C., onder voortdurend doorleiden van fijn verdeelde lucht, door middel van een luchtperspomp. De fijne verdeling van de doorgeblazen lucht werd bereikt met aquarium-steentjes, welke door middel van rubber slangetjes aan de centrale toevoerbuiss waren verbonden. Na 18 à 22 uur werd de cultuur, die een schitterend licht verspreidde, in een Sharpless super-centrifuge bij een toerental van 24.000 per minuut afgecentrifugeerd. De bacteriemassa werd vervolgens in de Sharpless-centrifuge gewasschen met een 3 %-ige NaCl-oplossing. De opbrengst bedroeg per flesch gemiddeld 40 à 60 gram vochtige bacteriën, met een gehalte aan droge stof van $\pm 30\%$.

Terloops moge hier worden opgemerkt, dat dit droge stof-gehalte overeenstemt met dat van verse gist, zooals deze door Lynen werd gebruikt.

De aldus verkregen bacteriemassa brachten wij op een roerstaaf direct in vloeibare lucht. Na een uur werd de bevroren massa snel van de staaf afgebrokkeld en in een centrifugebuis overgebracht, welke, na met een rubber stop te zijn gesloten, in water van kamertemperatuur werd opgewarmd. Na het bereiken van de kamertemperatuur bleken de bacteriën nog zeer intensief te lichten.

Vervolgens centrifugeerden wij de bacteriemassa gedurende 15 minuten bij een toerental van 3500 per minuut. Er bleek hierna evenwel geen scheiding in twee lagen, zooals bij de overeenkomstige proeven van Lynen met gist, te zijn opgetreden. Het gelukte niet de gewenschte scheiding in twee fasen te bewerkstelligen, zelfs niet, nadat wij alvorens te centrifugeeren de bacteriemassa achtereenvolgens tien maal in vloeibare lucht hadden gebracht en weer opgewarmd. De lichtintensiteit van de bacteriën was na deze behandeling nog aanzienlijk; eerst na dertien maal bevriezen en opwarmen viel een duidelijke afneming der lichtintensiteit te constateeren. Het meest teleurstellend was intusschen, dat kweekproeven uitwezen, dat een groot percentage van de cellen

1) Afkomstig uit de verzameling van het Laboratorium voor Microbiologie der Technische Hoogeschool te Delft.

na dertien maal met vloeibare lucht te zijn behandeld, nog over hun reproductievermogen beschikten en dus volledig intact waren gebleven.

Dat echter van een deel der cellen door het bevroeringsproces de celmembranen waren vernietigd, bleek, door een bevroren en weer opgewarmde bacteriemassa te schudden met enkele cm³ 3%-ige NaCl-oplossing. Na afcentrifugeeren vormde zich thans een heldere, geelgekleurde vloeistoflaag, die bij toevoeging van azijnzuur een dik eiwitneerslag gaf. Een contrôleproef met lichtbacteriën, die niet aan de inwerking van vloeibare lucht waren onderworpen geweest, leverde onder overigens dezelfde omstandigheden een kleurloos centrifugaat, dat geen opgeloste eiwitten bevatte.

De door afcentrifugeeren verkregen lichtgele vloeistof zond géén licht meer uit; evenmin na voorafgaande reductie door toevoeging van een kleine hoeveelheid Na₂S₂O₄. Teneinde eenig inzicht te krijgen in de vraag, welke celbestanddelen onder de gekozen omstandigheden buiten de cel waren getreden, werd het absorptiespectrum van het geelgekleurde centrifugaat bepaald. Ondanks het feit, dat het absorptiespectrum geen scherp uitgesproken karakteristieken vertoonde, waren toch in het spectrum twee goed aanwijsbare aanduidingen voor maxima aanwezig, resp. bij ca. 470 mμ en bij ca. 410 mμ. Reeds aanstonds rees hierdoor de gedachte, dat in het centrifugaat een *compleet geel ferment* aanwezig zou zijn, waarbij het opviel, dat de toppen ver naar de zijde van het rood zijn verschoven. (Zie voor een recent overzicht van de liggingen der absorptie-maxima van verschillende flavine-fermenten het artikel van Ball (6)). Door behandeling van het centrifugaat met verdund azijnzuur en methanol, werden onder afsplitsing van de kleurstofcomponent, de opgeloste eiwitten neergeslagen. Het absorptiespectrum van de overblijvende gele oplossing vertoonde thans het *voor lacto-flavine kenmerkende maximum bij ca 445 mμ*. Hierdoor wint de hierboven uitgesproken gedachte aan waarschijnlijkheid.

Hoewel is gebleken, dat door het bevroeringsproces, althans van een deel der lichtbacteriën de celmembranen worden gedeutereerd, hebben wij het doel van dit onderzoek, de scheiding van de cel-massa in twee fasen, die ieder op zich geen licht uitzenden, doch bij combinatie weer licht geven, niet kunnen verwezenlijken.

§ 3. Verdere mogelijkheden en proeven.

Nu de pogingen om het complete, bij de lichtreactie betrokken enzym-systeem in actieve vorm van de bacteriecel af te scheiden, een negatief resultaat hadden opgeleverd, vroegen wij ons af, of het niet mogelijk zou zijn de intacte bacteriën zelf als testobject te gebruiken voor het aantoonen van het laag-moleculaire deel van het lichtgevend systeem, het luciferine.

De mogelijkheid hiertoe scheen gegeven, bij een nadere beschouwing van de door Johnson (66, 67) verrichte proeven over de totale hoeveelheid licht, welke door een suspensie van lichtbacteriën kan worden uitgezonden. Johnson toonde, zooals in hoofdstuk III § 2 reeds werd opgemerkt, aan, dat een pepton-vrije suspensie van *Ph. Fischeri*, welke een overmaat veradembaar koolhydraat bevatte, na eenige uren aereeren ± 90 % van zijn lichtintensiteit had verloren, terwijl daarentegen de ademhaling in die tijd slechts weinig was teruggelopen. Hij verklaarde dit, door aan te nemen, dat het in de bacteriecellen aanwezige luciferine irreversibel in de lichtreactie wordt verbruikt, terwijl door het ont-

breken van een assimileerbare stikstofbron, de vorming van nieuw luciferine niet mogelijk is. Uit het vrijwel constant blijven van de ademhaling mogen wij besluiten, dat de activiteit van de daarbij betrokken enzymsystemen dezelfde is gebleven. Johnson's verklaring van het beschreven verloop der lichtintensiteit berust op de veronderstelling, dat ook de luciferase-activiteit niet is afgenomen en dat de afneming der lichtintensiteit uitsluitend is te wijten aan een afneming van de luciferine-concentratie en dus in laatste instantie van de door Johnson met L aangeduide stof, die wij dehydro-luciferine hebben genoemd.

In beginsel bezaten wij nu de volgende testmogelijkheid.

Door aereeren van een bacteriesuspensie onder de door Johnson aangegeven omstandigheden, putten wij de in de bacteriën aanwezige hoeveelheid luciferine, resp. dehydro-luciferine, uit; vervolgens voegen wij op zeker moment een extract, bereid uit goed lichtende bacteriën, toe aan de geaereerde suspensie. Lukt het inderdaad op deze wijze nieuw luciferine, resp. dehydro-luciferine, in de bacteriecellen te brengen, dan zal zich dit kenbaar moeten maken in een verhooging van de lichtintensiteit.

Ook met deze partiële lichttest, welke dus alleen op het luciferine was gericht, hadden wij echter geen succes.

De proeven werden eveneens gedaan met *Ph. phosphoreum*. De bepaling van de lichtintensiteit der bacteriesuspensie geschiedde in relatieve maat, volgens de door Eymers en van Schouwenburg uitgewerkte (27) en op blz. 56 van dit proefschrift beschreven visuele methode.

De extracten uit lichtbacteriën werden onder zoo mild mogelijke omstandigheden bereid, zoowel uit verse, als uit in vacuum boven silicagel gedroogde bacteriën. De extractie geschiedde met 80%-ige methanol, welke 1½ % HCl bevatte, onder koolzuur, zoowel bij kamer- als bij kooktemperatuur. Hierbij zij opgemerkt, dat volgens Harvey *Cypridina*-luciferine bestand is tegen 6 uur koken met 20%-ig HCl.

Er ontstond een vrijwel wit neerslag van gedenatureerde eiwitten, dat door centrifugeeren van de gele oplossing werd gescheiden. Het gele cel-extract werd bij kamertemperatuur in vacuum drooggedampt en het residu werd opgenomen in een weinig van het suspensiemedium, dat bestond uit een oplossing, welke 2% NaCl, ¼ m fosfaatbuffer van pH ± 7.4 en 1½ % glucose bevatte. Van de verkregen oplossing voegden wij een kleine hoeveelheid toe aan de aan luciferine „verarmde” bacteriesuspensie. Een positief effect was in geen enkel geval waar te nemen.

In verband met zekere aanwijzingen voor een relatie tusschen lactoflavine en het lichtemitterend proces (zie hoofdstuk V), gingen wij eveneens de invloed na van een geringe hoeveelheid lactoflavine op de lichtintensiteit van de op bovengenoemde wijze „verarmde” bacteriesuspensies. Ook hiervan was het effect nihil.

Het is moeilijk om voor het mislukken van deze, in beginsel toch veelbelovende, test een oorzaak aan te wijzen.

Men zou zich kunnen voorstellen, dat het op de bovenbeschreven wijze niet is gelukt, om bacterie-luciferine (resp. dehydro-luciferine) uit de bacteriecel te extraheeren. Het betreft hier echter de extractie van een, hoogst waarschijnlijk laag-moleculaire, component, welke wij mogen vergelijken met *Cypridina*-luciferine. Uit het werk van Anderson (4) is nu bekend, dat *Cypridina*-luciferine onder de toegepaste omstandigheden stellig in actieve vorm zou zijn

geëxtraheerd. Het is natuurlijk mogelijk, dat na de extractie oxydatie door luchtzuurstof of een andere omzetting heeft plaatsgevonden, welke tot inactieve stoffen heeft geleid. In dit geval zouden wij echter gedwongen zijn, het bacterieluciferine principieel andere eigenschappen toe te kennen dan het *Cypridina*-luciferine, iets waartoe tot dusverre geen enkele experimentele ervaring aanleiding geeft.

Ook is het mogelijk, dat, ondanks het toevoegen van een weliswaar actief extract, de permeabiliteit van de bacteriecel voor de toegevoegde stoffen nog een essentiële rol speelt.

De discussie van deze en andere mogelijke oorzaken valt echter buiten het kader van dit proefschrift.

§ 4. Slotbeschouwing.

Overeenkomstig de geringe verwachtingen, die wij na de bestudeering van de betreffende litteratuur koesterden, zijn onze pogingen tot isoleering van een lichtgevend luciferine-luciferase systeem uit lichtbacteriën (*Ph. phosphoreum*) niet met succes bekroond. Evenmin gelukte het, uit goed-lichtende bacteriën een stof te extraheeren, die bij toevoeging aan een bacteriesuspensie, welke door langdurig aereeren bij aanwezigheid van een overmaat glucose aan luciferine was verarmd, een herstel van de lichtintensiteit bewerkte.

Bij beschouwing van de vraag, waarom het lichtgevend systeem bij lichtbacteriën niet buiten de levende cel is te verkrijgen, zijn de volgende mogelijkheden denkbaar:

- 1e het lichtgevend systeem is in die organismen, waarvan de luminescentie aan de levende cellen is gebonden, van andere aard dan in de gevallen van luminescente excreties;
- 2e de luciferase kan al naargelang van het betreffende organisme als lyo-, endo- of desmo-enzym aanwezig zijn.

De eerste mogelijkheid is weinig aannemelijk, omdat, zooals in hoofdstuk III is uiteengezet, de bij het onderzoek van de bioluminescentie der lichtbacteriën verkregen resultaten sterk pleiten voor de aanwezigheid van een luciferine-luciferase systeem, overeenkomend met dat bij *Cypridina*.

De tweede mogelijkheid achten wij veel waarschijnlijker. Er zijn namelijk organismen bekend, zooals *Cypridina* en de visch *Malacocephalus*, die een celvrij, lichtgevend slijm afscheiden. In deze gevallen heeft luciferase het karakter van een lyo-enzym. Andere organismen, zooals de vuurvliegen, geven weliswaar een positieve luciferine-luciferase reactie, doch scheiden onder normale omstandigheden hun lichtend systeem niet buiten de cel af; hier moeten wij de luciferase dus beschouwen als een endo-enzym.

Het ligt voor de hand aan te nemen, dat er ook organismen zullen zijn, waarin de luciferase als desmo-enzym, waarvan de activiteit is gebonden aan de structuur van de cel, aanwezig is.

Men moet hierbij bedenken, dat de grenzen tusschen de drie genoemde enzym-groepen geenszins scherp zijn. Uiteindelijk moet men aannemen, dat deze indeeling, vooral voor wat betreft de endo- en de desmo-enzymen meer een kwestie is van experimenteele techniek, dan dat zij op een wezenlijk onderscheid berust.

Wij hebben ons in dit hoofdstuk bepaald tot het geven van een algemeene beschouwing en hebben, aangezien onze proeven niet tot een positief resultaat hebben gevoerd, de beschrijving daarvan tot de hoofdzaken beperkt.

Hoewel in dit stadium van het onderzoek de kansen voor een directe chemische aanval op het vraagstuk der bioluminescentie in lichtbacteriën weinig gunstig leken, was er nog in het werk van Eymers en van Schouwenburg (27) en in een naar aanleiding van hun resultaten verricht onderzoek van Doudoroff (19) een aanduiding te vinden, dat mogelijkerwijze het lactoflavine of een daarmee nauw verwant molecule betrokken zou zijn bij het lichtemitterend proces. De bespreking van deze onderzoekingen en van het eigen in verband daarmee verrichte werk vormt het onderwerp van het volgende hoofdstuk.

HOOFDSTUK V.

BIOLUMINESCENTIE EN LACTOFLAVINE.

§ 1. De beteekenis van lactoflavine voor de lichtemissie.

Zooals in § 2 van hoofdstuk III reeds is opgemerkt, toonden Eymers en van Schouwenburg (27) aan, dat in lichtbacteriën de lichtemissie is verbonden met een voor HCN slechts weinig gevoelig deel van de totale ademhaling. Dit deed bij hen dadelijk het vermoeden rijzen, dat de niet HCN-gevoelige lichtademhaling der lichtbacteriën, evenals de in normale „donkere” cellen voorkomende niet HCN-gevoelige ademhalingsprocessen, op één of andere wijze zou samenhangen met een geel ferment en dus uiteindelijk met de aanwezigheid van lactoflavine in de cellen.

Zij vonden steun voor dit vermoeden, door een eveneens door hen uitgevoerd onderzoek naar de spectrale intensiteitsverdeling van het door diverse lichtbacteriestammen uitgezonden licht en van het licht uitgezonden door enkele chemoluminescente reacties (26), benevens dat van een aantal biologisch belangrijke fluoresceerende stoffen (28). De leidende gedachte bij dit onderzoek was, dat chemoluminescentie (bioluminescentie) en fluorescentie fysisch zeer nauw verwante processen zijn. In beide gevallen komt de lichtemissie tot stand, doordat een aangeslagen molecule in een lagere energietoestand terugvalt. De wijze, waarop de moleculen in aangeslagen toestand zijn geraakt, is echter verschillend. In het geval van de chemoluminescente (bioluminescente) reactie wordt door de vrijkomende reactie-energie een molecule aangeslagen, terwijl bij de fluorescentie de aanslag plaats vindt door absorptie van van buiten af ingestraalde energie.

De gevonden spectra werden geanalyseerd door aan te nemen, dat deze uit één of meer verbrede grondfrequenties waren opgebouwd. Eymers en van Schouwenburg merkten namelijk op, dat de spectra van chemoluminescente reacties in de gasphase steeds één of meer lijnen — overeenkomende met karakteristieke frequenties — vertoonen en veronderstelden, dat dit althans in beginsel in de vloeibare phase ook zoo zou zijn. In dit geval zou echter, ten gevolge van de invloed van het medium, een symmetrische verbreding van de grondfrequenties plaats vinden. Zij namen dus aan, dat de bioluminescentie- (chemoluminescentie- en fluorescentie-) spectra uit symmetrisch verbrede grondfrequenties waren opgebouwd. Bij uitzetten van de spectrale energieverdeling tegen de frequenties, moest het dan volgens hen anderzijds mogelijk zijn, de aldus verkregen spectra te analyseren, door ze in symmetrisch verbrede grondfrequenties te doen uiteenvallen.

Eymers en van Schouwenburg verkregen de volgende resultaten:

- 1e van de door hen onderzochte lichtbacteriestammen *Ph. phosphoreum*, *Ph. splendens* en *V. Sonnenschein* waren de emissiespectra identiek en tevens onafhankelijk van diverse uitwendige omstandigheden als pH, temperatuur, zoutgehalte van het suspensiemedium en ouderdom der cultuur. Zij leidden hieruit af, dat in al deze gevallen één en hetzelfde molecule voor de lichtemissie verantwoordelijk moest zijn;

2e alle onderzochte spectra bleken uit een slechts gering aantal grondfrequenties te zijn opgebouwd. Zij vonden voor lactoflavine een in zijn geheel symmetrisch en dus uit slechts één grondfrequentie opgebouwd fluorescentiespectrum en deze zelfde grondfrequentie bleek nu voor te komen in de bioluminescentiespectra der lichtbacteriën.

Het scheen dus, alsof hun hypothese, dat lactoflavine op een of andere wijze met het lichtemitterend proces der lichtbacteriën zou samenhangen, aanmerkelijke steun had ontvangen.

Inmiddels is echter, door voortgezet onderzoek van Mej. A. van der Burg over de emissiespectra der lichtbacteriën en van schrijver dezes in samenwerking met Mej. A. van der Burg, Dr. P. B. Rottier en den Heer F. A. Rodrigo over het fluorescentiespectrum van lactoflavine (nog niet gepubliceerd) komen vast te staan, dat tegen de door Eymers en van Schouwenburg uitgevoerde analyses der emissiespectra bezwaren zijn aan te voeren en dat in het bijzonder zoowel het door hen gepubliceerde luminescentiespectrum der lichtbacteriën, als het fluorescentiespectrum van lactoflavine, nog correctie behoeft. Ten gevolge hiervan moet de aanvankelijk gegeven interpretatie der spectra zeker nog worden herzien.

De opvatting van Eymers en van Schouwenburg, dat lactoflavine betrokken zou zijn bij de lichtemissie der lichtbacteriën, gaf Doudoroff (19) aanleiding, de invloed van lactoflavine na te gaan op de lichtintensiteit van halfdonkere en donkere varianten, welke door vrijwillige dissociatie waren ontstaan, uit een goed lichtende stamcultuur van *Ph. phosphoreum*. Doudoroff veronderstelde, dat in deze varianten het normale ademhalingsproces (de haemine-ademhaling) het met de lichtemissie verbonden ademhalingsproces in meerdere of mindere mate had teruggedrongen en merkte nu op, dat het mogelijk was, sommige van de halfdonkere varianten van *Ph. phosphoreum* weer goed tot lichten te brengen door een extra toevoeging van lactoflavine aan het cultuurmedium.

Bij gebruik van een voedingsmedium, dat als stikstofbron pepton Witte bevatte, constateerde hij, dat alleen die halfdonkere varianten met vergroting van de lichtintensiteit op lactoflavine-toevoeging reageerden, waarvan ook de groei slechts na toevoeging van lactoflavine aan het cultuurmedium optrad. Quantitatief liepen de in deze twee gevallen benodigde hoeveelheden lactoflavine echter sterk uiteen. Voor het optreden van normale groei was de toevoeging van 0.02 γ lactoflavine per cm^3 cultuurmedium voldoende; de bacteriën behielden dan echter hun geringe lichtintensiteit. Met hun lichtintensiteit reageerden de lichtbacteriën eerst op een toevoeging van grootere hoeveelheden lactoflavine. Door de lactoflavine-concentratie tot 10 γ per cm^3 cultuurmedium op te voeren, gelukte het Doudoroff de intensiteit van de betreffende halfdonkere varianten gelijk te maken aan die van een niet-gedissocieerde goed lichtende stam.

Bij overenten van een aldus met lactoflavine weer tot goed lichten gebrachte variant op een lactoflavine-arme voedingsbodem werden de bacteriën weer halfdonker, hetgeen bewees, dat het hier een directe werking van het lactoflavine op de lichtemissie betrof.

Een invloed van lactoflavine-toevoeging op de ademhaling kon Doudoroff in geen enkel geval vaststellen. Bovendien veroorzaakte de toevoeging van lacto-

flavine aan de voor deze ademhalingsmetingen gebruikte halfdonkere variant tijdens de proefduur van drie uren geen verhooging van de lichtintensiteit der bacteriën. Doudoroff concludeerde uit zijn proefnemingen, dat de betreffende halfdonkere varianten het vermogen hadden verloren, zelf voldoende lactoflavine te produceeren en dat zijn proeven tevens steun gaven aan de opvatting van Eymers en van Schouwenburg, dat lactoflavine of een derivaat daarvan nauw bij de lichtemitterende reactie zou zijn betrokken. („it is probable that flavin or some derivative of it is one of the enzymes involved in the luminescence of bacteria”).

Bij een critische beschouwing van de proeven van Doudoroff moet worden toegegeven, dat lactoflavine inderdaad onder bepaalde omstandigheden in staat is, om het lichtemitterend vermogen van een bacteriestam, die dit vermogen gedeeltelijk heeft verloren, weer te herstellen. Dit behoeft echter geenszins in te houden, dat lactoflavine of een derivaat daarvan rechtstreeks bij de lichtemissie zelve is betrokken. Doudoroff vond geen *directe* werking van lactoflavine op de lichtemissie, doch slechts via een complete groeicyclus, waarin het geheele enzymatische systeem der cel en dus ook het lichtemitterend systeem, opnieuw was gesynthetiseerd. Zijn proeven bewijzen dus hoogstens, dat onder bepaalde omstandigheden lactoflavine onmisbaar is voor de vorming van de bij de lichtreactie betrokken moleculen en geenszins, dat lactoflavine een directe rol speelt bij, en dus één der componenten is van, het lichtemitterend systeem.

Een dergelijke, meer indirecte rol van lactoflavine in het bioluminescentieproces is volkomen in overeenstemming met de universeele beteekenis, welke de flavine-enzymen (de gele fermenten) in het stofwisselingsproces der cellen hebben. Men zie hiervoor bijv. het recente overzichtsartikel van Ball (6).

Een directe medewerking van lactoflavine bij de lichtemissie leek ons ook reeds minder waarschijnlijk, gezien het resultaat van een onderzoek, dat door Dr. P. B. Rottier op ons verzoek werd uitgevoerd.

Hierbij werd, op de door Rottier (102) beschreven methode, het lactoflavinegehalte bepaald van eenige culturen van *Ph. phosphoreum*:

- a. een cultuur van een goed lichtende stam;
- b. een cultuur van een donkere stam;
- c. een cultuur van een goed lichtende stam, welke cultuur echter door voortgezet aereeren langzamerhand donker was geworden.

Binnen de nauwkeurigheidsgrenzen der bepalingsmethode stemden de lactoflavine-gehalten van de bacteriën onder a, b en c genoemd met elkaar overeen.

Dit resultaat pleit al evenmin ten gunste van de door Doudoroff getrokken conclusie.

De physiologisch wel zeer hoge dosis lactoflavine, welke voor het optreden van het door hem waargenomen effect op de lichtintensiteit noodig is, scheen het intusschen mogelijk te maken, dat bij dit effect eerder een omzettingsproduct van lactoflavine, dan het lactoflavine zelve werkzaam zou zijn.

Onder meer in verband hiermede, besloten wij een poging te wagen, uit *Ph. phosphoreum* flavine in kristallijne toestand te isoleeren en dit te vergelijken met synthetisch lactoflavine.

§ 2. De isoleering van lactoflavine als kristallijn lactoflavine-tetraacetaat uit *Ph. phosphoreum*.

Men is in staat geweest, lactoflavine en lactoflavine-derivaten uit zeer uiteenlopende biologische materialen, zoowel van dierlijke als plantaardige oorsprong, in kristallijne toestand te isoleren (25, 38, 72 t/m 75, 81 t/m 86, 99, 111, 120). Tot dusverre is de isoleering uit bacteriën echter nog niet beschreven.¹⁾

Bij het zoeken naar een geschikte isoleeringsmethode kregen wij aanvankelijk de indruk, dat deze in zijn geheel in de zeer uitgebreide literatuur over dit onderwerp voor ons gereed zou liggen. Het blijkt echter telkens weer bij werken met biologisch materiaal, dat de voor ieder materiaal specifieke begeleidende stoffen het opstellen van algemeen geldige isoleeringsmethoden vrijwel onmogelijk maken. Ook in ons geval waren wij gedwongen diverse in de literatuur beschreven methoden gecombineerd te gebruiken. Zonder dat wij genoodzaakt waren principieel nieuwe scheidingstrappen in te voeren, wijkt de door ons gevolgde reinigingsmethode toch weer af van de voor ander uitgangsmateriaal beschreven methoden. Het is om deze reden, dat wij, met weglating van overbodige bijzonderheden, de diverse reinigingstrappen zullen beschrijven.

a. Het bacteriemateriaal en de extractie.

Wij besloten als uitgangsmateriaal *Ph. phosphoreum* te gebruiken. Het kweken geschiedde geheel volgens de op blz. 27 beschreven methode. Per dag verkregen wij 40 à 60 gram vochtige bacteriën. In totaal hebben wij ruim 3 kg vochtige bacteriën, overeenkomende met een drooggewicht van ca 1000 gram, opgewerkt.

De extractie geschiedde in twee trappen. De afgecentrifugeerde en met een 3%-ige oplossing van NaCl gewassen bacteriemassa werd gedurende de periode dat wij dagelijks kweekten, bewaard in 80%-ige methanol. Nadat wij een voldoende hoeveelheid lichtbacteriën hadden gekweekt, hevelde wij het heldere methanol-extract af en kookten de bacteriemassa uit met 5 l. 2 %-ig azijnzuur. Na afcentrifugeeren werden het methanolextract en het azijnzuur-extract vereenigd en in vacuum ingedampt tot een volumen van ± 4 l.

De oplossing was sterk troebel en bevatte naast lipoiden nog veel eiwitten. De lipoiden en het grootste deel der eiwitten konden wij verwijderen, door de oplossing te schudden met één vierde van zijn volumen aan chloroform. De waterlaag en de chloroformlaag werden door centrifugeeren gescheiden. Het aldus voorgereinigde waterige extract was de uitgangsooplossing voor de isolee-

¹⁾ In één geval echter wel uit het cultuurmedium waarin bacteriën waren gegroeid. De Japansche onderzoeker Yamasaki (120) constateerde namelijk, dat aceton-butylalkoholbacteriën onder bepaalde omstandigheden groote hoeveelheden lactoflavine in het cultuurmedium afscheiden en slaagde er in, uit de door centrifugeeren van bacteriën bevrijde cultuurvloeistof lactoflavine in kristallijne toestand af te zonderen.

ring van het flavine. Wij volgden iedere reinigingstrap quantitatief, door bepaling van het lactoflavine-gehalte volgens de door Rottier (102) beschreven methode. Tevens werden ook van de bij het reinigingsproces verworpen oplossingen steeds de absorptiespectra bepaald, teneinde vast te stellen, dat daarin geen stoffen voorkwamen, welke in het voor lactoflavine kenmerkende gebied een specifieke absorptie vertoonden. Reeds dadelijk moge worden opgemerkt, dat dit nimmer het geval was; de bij de zuivering opgetreden verliezen aan lactoflavine zijn dus aan onvolledige elutie te wijten.

Het uitgangsextract had een volumen van 4 liter en bevatte in totaal 48 mg flavine.

b. De opwerking van het ruwe extract.

1. *Adsorptie aan frankoniet KL.*

Aan het uitgangsextract voegden wij 25 cm³ 10 %-ig HCl en 125 g frankoniet KL toe. Na een half uur schudden centrifugeerden wij de suspensie in de Sharpless-centrifuge af. Het centrifugaat was vrijwel kleurloos en bevatte dus geen flavine meer. Het frankoniet werd éénmaal gewasschen met ½ %-ig HCl.

Wij vermeden de toepassing van een groote overmaat frankoniet, aangezien hieraan tevens een blauwfluoresceerende verontreiniging werd geabsorbeerd. Wij hebben in de loop der isoleering de ervaring opgedaan, dat de quantitative scheiding tusschen het (geelgroen fluoresceerende) flavine en deze blauw fluoresceerende verontreiniging zeer moeilijk is.

De elutie van het frankoniet-adsorbaat geschiedde volgens Green en Black (38) met 3½ l. 0.1 n NaOH in 60 %-ige aethanol. Onmiddellijk na de afscheiding van het frankoniet zuurden wij het eluaat aan met verdund azijnzuur. Na verwijdering van het gevormde neerslag werd het grootste deel van de alcohol in vacuum afgedestilleerd; het volumen van het aldus verkregen eluaat bedroeg 1½ l., met een gehalte van 23.7 γ flavine per cm³. In totaal dus ± 35 mg flavine.

2. *Adsorpties aan loodsulfide.*

(volgens Ellinger en Koschara (25)).

1e adsorptie aan loodsulfide.

Aan het frankoniet-eluaat werden 15 g Pb-acetaat en 5 g Na-acetaat toegevoegd. Na verzadiging van de oplossing met H₂S en afcentrifugeeren van het PbS waschten wij dit éénmaal met verdund azijnzuur uit. De elutie van het aan PbS geadsorbeerde flavine geschiedde, door het PbS viermaal achtereenvolgens met 1 l. gedestilleerd water uit te koken. Na indampen in vacuum bedroeg het volumen van het helder gele eluaat 2 l., met 12.1 γ flavine per cm³. In totaal dus ± 25 mg flavine.

2de adsorptie aan loodsulfide.

Aan het eluaat van de eerste PbS-adsorptie voegden wij 10 g Pb-acetaat toe en verzadigden de oplossing met H₂S. Het uitwasschen en de elutie van

het PbS geschieden op overeenkomstige wijze als bij de eerste adsorptie aan PbS. Het volumen van het ingedampde eluaat bedroeg 375 cm^3 met 49.5γ flavine per cm^3 , in totaal dus 18.5 mg flavine.

3e adsorptie aan loodsulfide.

Aan het eluaat van de tweede PbS-adsorptie voegden wij 3.75 g Pb-acetaat toe en verzadigden de oplossing met H_2S . Na uitwasschen van het PbS-neerslag kookten wij dit driemaal met telkens 300 cm^3 water uit. Na indampen van het eluaat tot op een volumen van 120 cm^3 bedroeg het flavine-gehalte 135.8γ per cm^3 . In totaal dus 16.3 mg flavine.

Verschillende malen is men er reeds in geslaagd (zie o.a. Kuhn (86), Raffy en Mirimanoff (99)) om na herhaalde adsorptie aan PbS kristallijne flavine-preparaten in handen te krijgen. In ons geval lukte dit na deze reinigingstrap nog niet. Wel verkregen wij door indampen van het laatstgenoemde eluaat kristallijne neerslagen, doch deze bestonden slechts voor een deel uit flavine. Bovendien bleek bij meting van het absorptiespectrum, dat onze preparaten nog een in het ultraviolet zeer sterk absorbeerende verontreiniging bevatten. Ongetwijfeld hangt dit geheel samen met de aard van het betreffende biologische uitgangsmateriaal.

3. *Precipitatie van het flavine als zilverzout.*

(volgens Kuhn en Wagner-Jauregg (84, 85)).

Het eluaat van de derde PbS-adsorptie werd met NH_4OH juist geneutraliseerd en vervolgens werd een overmaat 5% -ige AgNO_3 -oplossing toegevoegd. Na het roodbruine zilverzout te hebben afgecentrifugeerd, wuschen wij dit tweemaal met gedestilleerd water uit. Het zilverzout werd gesuspenderd in 100 cm^3 $2\frac{1}{2} \%$ -ig azijnzuur en vervolgens door inleiden van H_2S ontleend.

Na afcentrifugeeren wuschen wij het Ag_2S éénmaal uit met 100 cm^3 gedestilleerd water en nog eens met 25 cm^3 warm $2\frac{1}{2} \%$ -ig azijnzuur. Het flavine bevond zich in het centrifugaat, dat door uitkoken van H_2S werd bevrijd. Volumen 225 cm^3 , met 63.1γ flavine per cm^3 . In totaal dus 14.2 mg flavine.

Opnieuw trachtten wij door indampen kristallijn flavine te verkrijgen. Ook nu weer bevatten de kristallijne neerslagen wisselende hoeveelheden flavine, terwijl het absorptiespectrum nog steeds de aanwezigheid van een in het ultraviolet sterk absorbeerende verontreiniging vertoonde. Blijkbaar hadden wij te maken met verontreinigende stoffen, waarvan het adsorptiegedrag en de oplosbaarheid veel overeenkomst vertoonden met die van het flavine.

Wij besloten daarom van verdere reinigingspogingen in waterig milieu af te zien en over te gaan tot chromatografische adsorptie uit een organisch oplosmiddel. Hiertoe was het noodig het flavine om te zetten in een derivaat dat, in tegenstelling met het flavine zelf, uit waterig milieu met organische oplosmiddelen kan worden uitgeschud. Als zoodanig waren geschikt het tetraacetaat, het tetrabenzooat en de acetonverbinding. Wij kozen het tetraacetaat.

Hoe subtiel ook in dit geval de reinigingsprocedure nog was, moge blijken

uit het feit, dat wij door chromatografische adsorptie van het tetraacetaat aan Al_2O_3 uit benzol niet, doch uit aethylacetaat wèl tot een zuiver kristallijn preparaat konden geraken.

4. *Omzetting van het flavine in het tetraacetaat en chromatografische adsorptie hiervan aan Al_2O_3 .*

a. volgens K a r r e r en S c h ö p p (73).

Nadat de flavine-oplossing, afkomstig van reinigingstrap 3, in vacuum was drooggedampt, extraheerden wij het flavine uit de droge rest, door deze drie-maal met telkens 10 cm^3 droge pyridine uit te koken. Het pyridine-extract werd daarna in vacuum tot op 10 cm^3 ingedampt. Aan de pyridine-oplossing voegden wij $2\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ azijnzuur-anhydride toe. Nadat de oplossing eenige uren had gestaan, werd zij gedurende één minuut gekookt. Na afkoeling verdunnen wij met 20 cm^3 chloroform. Het verkregen mengsel goten wij hierna onder ijs-koeling langzaam uit in een overmaat 2 n HCl (de reactie moest na afloop nog zuur zijn op Congo-papier). De chloroformlaag, die al het flavine als tetraacetaat bevatte, werd gewasschen met ijskoud verdund HCl en tweemaal met gedestilleerd water en daarna gedroogd op natriumsulfaat.

Na affiltreeren van het chloroformextract dampen wij in vacuum het chloroform af en namen de kristallijne rest op in 50 cm^3 absolute benzol.

De benzol-oplossing werd onderworpen aan chromatografische adsorptie aan Al_2O_3 (volgens B r o c k m a n n); lengte van de kolom 15 cm, doorsnede 1 cm.

De adsorptie verliep niet mooi; een scherpe scheiding in ringen trad niet op. Boven in de buis bevond zich een bruine laag, welke diffuus overging in een breed lichtgeel gebied. Bij ontwikkeling van het chromatogram met benzol, welke een spoor methanol bevatte, werd het beeld niet veel beter.

Het lichtgele gebied van de Al_2O_3 -zuil werd apart genomen en geëluëerd met benzol-methanol 1 : 1. Het eluaat werd in vacuum drooggedampt en het residu werd opgenomen in eenige cm^3 gedestilleerd water. Na toevoeging van iets azijnzuur dampen wij de oplossing in tot op een volume van 1 cm^3 . Bij staan in de ijskast vormden zich weliswaar kristallen, doch deze waren onder het microscoop niet homogeen.

Wij besloten opnieuw te chromatografeeren, echter nu volgens K u h n en K a l t s c h m i t t met aethylacetaat als oplosmiddel.

b. volgens K u h n en K a l t s c h m i t t (83).

De onder a verkregen flavine-oplossing werd in vacuum drooggedampt en het residu werd opnieuw volgens de onder a beschreven methode geacetyleerd, om eventueel door verzeeping ontstaan flavine weer om te zetten in het tetraacetaat. Thans namen wij echter de droge rest na het verdampen van de chloroform op in alcoholvrije aethylacetaat. Ditmaal verliep de chromatografische adsorptie voortreffelijk; er werd ontwikkeld met aethylacetaat.

Wij verkregen twee scherp gescheiden lagen:

1e. een bruingele laag van $\pm \frac{1}{4}$ cm breedte, geheel boven in de buis;

2e. een gele laag van ± 1 cm breedte.

In het filtraat bevond zich een intensief blauw fluoresceerende verontreiniging.

De lagen onder 1e en 2e werden apart geëluëerd.

1e. *de bruingele bovenlaag.*

Elutie met aethylacetaat-methanol 4 : 1. Het eluaat werd in vacuum ingedampt en het restant opgenomen in gedestilleerd water. In een willekeurige verdunning bepaalden wij van deze oplossing het absorptiespectrum. Dit is weergegeven in fig. 1.

Deze bepaling geschiedde met de door Rottier (102) uitvoerig beschreven photoëlectrische spectraalphotometer.

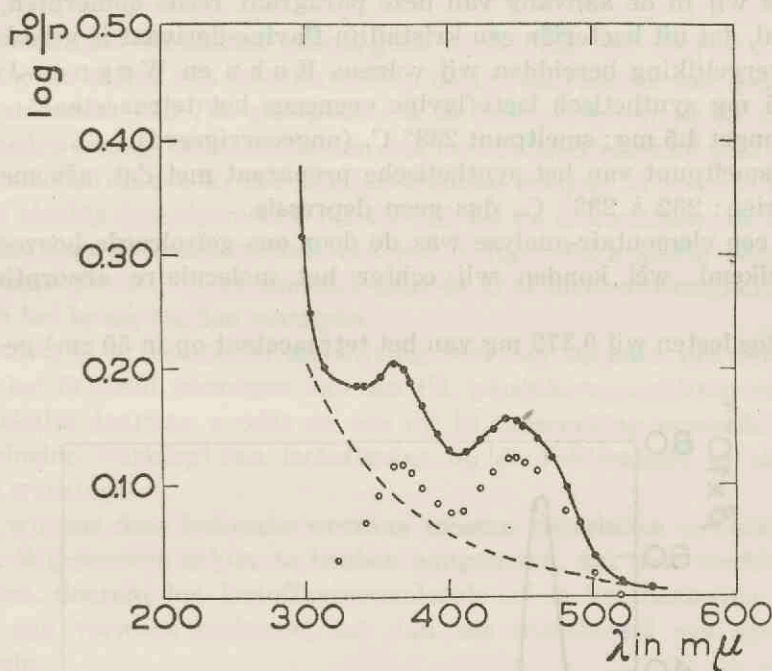


Fig. 1.

Absorptiespectrum van het eluaat uit de geel-bruine bovenlaag der aluminiumoxyd-zuil.

- gemeten absorptiespectrum.
- extrapolatiekromme volgens Rottier.
- o o o o o resterende absorptiekromme, bij subtractie van de extrapolatiekromme van het gemeten absorptiespectrum.

De resterende absorptiekromme is identiek met het absorptiespectrum van lactoflavine.

Door toepassing van de door Rottier (102) beschreven extrapolatiemethode konden wij aantoonen, dat dit absorptiespectrum niets anders voorstelt dan een sterk verontreinigd lactoflavine-spectrum.

De lactoflavine-absorptie is gesuperponeerd op een, naar het ultra-violet steil oplopende, continue ondergrond. De aard van de verontreiniging is ons niet bekend.

2e. *de gele laag.*

Elutie met aethylacetaat-methanol 4 : 1. Het eluaat werd na filtratie in vacuüm drooggedampt. Het kristallijne residu namen wij op in enkele cm³ gedestilleerd water. Na toevoeging van eenige druppels verdund azijnzuur dampten wij de oplossing in vacuüm tot op 2 cm³ in. Na één dag staan in de ijskast hadden zich fijne, gele naaldjes afgescheiden, welke onder het microscoop volkomen homogeen waren. De naaldjes werden op een microtrechttertje afgefiltreerd, gewassen met ijskoud gedestilleerd water en in vacuüm boven silicagel gedroogd.

Opbrengst: 1.5 mg. Smeltpunt 232 à 233° C. (ongecorrigeerd).

Zoóals wij in de aanvang van deze paragraaf reeds opmerkten, is dit de eerste maal, dat uit bacteriën een kristallijn flavine-derivaat is geïsoleerd.

Ter vergelijking bereidden wij volgens K u h n en W a g n e r - J a u r e g g (84) uit 5 mg synthetisch lactoflavine eveneens het tetraacetaat.

Opbrengst 4.5 mg; smeltpunt 233° C. (ongecorrigeerd).

Mengsmeltpunt van het synthetische preparaat met dat, afkomstig uit de lichtbacteriën: 232 à 233° C., dus geen depressie.

Voor een elementair-analyse was de door ons geïsoleerde hoeveelheid stof niet toereikend, wél konden wij echter het moleculaire absorptiespectrum bepalen.

Daartoe losten wij 0.379 mg van het tetraacetaat op in 50 cm³ gedestilleerd

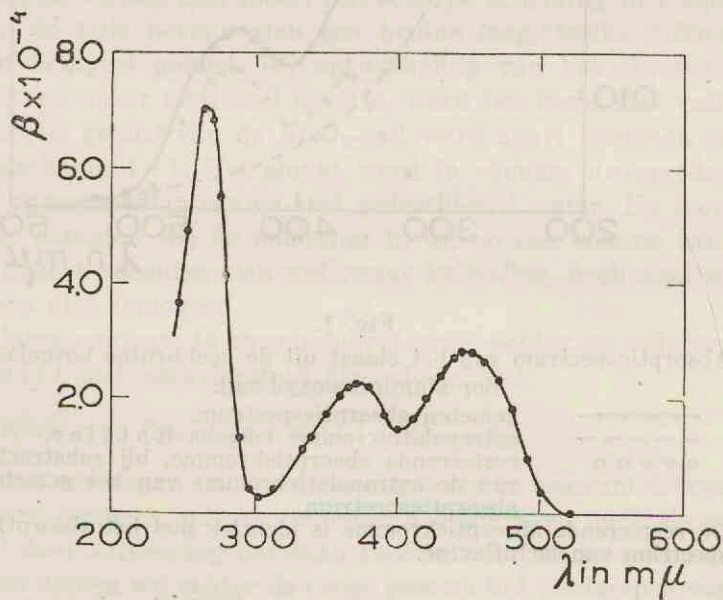


Fig. 2.

Absorptiespectrum van uit *Ph. phosphoreum* bereid lactoflavine-tetraacetaat. Maxima bij 447, 373 en 265 mμ.

water. Per cm^3 bevatte deze oplossing 7.58 γ flavine-tetraacetaat, overeenkomend met 4.69 γ flavine. Het moleculaire absorptiespectrum is weergegeven in fig. 2.

Ligging der maxima: 447, 373 en 265 $\text{m}\mu$.

$$\beta_{447} = 2.87 \times 10^4.$$

Deze waarden stemmen vrijwel overeen met de door Rottier (102) gevonden waarden aan een synthetisch lactoflavine-preparaat.

Hiermede is dus bewezen, dat het in *Ph. phosphoreum* voorkomende flavine geheel identiek is met lactoflavine. Het onderzoek heeft voorts geen enkele aanwijzing verschaft voor de aanwezigheid van een tweede, van lactoflavine afwijkend, flavine in de onderzochte bacteriestam.

§ 3. Conclusie en mogelijkheid tot verder onderzoek.

De verkregen resultaten geven geen aanleiding het door Doudoroff geconstateerde effect van lactoflavine op de lichtintensiteit van sommige half-donkere stammen van *Ph. phosphoreum* te interpreteren in de zin van een directe medewerking van lactoflavine aan de lichtemitterende reactie.

Wij meenen dan ook, dat het lactoflavine evenals in zoovele andere celprocessen slechts een algemeene rol vervult bij de lichtemissie, in die zin, dat de vorming van de componenten van het lichtgevend systeem bepaald wordt door omstandigheden, die uiteindelijk door de al of niet aanwezigheid van lactoflavine in het leven worden geroepen.

Evenmin is er eenigerlei aanwijzing voor het bestaan van een correlatie tusschen het lichtend vermogen van een *Ph. phosphoreum*-cultuur en het lactoflavine-gehalte daarvan, zoodat er, ook dit in aanmerking nemende, allé reden is de bedoelde werking van lactoflavine op de lichtemissie te zien als een indirecte werking.

Hoe wij ons deze indirecte werking moeten voorstellen is vooralsnog niet duidelijk. Wij meenen echter te hebben aangetoond, dat deze werking niet tot stand komt, doordat het lactoflavine-molecule in de lichtbacteriën wordt omgezet in een verwant molecule, dat dan een directe rol zou spelen bij de lichtemissie.

Het is duidelijk, dat de resultaten van de tot dusver beschreven onderzoekingen ons slechts weinig verder hebben gebracht tot het doel, dat wij ons hadden gesteld, namelijk het verkrijgen van een nader inzicht in de aard der moleculen, welke bij het bioluminescentie-proces in lichtbacteriën zijn betrokken.

Wij wezen er intusschen reeds eerder op, dat de mogelijkheid tot direct chemisch onderzoek ten nauwste samenhangt met de vraag, of het zou gelukken het lichtgevend systeem af te scheiden van de bacteriecel. De negatieve uitslag van alle desbetreffende in de litteratuur beschreven onderzoekingen in aanmerking nemende, hebben wij ons in dit opzicht niet veel illusies gemaakt. Dit neemt niet weg, dat wij meenden, in het bijzonder daar er eenige veelbelovende nieuwe

gezichtspunten waren, enkele pogingen in deze richting te moeten wagen.

Daar voorts het onderzoek naar het voorkomen van lactoflavine in de lichtbacteriën geen aanwijzingen opleverde, welke spraken voor een directe medewerking daarvan aan het lichtemitterend proces, schenen verdere pogingen tot een direct chemisch onderzoek naar de aard van de verbindingen, welke bij het bioluminescentie-proces in lichtbacteriën zijn betrokken, weinig uitzicht te bieden.

Er bleek nu evenwel een zeer aantrekkelijke en veelbelovende mogelijkheid tot verder onderzoek voor ons gereed te liggen in de bestudeering van het effect van uitwendige bestraling met licht van verschillende golflengte op de lichtemissie van lichtbacteriën. In principe scheen het namelijk mogelijk, om aldus langs indirecte weg het absorptiespectrum te bepalen van een bij de lichtemissie nauw betrokken molecule.

De bespreking van het desbetreffende onderzoek en van de verkregen resultaten vormt de inhoud van de volgende hoofdstukken van dit proefschrift.

HOOFDSTUK VI.

DE INVLOED VAN UITWENDIGE BESTRALING OP HET LICHTEND VERMOGEN VAN LICHTGEVENDE ORGANISMEN.

Het deel van het onderzoek, dat met het onderhavige hoofdstuk begint en dat door zijn aard een meer fysisch karakter draagt, is mede dank zij de theoretische zoowel als de experimenteele medewerking van Mej. A. van der Burg, fysisch doctoranda, tot stand gekomen.

De schrijver van dit proefschrift rekent het zich dan ook tot een aangename plicht, op deze plaats de prettige samenwerking met Mej. van der Burg met groote erkentelijkheid te gedenken.

§ 1. Inleiding.

De indirecte methode, met behulp waarvan wij hebben getracht ons inzicht in het bioluminescentie-proces der lichtbacteriën te vergrooten, vindt zijn oorsprong in een terloops verrichte waarneming van van Schouwenburg en van der Burg (niet gepubliceerd). Zij bestudeerden de invloed van koolmonoxyde in verschillende concentraties op de ademhaling en de lichtemissie van *Ph. phosphoreum* en tevens — naar analogie van de bekende proeven van Warburg — de invloed van uitwendige bestraling op het door koolmonoxyde veroorzaakte effect (107). Hiervoor was het noodig tijdens de uitwendige bestraling de intensiteit van het door de bacteriesuspensie geëmitteerde licht te kunnen meten. Dit was principieel op twee manieren mogelijk; men kon namelijk eenerzijds bestralen met geel en rood licht en de intensiteit van het bacterielicht bepalen met behulp van een blauw-filter, anderzijds kon men bestralen met blauw licht en het bacterielicht waarnemen door een geel-rood-filter. Bij het experimenteel nagaan van beide mogelijkheden deden zij de verrassende waarneming, dat bestraling van een geaereerde suspensie van *Ph. phosphoreum* met blauw licht een intensiteitsvermindering van het door de bacteriën geëmitteerde licht tengevolge heeft, terwijl bestraling met geel of rood licht hierop geenerlei invloed uitoefent. Bovendien bleek het door bestraling met blauw licht veroorzaakte effect reversibel te zijn, dat wil zeggen, na afloop der bestraling herkreeg de intensiteit van het bacterielicht na zekere tijd zijn oorspronkelijke waarde.

Nu had Harvey reeds in 1925 geconstateerd (50), dat het lichten van een *Cypridina*-extract door bestraling gedurende enkele secunden met het volle licht van een koolboog volledig wordt gedoofd en tevens, dat na korte tijd staan in het donker het lichtgevend vermogen van het bestraalde extract gedeeltelijk terugkeert. Door luciferine- en luciferase-oplossingen afzonderlijk

te bestralen en vervolgens te combineeren, kon hij aantonen, dat bij deze bestraling het luciferine en niet de luciferase werd geïnactiveerd. Deze photochemische inactivering trad bovendien slechts op bij aanwezigheid van moleculaire zuurstof; bestraling van een luciferine-oplossing bij afwezigheid van zuurstof was zonder invloed op het lichtgevend vermogen.

Qualitatief kon Harvey vaststellen, dat het waargenomen effect, behalve van de intensiteit waarmede werd bestraald, afhangt van de spectrale samenstelling van het gebruikte licht. Met behulp van lichtfilters toonde hij aan, dat rood, geel en groen licht luciferine niet inactiveren, evenmin infrarode straling en ultra-violette met een golflengte korter dan $300\text{ m}\mu$. Ook bij $350\text{ m}\mu$ vond hij nog slechts een geringe werkzaamheid. Een duidelijk effect trad op bij bestraling met golflengten tusschen 380 en $460\text{ m}\mu$. Hoewel dit onderzoek slechts een kwalitatief karakter droeg en het al of niet optreden van een effect visueel werd vastgesteld, bleek toch duidelijk, dat de inactivering van luciferine door licht bij aanwezigheid van moleculaire zuurstof een photochemisch proces is, dat in sterke mate golflengte-afhankelijk moet zijn (zie ook nog (55)).

Na dit effect bij extracten van *Cypridina* te hebben waargenomen, bestraalde Harvey suspensies van *B. phosphorescens* (volgens Beijerinck identiek met *Ph. phosphoreum*), in de verwachting ook daarmede een overeenkomstig effect te kunnen aantonen (51). Het gelukte hem echter niet om, zelfs onder gebruikmaking van hoge lichtintensiteiten, een doovend effect van uitwendige bestraling te constateeren. Met de gedachte, dat mogelijkerwijze het herstel der lichtintensiteit na de bestraling tot op zijn oorspronkelijke waarde zeer snel zou verlopen, richtte hij zijn proeven zoo in, dat binnen $1/200$ seconde na de bestraling het door de suspensie geëmitteerde licht kon worden waargenomen. Een waarneembaar positief effect bleef echter uit. Zijn conclusie luidde dan ook, dat de intensiteit van het door lichtbacteriën uitgezonden licht niet door uitwendige bestraling wordt beïnvloed. Aangezien zoowel de waarnemingen van van Schouwenburg en van der Burg als die van Harvey op een visuele methode beruisten, moeten wij wel aannemen, dat Harvey toch nog met te geringe intensiteiten heeft bestraald. Voor de inactivering van *Cypridina*-luciferine-oplossingen zijn betrekkelijk lage intensiteiten voldoende. Klaarblijkelijk bereikt — zooals reeds door van Schouwenburg en van der Burg in ander verband is opgemerkt (107) — door de speciale structuur van de kleine, sterk lichtbrekende, coccenvormige cellen van *Ph. phosphoreum* slechts weinig licht het inwendige van de cel.

De opheffing van een bepaalde remming der ademhaling door CO vonden van Schouwenburg en van der Burg bij gelijke intensiteit van het ingestraalde licht voor een gistsuspensie aanzienlijk veel groter dan voor een suspensie van *Ph. phosphoreum*. Ook hier moet in het geval van de lichtbacteriën de intensiteit van het ingestraalde licht zeer hoog zijn om een buiten de proeffout vallend effect te kunnen waarnemen.

§ 2. Bespreking van de principiele mogelijkheid om uit het bestralingseffect het absorptiespectrum van het lichtabsorbeerende molecule te bepalen.

Het door van Schouwenburg en van der Burg waargenomen effect van bestraling op de intensiteit van het door *Ph. phosphoreum* uitgezonden licht schept een zeer belangwekkende mogelijkheid om op de indirecte wijze iets naders omtrent de eigenschappen van het lichtgevend systeem te leeren kennen.

Wij mogen uiteraard aannemen, dat de photo-werking, met als resultaat een reversibele afneming van de intensiteit van het bacterielicht, hetzij direct aangrijpt op het lichtemitterend systeem, hetzij op een molecule, dat daarmede in de nauwste relatie staat.

Om nu te doen inzien, welke belangrijke experimenteele mogelijkheid in de beschreven waarneming van van Schouwenburg en van der Burg ligt opgesloten, knopen wij aan bij de twee hoofdwetten uit de photochemie.

1. Volgens de wet van Grotthus-Draper kan slechts door een systeem geabsorbeerde energie op dat systeem photochemisch inwerken. Onder systeem verstaan wij hier mede eventueel werkzame sensibilisatoren.

Een veel gebruikte uitdrukking voor deze wet is ook, dat een systeem photochemisch niet wordt aangetast door straling, welke door het betreffende systeem niet wordt geabsorbeerd.

De door een chemisch systeem geabsorbeerde straling behoeft echter niet photochemisch werkzaam te zijn; in de meeste gevallen wordt slechts de kinetische energie van de moleculen verhoogd en de temperatuur van het systeem stijgt, zonder dat eenige chemische reactie plaats vindt.

2. Volgens de photochemische aequivalentie-wet van Einstein, oefent ieder geabsorbeerd *quant* dezelfde primaire photochemische werking uit en wel de activeering van één molecule.

De nadruk dient hier wel zeer speciaal te vallen op de *primaire* werking, aangezien door het veelvuldig optreden van volg- en kettingreacties het uiteindelijk reactiebeeld vaker een afwijking dan een bevestiging van de wet van Einstein oplevert. Wat uiteindelijk de grootte van het quantenrendement φ wordt — gedefinieerd als: $\varphi = \frac{\text{aantal omgezette moleculen}}{\text{aantal geabsorbeerde quanten}}$ — hangt slechts af van wat na het primaire proces, de lichtabsorptie, geschiedt.

Wij kunnen nu onder toepassing van de bovengenoemde wetten als volgt redeneeren.

Indien wij voor een willekeurig lichtgevoelig systeem de photochemische inactivering nagaan voor licht van verschillende golflengten, doch voor gelijke aantallen ingestraalde quanten, dan zijn wij in staat een „inactiverings-spectrum” te bepalen, waarbij de gebruikte golflengten zijn uitgezet tegen de

— voorloopig nog in willekeurige maat uitgedrukte — photochemische inactivering door ieder der gekozen golflengten veroorzaakt. Nu kan slechts geabsorbeerde straling photochemisch werken, waaruit volgt, *dat dit inactiverings- of werkingsspectrum identiek is met het absorptiespectrum van dat bestanddeel van het geïnactiveerde systeem, hetwelk de werkzame straling heeft geabsorbeerd.* (Onder identiteit verstaan wij in dit verband ook evenredigheid over het geheele golflengtegebied). Voor ons beteekent dit, dat wij, door lichtbacteriën te bestralen met licht van verschillende golflengten en de optredende dooving van het bacterielicht te bepalen voor gelijke aantallen ingestraalde quanten, in staat zijn het inactiveringsspectrum en daarmee het absorptiespectrum van een bij de lichtemissie nauw betrokken molecule vast te leggen ¹⁾).

Het is niet overbodig vast te stellen, welk deel van het absorptie-spectrum wij in dit verband beschouwen.

Indien men spreekt over het absorptiespectrum zonder meer, bedoelt men hiermede gewoonlijk het electronen-bandenspectrum en laat daarbij bewust de rotatie- en vibratiebandenspectra buiten beschouwing. Ook in ons geval vallen de beide laatstgenoemde spectra buiten de discussie, aangezien de energieën, welke met deze spectra samenhangen, voor het bewerken van photochemische omzettingen te gering zijn. Slechts de bij het aanslaan van electronen-niveaux werkzame energieën zijn in staat photochemische omzettingen te bewerkstelligen.

Nu is het bekend, dat zeer kortgolvlige straling door vrijwel alle organische moleculen wordt geabsorbeerd, waarbij dan tevens een min of meer destructieve ontleding van die moleculen plaats vindt. Deze photochemische destructie en de er aan voorafgaande lichtabsorptie hebben wij bij de bestudeering van het onderhavige photochemische verschijnsel echter niet op het oog.

Wat wij in dit verband als photochemische inactivering zouden willen beschouwen, hangt samen met electronenovergangen in het voor het fotogevoelige molecule kenmerkende chromophore systeem en dus met het voor dat systeem kenmerkende absorptiespectrum.

Wij moeten intusschen opmerken, dat de gelijkstelling van het photochemische werkingsspectrum en het absorptiespectrum, hoewel zeer aannemelijk, niet zonder eenige restrictie toelaatbaar is. De waarde van het quantenrendement bij de photochemische reactie doet principieel niet terzake, wèl echter of het quantenrendement over het geheele golflengtegebied dezelfde waarde heeft. Dit laatste behoeft nu niet zonder meer het geval te zijn; wij kunnen ons toch indenken, dat in eenzelfde molecule verschillende aanslagmogelijkheden, ieder met een eigen quantenrendement, aanwezig zijn.

De temperatuur is in dit verband van minder belang. Bestaat de photochemische reactie uit de absorptie van een lichtquant en één volgreactie, dan is de geheele reactie onafhankelijk van de temperatuur; zijn er meerdere gekoppelde volgreacties, dan wordt

1) Hoewel wij ons bij de verdere uiteenzettingen op het standpunt zullen blijven stellen, dat het bestudeerde bestralings-effect door een directe inwerking op een bestanddeel van het lichtemitterend systeem tot stand komt, zullen wij in hoofdstuk XIV de mogelijkheid, dat het op de beschreven wijze bepaalde inactiveringsspectrum een sensibilisatorspectrum zou zijn, nog aan een nadere beschouwing onderwerpen.

de geheele reactie temperatuur-afhankelijk, waarbij de temperatuursinvloed de gewone wetten der chemische kinetica volgt. Zou dus φ al een andere waarde krijgen, dan hangt deze waarde niet samen met het primaire proces — de temperatuurcoëfficiënt van photochemische processen is bovendien meestal zeer gering — en uit zich dit slechts in een over het geheele golflengtegebied evenredige hoogteverandering van het werkingsspectrum.

Uiteraard kan slechts het achteraf vinden van hetzelfde absorptiespectrum aan een der in zuivere toestand geïsoleerde componenten van het lichtgevend systeem het uiteindelijke bewijs leveren voor de identiteit van photochemisch inactiverings- en absorptiespectrum. Dit neemt niet weg, dat er gronden zijn aan te voeren, die de identiteit van photochemisch inactiveringsspectrum en absorptiespectrum in hooge mate waarschijnlijk maken. In de volgende paragraaf zullen wij namelijk zien, dat het in sommige gevallen is gelukt, het absorptiespectrum van een verbinding op twee wijzen te bepalen; in de eerste plaats door directe meting aan de zuivere verbinding en voorts langs indirecte photochemische weg, waarbij steeds volledige overeenstemming tusschen de op beide wijzen bepaalde spectra werd gevonden.

Men zal zich na bovenstaande uiteenzettingen wellicht afvragen of het niet mogelijk is, door directe meting van de lichtabsorptie van een dunne laag bacteriën of van een bacterie-extract, gegevens te verkrijgen over de lichtabsorptie van het in de bacteriën aanwezige lichtgevende systeem of een onderdeel daarvan.

Wij wijzen er echter op, dat men bij een normale absorptiemeting alle in het onderzochte spectraalgebied absorbeerende bestanddeelen van de bacteriecel mede bepaalt; een directe meting van de absorptie mist iedere specificiteit.

Rottier (102) heeft, zij het ook om andere redenen, absorptiemetingen aan extracten van lichtbacteriën verricht. De naar de zijde van het ultra-violet zeer sterk oplopende absorptiespectra vertoonen geen enkele karakteristieke afwijking van op dezelfde wijze bepaalde spectra van niet-lichtende micro-organismen.

De hierboven in beginsel aangegeven indirecte methode ter bepaling van het absorptiespectrum van een der bij de lichtemissie betrokken moleculen is gekenmerkt door haar specificiteit; temidden van de veelheid der absorbeerende systemen zijn wij in staat één enkel systeem door een specifieke eigenschap — de reversibele uitdooving van het geëmitteerde licht bij uitwendige bestraling — afzonderlijk te bestudeeren.

Wij herinneren in dit verband aan een uittaling van Warburg (114), die *ceteris paribus* ook voor het hier gestelde probleem kenschetsend is:

„Da die Erfahrung lehrt, dass man die Katalysatoren der lebendigen „Substanz — die Fermente — von ihren inaktiven Begleitstoffen nicht trennen „kann, so liegt es nahe, auf die Methoden der präparativen Chemie zu ver- „zichten, und die Fermente unter ihren natürlichsten Wirkungsbedingungen, „in der lebenden Zelle selbst, zu untersuchen. Sie sind hier zwar im Sinn

„der präparativen Chemie so unrein wie möglich. Findet man aber Reagenzien, die nur mit den Fermenten und nicht mit den übrigen Zellbestandteilen reagieren, so stört die inaktive Zellsubstanz ebensowenig, wie bei chemischen Reaktionen die Gefäße stören, in denen man die Reaktionen ausführt. Dann kann man die Fermente wie reine Stoffe untersuchen und aus ihren Reaktionen auf ihre Zusammensetzung schliessen.“

§ 3. Bespreking van enkele overeenkomstige onderzoeken uit de literatuur.

L a s a r e f f (88) onderzocht in 1907 het bekende verschijnsel van het bleeken van lichtgevoelige organische kleurstoffen onder invloed van uitwendige bestraling. Zette hij voor de verschillende ingestraalde golflengten de mate, waarin een kleurstof was gebleekt, uit tegen de golflengte, dan kreeg hij een curve, die vrijwel identiek was met de curve, welke weergaf hoeveel energie (uitgedrukt in calorieën) van elk der onderzochte golflengten tijdens de bestraling door de kleurstoflaag was geabsorbeerd.

Hij vond aldus, dat binnen de waarnemingsfout photochemisch werkingspectrum en absorptiespectrum samen vielen. De geringe systematische afwijking, welke tusschen de twee spectra bleek te bestaan, valt weg, indien men de geabsorbeerde energie niet, zooals L a s a r e f f deed, uitdrukt in calorieën doch in quanten, zooals de wet van E i n s t e i n dit verlangt.

O. W a r b u r g heeft tezamen met N e g e l e i n in zijn beroemde onderzoeken over de chemische aard van het ademhalingsferment voor het eerst langs indirecte, photochemische weg aan biologisch materiaal het absorptiespectrum van een daarin aanwezige katalytisch werkzame verbinding bepaald (115, 117, 118). Reeds vroeg had hij verwantschap vermoed tusschen het in alle aerobe cellen aanwezige ademhalingsferment en de in het bloed voorkomende zuurstofoverdrager haemoglobine, die beide gevoelig zijn voor blauwzuur en koolmonoxyde.

Nu hadden H a l d a n e en S m i t h (39) reeds in 1896 gevonden, dat de verbinding tusschen koolmonoxyde en haemoglobine lichtgevoelig is en dat het evenwicht



dat zich in het donker instelt, door belichting naar links verschuift. W a r b u r g overwoog, of niet ook de verbinding van koolmonoxyde met het ademhalingsferment lichtgevoelig zou kunnen zijn en vond inderdaad, dat de remming van de ademhaling van gistcellen door koolmonoxyde door belichting der cellen gedeeltelijk werd opgeheven. De opheffing was, behalve van de intensiteit, afhankelijk van de golflengte van het gebruikte licht. Door achtereenvolgens te bestralen met licht van verschillende golflengte en bekende quantenintensiteit kon hij uit de mate van opheffing der ademhalingsremming besluiten tot de mate, waarin de gebruikte golflengte door de verbinding CO-ademhalingsferment werd geabsorbeerd, m.a.w. tot het relatieve absorptiespectrum van deze verbinding.

Warburg was in staat aan de hand van modelreacties met systemen, die chemisch zeer nauw verwant zijn met het door hem in de cel vermoede systeem, de juistheid van de gevolgde bepalingsmethode te bewijzen. In het haemonicotine vond hij een stof die katalytisch werkzaam is bij de oxydatie van cysteine tot cystine en waarvan de CO-verbinding, evenals die van het ademhalingsferment, lichtgevoelig is. Voor de koolmonoxyde-verbinding van haemonicotine vond hij nu een zeer goede overeenstemming tusschen het rechtstreeks (bolometrisch) opgenomen absorptiespectrum en het photochemische werkingsspectrum, dat de mate van opheffing der CO-remming van de door haemonicotine gekatalyseerde oxydatie-reactie voor verschillende golflengten bij gelijke ingestraalde quantenintensiteit weergaf. Later bewees hij tezamen met Negelein in nog twee andere gevallen de identiteit tusschen het absorptiespectrum en het relatieve photochemische werkingsspectrum, nl. voor het koolmonoxide-ferrocysteïne en het koolmonoxide-pyridine haemochromogeen (116).

In 1930 onderzocht Gates (32) het bekende verschijnsel van de letale werking van ultra-violette straling op micro-organismen. Hij bestraalde culturen van *Bact. coli* met monochromatisch ultra-violet licht van bekende intensiteit en bepaalde voor verschillende golflengten de hoeveelheid energie, welke moest worden ingestraald, om 50 % van de cellen te doden. De reciproke van de aldus gevonden curve gaf voor de diverse golflengten bij gelijke ingestraalde energie de mate van letaliteit weer. Deze letaliteitscurve strekte zich uit tot even voorbij 300 $m\mu$, had een maximum bij 260 à 270 $m\mu$, een minimum bij $\pm 240 m\mu$, terwijl bij nog kortere golflengten de letale werking weer snel steeg. Tegelijkertijd bepaalde hij door directe meting het absorptiespectrum van een laag *coli*-bacteriën (laagdikte 0.8 μ). Het absorptiespectrum en het letaliteitsspectrum waren identiek.

Kubowitz en Haas (78) bestudeerden aan een zuiver urease-preparaat de photochemische inactivering door monochromatisch licht van verschillende golflengte. Het door hen gevonden inactiveringsspectrum stemde volkomen overeen met het door directe meting bepaalde absorptiespectrum van urease. De inactivering begon bij $\pm 265 m\mu$ en nam beneden 250 $m\mu$ zeer snel toe.

Op overeenkomstige wijze als Kubowitz en Haas bepaalde Gates in 1934 (33, 34) het absorptiespectrum en het photochemische inactiveringsspectrum van pepsine. Ook in dit geval stemden de spectra met elkaar overeen en er bestond groote overeenkomst met het door Kubowitz en Haas bepaalde urease-spectrum.

In 1936 vonden Duggar en Hollaender (62) bij de bepaling van het inactiveringsspectrum van het tabaks-mozaïekvirus, dat boven 3100 Å géén photo-inactivering optreedt, dat na een regelmatige stijging de curve bij $\pm 2650 \text{ Å}$ een vrij vlak maximum heeft, terwijl bij nog kortere golflengten de photochemische werkzaamheid, na een geringe daling, zeer snel stijgt. In 1937 publiceerden Lavin en Stanley (89) het absorptiespectrum van een kristallijn preparaat van het tabaks-mozaïekvirus. Dit absorptie-

spectrum stemde in wezen overeen met het door Duggar en Hollaender gevonden photochemische inactiveringsspectrum.

Tenslotte moge nog worden gewezen op een onderzoek van B ü n n i n g (13). Deze onderzoeker bepaalde de phototropische gevoeligheids-curve voor sporangiëndragers van *Pilobolus* voor licht van verschillende golflengten. Deze curve vertoonde twee maxima nl. bij ca 445 $m\mu$ en bij ca 485 $m\mu$ en een minimum bij ca 460 $m\mu$. B ü n n i n g toonde vervolgens aan, dat in de sporangiëndragers een carotinoïde voorkomt, waarvan het absorptiespectrum overeenstemt met de bovengenoemde phototropische gevoeligheidscurve.

Wij zien uit deze voorbeelden, welke op zeer uiteenlopende typen van verbindingen betrekking hebben, hoe in de tot dusverre bestudeerde gevallen steeds overeenstemming werd gevonden tusschen het photochemische inactiveringsspectrum en het absorptiespectrum.

HOOFDSTUK VII.

DE SAMENHANG TUSSCHEN DE EXPERIMENTEEL VAST TE STELLEN PHOTOCHEMISCHE WERKING EN DE ABSORPTIE- COËFFICIENT VAN HET RECEPTORMOLECULE.

De vraag is thans, op welke wijze wij uit de intensiteiten van het door de bacteriën uitgezonden licht Y_0 en Y , respectievelijk voor en na de bestraling met monochromatisch licht van de golflengte λ , kunnen besluiten tot de waarde van de absorptie-coëfficient β van het bestanddeel van het lichtemitterend systeem, dat de werkzame straling heeft geabsorbeerd.

Nu ligt het voor de hand de intensiteit Y van het op ieder oogenblik door de bacteriën uitgezonden licht rechtstreeks te koppelen aan de op dit oogenblik aanwezige hoeveelheid m van de photogevoelige component M , met dien verstande, dat

$$\frac{Y_0}{Y} = \frac{m_0}{m}, \quad (1)$$

waarin dus m_0 = het aantal moleculen van de lichtgevoelige stof M voor de bestraling;

m = het aantal moleculen van de lichtgevoelige stof M na de bestraling.

Voor de photochemische ontleding van de component M geldt, dat deze evenredig is met het aantal door deze verbinding geabsorbeerde quanten, m.a.w.

$$\frac{dm}{dt} = - \varphi A. \quad (2)$$

Hierin is φ het rendement van de photochemische reactie

$\left(\frac{\text{aantal omgezette moleculen}}{\text{aantal geabsorbeerde quanten}} \right)$, waarvan wij mogen aannemen, dat dit niet afhankelijk is van λ ;

A het aantal per tijdseenheid door de stof M geabsorbeerde quanten;
 t de bestralingstijd.

Nu is het voorts duidelijk, dat

$$A = \gamma \beta_{\lambda} I_{q0} m_0, \quad (3)$$

waarin β_{λ} de absorptie-coëfficient van de stof M voor de golflengte λ voorstelt,

I_{q0} de quantenintensiteit (quanten/cm² × sec.) is van het ingestraalde licht in de bacteriecellen ter plaatse van het absorbeërend systeem¹⁾,

1) Wij gaan hierbij eenvoudigheidshalve uit van de veronderstelling, dat I_{q0} in alle bacteriecellen dezelfde waarde heeft.

γ een numerieke constante is, waarvan wij in hoofdstuk XIII de waarde zullen berekenen.

Door substitutie in vergelijking (2) vinden wij

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= -\varphi\gamma\beta_\lambda I_{q0}m_0, \\ \text{of } m &= m_0 \times e^{-\varphi\gamma\beta_\lambda I_{q0}t} \\ \text{of } \ln \frac{m_0}{m} &= \varphi\gamma\beta_\lambda I_{q0}t. \end{aligned} \quad (4)$$

Volgens vergelijking (1) kunnen wij hiervoor ook schrijven

$$\ln \frac{Y_0}{Y} = \varphi\gamma\beta_\lambda I_{q0}t. \quad (5)$$

Hieruit volgt

$$\beta_\lambda = \frac{\ln \frac{Y_0}{Y}}{I_{q0}t} \times \frac{1}{\varphi\gamma}. \quad (6)$$

In deze vergelijking zijn nu Y_0 , Y en t rechtstreeks te bepalen experimenteel grootheden, terwijl φ en γ constanten zijn.

Slechts over I_{q0} moet nog het een en ander worden opgemerkt. Deze grootte is niet voor experimenteel bepaling toegankelijk; wel geldt dit voor de intensiteit van het ingestraalde licht I_q , zooals dit ter plaatse waar de bacteriën zich bevinden door de bestralingsbron wordt geleverd. Nu bestaat er intusschen alle aanleiding om te besluiten, dat I_{q0} over het geheele golf-lengtegebied in eerste benadering evenredig zal zijn met I_q , een kwestie waarop overigens hieronder nog zal worden teruggekomen. Wij mogen dus voor het product van de constante φ en de constante verhouding $\frac{I_{q0}}{I_q}$ een nieuwe constante φ' invoeren, of

$$\varphi' = \varphi \times \frac{I_{q0}}{I_q} \quad \text{of} \quad \varphi' \times I_q = \varphi \times I_{q0}. \quad (7)$$

φ' stelt dan voor het schijnbare quantenrendement van de photochemische omzetting, berekend op de quantenintensiteit van het ingestraalde licht zooals dit de bacteriecellen bereikt.

Vergelijking (6) gaat zoomede over in

$$\beta_\lambda = \frac{\ln \frac{Y_0}{Y}}{I_q t} \times \frac{1}{\varphi'\gamma} \quad (8)$$

Het rechtstreeks te berekenen resultaat van een bestralingsproef is nu de uitdrukking $\ln \frac{Y_0}{Y}$, welke wij in het vervolg als de *photochemische werking* W zullen aanduiden.

Uit vergelijking (8) volgt, dat de aldus gedefinieerde photochemische

werking W evenredig is met I_q en met t en dus met het totale aantal ingestraalde quanten.

De kromme, welke het verband weergeeft tusschen W en λ zullen wij verder als *werkingskromme* aanduiden.

Door nu voorts in een aan iedere bestralingsproef te koppelen intensiteitsmeting van het ingestraalde licht de waarde van I_q vast te stellen, wordt het mogelijk de waarde van de verhouding

$$\frac{\ln \frac{Y_0}{Y}}{I_q t} = W(\lambda) \quad (9)$$

te berekenen, welke waarde dus onafhankelijk is van de bijzondere voorwaarden der proefneming en de photochemische werking per ingestraald quant weergeeft. Deze grootheid zullen wij als de *specifieke photochemische werking* aanduiden.

Het behoeft geen toelichting, dat de aldus bepaalde specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ blijkens vergelijking (8) recht evenredig is met de absorptie-coëfficiënt β_λ^0 van het bestanddeel van het lichtemitterend systeem, dat de werkzame straling heeft geabsorbeerd. Uit de vergelijkingen (8) en (9) volgt

$$W(\lambda) = \beta_\lambda^0 \times \varphi' \gamma. \quad (10)$$

Wanneer wij dus de kromme vaststellen, welke $W(\lambda)$ als functie van de golflengte λ weergeeft, zal het aldus vastgelegde photochemische inactiverings-spectrum tevens het gezochte absorptiespectrum in relatieve maat weergeven.

Zou de photochemische inactivering met een quantenrendement $\varphi = 1$ verlopen $\left(\varphi = \frac{\text{aantal omgezette moleculen}}{\text{aantal geabsorbeerde quanten}} \right)$ en zou I_{q_0} gelijk zijn aan I_q , dan konden wij uit het photochemische inactiveringsspectrum, aangezien de getalwaarde van γ bekend is (zie hoofdstuk XIII), direct het absolute absorptiespectrum berekenen. Is het quantenrendement niet gelijk aan 1 doch kleiner (het meest waarschijnlijke geval) en (of) I_{q_0} niet gelijk aan I_q , dan zijn $W(\lambda)$ en β_λ nog door een onbekende evenredigheidsfactor φ' , het schijnbare quantenrendement, verbonden.

Nadat wij in het bovenstaande de betrekking tusschen de moleculaire absorptie-coëfficiënt β_λ en de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ hebben afgeleid, is het gewenscht nader in te gaan op eenige beperkende veronderstellingen, die wij bij de afleiding moesten invoeren.

In de eerste plaats zijn wij dan bij de afleiding van vergelijking (6) uitgegaan van de veronderstelling, dat $\frac{m_0}{m} = \frac{Y_0}{Y}$, in woorden, dat de intensiteit van het bacterieel licht evenredig zou zijn met de hoeveelheid van een voor de lichtreactie essentieele stof M . Voorts hebben wij verondersteld, dat de photochemische werking evenredig is met de quantenintensiteit van het ingestraalde licht en met de bestralingstijd, m.a.w., dat voor de bestudeerde photochemische

reactie de wet van Bunsen-Roscoe geldt. Het feit, dat wij experimenteel $W = \ln \frac{Y_0}{Y}$ inderdaad evenredig vonden met I_q en met t is nu een sterke steun zoowel voor de veronderstelling, dat $\frac{m_0}{m}$ gelijk mag worden gesteld aan $\frac{Y_0}{Y}$, als voor de aanvaarding van de wet van Bunsen-Roscoe voor de photochemische ontleding van de stof M. Bij de bespreking van de experimentele resultaten komen wij op deze kwestie en op die van het quantenrendement nog terug.

Een tweede beperking hangt samen met onze veronderstelling, dat de verhouding van I_{q0} (de quantenintensiteit van het ingestraalde licht in de bacteriecellen ter plaatse van het absorbeërend systeem) en I_q (de gemeten quantenintensiteit van het ingestraalde licht ter plaatse van de bacteriën) over het geheele onderzochte golflengtegebied dezelfde zou zijn. Deze laatste veronderstelling houdt namelijk in, dat de grootte van het lichtverlies bij doorstraling van de bacteriën niet, of slechts zeer weinig, van de golflengte afhankelijk mag zijn. Zou nu het lichtverlies mede zijn oorzaak vinden in een sterke lichtabsorptie door de bestanddeelen van de bacteriecellen, dan viel dit zeker niet te verwachten, aangezien bekend is, dat de lichtabsorptie in biologisch materiaal naar de zijde van het ultra-violette spectraalgebied zeer sterk toeneemt. In dit geval zou het ons niet zonder meer mogelijk zijn de opgetreden photochemische werking met de intensiteit van het ingestraalde licht in verband te brengen. In § 3 van hoofdstuk VIII is evenwel een proef beschreven die aantoon, dat het lichtverlies door absorptie bij doorstraling van een bacteriesuspensie inderdaad verwaarloosbaar klein is.

Vermelding verdient nog, dat wij in een enkel geval — namelijk bij de bestudeering van het herstel der lichtintensiteit na afloop van de bestraling, de herstelreactie (zie hoofdstuk XI) — van de hierboven afgeleide formuleering $W = \ln \frac{Y_0}{Y}$ voor de photochemische werking zullen afwijken en gebruik zullen maken van de uitdrukking $W' = \frac{Y_0 - Y}{Y_0}$ welke, met 100 vermenigvuldigd, de procentueele intensiteitsvermindering van het bacterielicht voorstelt tengevolge van de bestraling.

Men dient echter goed te beseffen, dat deze laatste uitdrukking voor de afleiding van de specifieke photochemische werking niet kan worden gebruikt, aangezien zij, in tegenstelling tot de uitdrukking $W = \ln \frac{Y_0}{Y}$, niet evenredig is met het aantal ingestraalde quanten.

Tenslotte willen wij nog opmerken, dat de absolute intensiteiten van het door de bacteriën uitgezonden licht niet ter zake doen, aangezien deze toch slechts als verhouding in onze definitie van de photochemische werking voorkomen. Wij kunnen bij het bepalen van deze intensiteiten volstaan met het bepalen van de relatieve intensiteiten, uitgedrukt dus in een willekeurige maat.

HOOFDSTUK VIII.

VOORLOOPIGE PROEFNEMINGEN.

Aanvankelijk hadden wij het voornemen de te gebruiken golflengten te isoleeren uitgaande van lichtbronnen, welke een lijnenspectrum uitzenden, bijv. de kwiklamp en de heliumlamp.

Reeds spoedig bleek evenwel, dat de benodigde intensiteiten zeer hoog moesten zijn, wilden wij een buiten de foutengrens van onze bepalingsmethode liggende intensiteitsvermindering van het bacterielicht verkrijgen, zoodat de bepaling van de photochemische werking slechts voor drie lijnen, namelijk de 366 m μ , de 405 m μ en de 436 m μ -lijn en het spectraalgebied boven de 500 m μ , alle afkomstig uit de straling van een kwikdamplamp, mogelijk bleek.

§ 1. Methode.

a. De gebruikte lichtbacteriën.

Voor deze bestralingsproeven gebruikten wij *Ph. phosphoreum*, omdat deze bacterie van de in ons bezit zijnde vormen het sterkst lichtend is. Het kweeken geschiedde bij een temperatuur van 15 à 17° C in aeratiekolven volgens Kluver.

Als cultuurvloeistof gebruikten wij een oplossing van de volgende samenstelling:

- 30 g keukenzout,
- 10 g pepton-Poulenc,
- 1 l leidingwater.

De pH werd met een verdunde NaOH-oplossing gebracht op ca. 7.4. Na het steriliseeren werden 350 cm³ cultuurvloeistof geënt met enkele druppels van een geconcentreerde bacteriesuspensie, afkomstig van een cultuurbuis. In afhankelijkheid van de temperatuur waren na 12 tot 18 uur aereeren de groei en het lichten optimaal.

Voor de proeven werden de bacteriën afgecentrifugeerd, ter verwijdering van pepton opgespoten in een 3 %-ige NaCl-oplossing, opnieuw afgecentrifugeerd en tenslotte opgespoten in een medium bestaande uit gelijke volumina van een 3 %-ige glucose-oplossing en een oplossing bevattende $\frac{1}{4}$ m fosfaatbuffer van pH 7.6 en 4% NaCl.

Het uiteindelijk suspensiemedium bevatte dus 2 % NaCl, $1\frac{1}{2}$ % glucose en $\frac{1}{8}$ m fosfaatbuffer. Glucose en fosfaatbuffer werden afzonderlijk gesteriliseerd, ten einde een met bruinkleurig gepaard gaande ontleding der glucose te voorkomen.

De dichtheid van de bacteriesuspensie bedroeg bij alle proeven 10 Tromsdorff-eenheden per cm^3 . Eén Tromsdorff-eenheid (1 T.E.) = 1 mm^3 vochtige bacteriën.

Gedurende de bestralingsproef werd de bacteriesuspensie door middel van een fijn uitgetrokken capillair geaereerd.

Ook door de voorraad-suspensie werd voortdurend lucht geleid. Hierdoor bereikten wij, dat de lichtintensiteit der bacteriesuspensie slechts zeer langzaam in de loop der tijd afnam. *Ph. phosphoreum* is namelijk zeer gevoelig voor anaerobiose, welke een blijvende beschadiging van de cellen en een snelle achteruitgang van de lichtintensiteit tengevolge heeft (68).

b. Bepaling van de intensiteit van het bacterielicht vóór en na de bestraling.

Voor het bepalen van de lichtintensiteit van de bacteriesuspensie vóór en na de bestraling werd in beginsel gebruik gemaakt van de reeds door Eymers en van Schouwenburg gebruikte visuele methode (27), welke is gebaseerd op hun waarneming, dat de spectrale samenstelling van het door *Ph. phosphoreum* uitgezonden licht niet afhankelijk is van uitwendige omstandigheden. De proefopstelling is weergegeven in figuur 3.

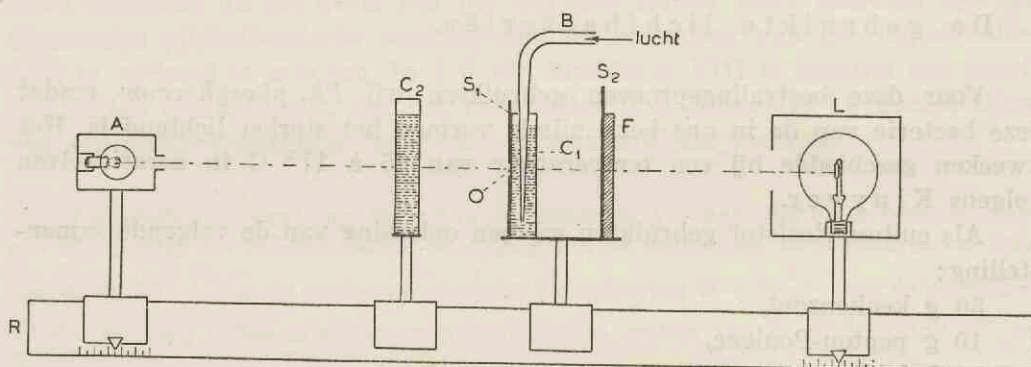


Fig. 3.

Opstelling voor het bepalen van de relatieve intensiteit van het bacterielicht en voor de bestraling der bacteriesuspensies.

Cuvet C_1 bevat de bacteriesuspensie, waarin door middel van het capillaire buisje B fijn verdeelde lucht wordt geblazen. In het scherm S_1 bevindt zich een kleine opening O, waardoor het bacterielicht naar voren wordt uitgestraald. Het licht van de langs de rail R beweegbare lamp A valt via het kleurfilter C_2 op de voorzijde van het scherm S_1 . Bij wegvallen der contouren van de opening O is de stand van de lamp A een relatieve maat voor de intensiteit van het bacterielicht. Het licht van de bestralingsbron L valt via het kleurfilter F op de cuvet C_1 .

De bacteriesuspensie bevond zich in de cuvet C_1 , welke was geplaatst achter het scherm S_1 . Dit scherm was aan de naar de cuvet C_1 toegekeerde zijde dof zwart, aan de voorzijde wit geschilderd. (De gebruikte witte lak vertoont in het zichtbare spectrum geen selectieve absorptie). Het scherm S_1 had op $2\frac{1}{2}$ cm hoogte een cirkelvormige opening O van 5 mm doorsnede. Door deze

opening kon het licht van de bacteriesuspensie naar buiten treden. Anderzijds werd het witte voorvlak van S_1 belicht door de op constante spanning brandende lamp A (een 12 Volts autolamp), met tussenplaatsing van de cuvet C_2 . De cuvet C_2 was gevuld met een oplossing van Neptunusblauw in water van een zoodanige concentratie, dat de kleur van het doorgelaten licht overeenstemde met de kleur van het bacterielicht. Werde de langs de Zeiss-rail verplaatsbare lamp A nu zoo ingesteld, dat de contouren van de opening in scherm S_1 wegvielen, dan werd deze aan de voorzijde (door de lamp A) en aan de achterzijde (door de bacteriesuspensie) even sterk verlicht. Bij nauwkeurig constante spanning op de lamp A, is de stand van deze lamp dus een directe maat voor de intensiteit van het bacterielicht. Aan de voet van de lamp A was een wijzer aangebracht, waarmede op een langs de rail R bevestigde kwadratische schaal de relatieve intensiteit direct kon worden afgelezen. Iedere opgegeven intensiteit is het gemiddelde van 6 à 8 waarnemingen, welke tezamen ca 60 seconden duurden.

Doordat de spiraal van de lamp A klein is t.o.v. de afstand van A tot S_1 , mogen wij bij de berekening van de intensiteit van het op het voorvlak van S_1 vallende licht uit de stand van lamp A de kwadratenwet toepassen.

De bestraling van de bacteriesuspensie geschiedde met de eveneens langs de rail R verplaatsbare superhoogedruk-kwiklamp L^1). Tusschen deze lamp en de bacteriesuspensie stond op ca 5 cm van de cuvet C_1 een aan weerszijden dofzwart scherm S_2 , met een opening ter grootte van de cuvet C_1 . Voor deze opening bevond zich het gewenschte kleurfilter F al naar gelang van de golflengte, waarmede een bestralingsproef werd uitgevoerd.

Ook de relatieve intensiteit van het voor de bestraling gebruikte licht kon voor iedere golflengte met voldoende nauwkeurigheid worden berekend, door bij de diverse standen van de lamp L de kwadratenwet toe te passen.

Voor de stand van de lamp L, waarbij het midden van de lichtende kwartsbuis 20.5 cm was verwijderd van het midden der cuvet C_1 , werd (willekeurig) de intensiteit op 100 gesteld. Voor de afstanden 20.5 — 1.7, 20.5 + 2.5, 20.5 + 5, 20.5 + 10, 20.5 + 15, en 20.5 + 20 cm werden de relatieve intensiteiten aldus resp. 118, 80, 66, 47, 35 en 27.

Na afloop van deze proeven legden wij de absolute intensiteit van elk der gebruikte lijnen bij een bepaalde stand van de lamp L vast. Een bestralingsproef verliep nu als volgt.

De cuvet C_1 werd tot een daarop aangebrachte merkstreep gevuld met de bacteriesuspensie, terwijl er voor werd gezorgd, dat door het voortdurend doorborrelen van fijne luchtbelletjes de suspensie met lucht verzadigd bleef. De bepaling van de intensiteit van het bacterielicht, nadat deze gedurende een periode van 10 minuten nagenoeg constant was gebleven, leverde de waarde van Y_0 op (de intensiteit van het bacterielicht vóór de bestraling). Gedurende de volgende periode van 10 minuten werd de suspensie door middel van de lamp L en het filter F bestraald. Onmiddellijk hierna werd de intensiteit van

1) Philora HP 500, 220 V. wisselstroom.

het bacterieel licht opnieuw bepaald. Door deze bepaling vonden wij de intensiteit Y (de intensiteit van het bacterieel licht na de bestraling).

c. Isoleering van de gebruikte kwiklijnen.

1. *De 436 m μ -lijn.*

Het filter voor de 436 m μ -lijn bestond uit een combinatie van de Schott-filters BG 24 en GG 3 elk met een laagdikte van 2 mm.

De doorlating bij 436 m μ bedroeg 45 %, bij 405 m μ 6 %. Straling met een golflengte kleiner dan 400 m μ werd niet doorgelaten.

2. *De 405 m μ -lijn.*

Oplossing van 0.25 g chinine-hydrochloride en 30 mg diamantfuchsine in 100 cm³ 96%-ige aethanol, met een laagdikte van 1 cm.

De doorlating bij 405 m μ bedroeg 25 %, die bij 436 m μ ca 1 %.

Beneden 380 m μ liet dit filter geen licht door.

3. *De 366 m μ -lijn.*

Schott-filter UG 1 met een laagdikte van 2 mm.

De doorlating bij 366 m μ bedroeg 65.5 %, bij 405 m μ 5 %. Licht van grotere golflengte werd vrijwel niet doorgelaten. Beneden 366 m μ is de doorlating nog aanzienlijk, doch dit golflengtegebied werd door de gebruikte lamp slechts met geringe intensiteit geëmitteerd, terwijl bovendien de glazen cuvet C₁ deze straling volkomen absorbeerde.

4. *Het golflengtegebied boven 500 m μ .*

Schott-filter GG 11 met een laagdikte van 4 mm.

Dit filter laat straling boven 500 m μ voor ca 90 % door.

De gebruikte filters lieten behalve de aangegeven golflengten ook nog roode en infra-roode straling door, terwijl het 405 en het 436 m μ -filter bovendien in het groen en het geel nog straling lieten passeeren. Dit was bij de bestralingsproeven niet van beteekenis, aangezien licht van deze golflengten op de lichtbacteriën photochemisch niet werkt. Bij de energiemetingen moesten wij hier echter rekening mede houden.

Bij de bestralingsproeven konden wij de photochemisch niet werkzame, doch in verband met de energiemetingen ongewenschte straling boven 500 m μ niet elimineeren, aangezien hierdoor ook het gewenschte golflengtegebied zoo zeer zou zijn verzwakt, dat de photochemische werkingen voor de metingen te geringe waarden zouden hebben verkregen.

§ 2. *De bestralingsproeven.*

Aangezien het niet mogelijk was in de door ons gebruikte apparatuur meer dan één bestralingsproef tegelijkertijd uit te voeren, werd ter eliminee-

ring van de vrij groote spreiding bij de meting van ieder der gewenschte intensiteiten achtereenvolgens een reeks van 3 tot 6 bestralingen uitgevoerd. Voor ieder der gebruikte kwiklijnen zal als voorbeeld één volledige intensiteitsreeks worden weergegeven, terwijl de volledige resultaten tabellarisch zullen worden samengevat. In de weergegeven grafieken zijn tenslotte de photochemische werkingen $W = \ln \frac{Y_0}{Y}$ uitgezet tegen de relatieve intensiteiten. Wegens de vrij groote spreidingen in de uitkomsten zijn de uiteindelijk berekende W 's niet weergegeven door punten doch door lijntjes, waarvan de lengte gegeven wordt door 2ε . ε stelt de halve middelbare fout voor berekend met de formule

$$\varepsilon = \frac{5}{4} \frac{|X - \bar{X}|}{n\sqrt{n-1}},$$

waarin voor een bepaalde bestralingsintensiteit X en $\bar{X}$ respectievelijk de gevonden afzonderlijke waarden van $\ln \frac{Y_0}{Y}$ en hun gezamenlijk gemiddelde voorstellen en n het totaal aantal waarnemingen.

1. De 436 $m\mu$ -lijn.

In tabel I is een voorbeeld gegeven van een volledige intensiteitsreeks.

TABEL I.

Volledige intensiteitsreeks bij bestraling met de 436 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	100	80	66	47	35	27
Relatieve intensiteit van het bacterieelicht vóór de bestraling, Y_0 . . .	23.9	26.2	24.7	24.4	21.1	21.2
Relatieve intensiteit van het bacterieelicht na de bestraling, Y	15.8	18.2	19.3	20.9	18.2	19.1
$W = \ln \frac{Y_0}{Y} (\times 100)$. .	40.8	36.0	24.5	15.5	14.8	10.4

In tabel II vindt men een overzicht van de uit een aantal intensiteitsreeksen voor $W \times 100$ gevonden waarden.

In figuur 4 is tabel II grafisch voorgesteld.

Uit de grafiek volgt, dat binnen de nauwkeurigheid der door ons gevolgde methode voor de 436 $m\mu$ -lijn de photochemische werkingen evenredig zijn met de ingestraalde relatieve intensiteiten, zooals dit volgens de formule $W = \varphi' \gamma \beta_\lambda I_0 t$ wordt verlangd (zie hoofdstuk VII).

TABEL II.

Samenvatting van de uit de intensiteitsreeksen berekende waarden van de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 436 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	Waarden voor $W \times 100$ berekend uit de intensiteitsreeksen						$W \times 100$ gemiddeld	ϵ
100	40.8	33.2	51.5	37.3	40.2	—	40.6	± 2.8
80	36.0	32.0	28.3	42.3	30.4	29.5	33.1	± 2.3
66	24.5	28.6	20.3	27.5	20.6	—	24.3	± 1.9
47	15.5	18.2	22.2	17.6	22.9	16.2	18.8	± 1.4
35	14.8	10.1	13.2	13.7	—	—	12.9	± 1.1
27	10.4	9.9	9.5	6.4	14.7	—	10.2	± 1.2

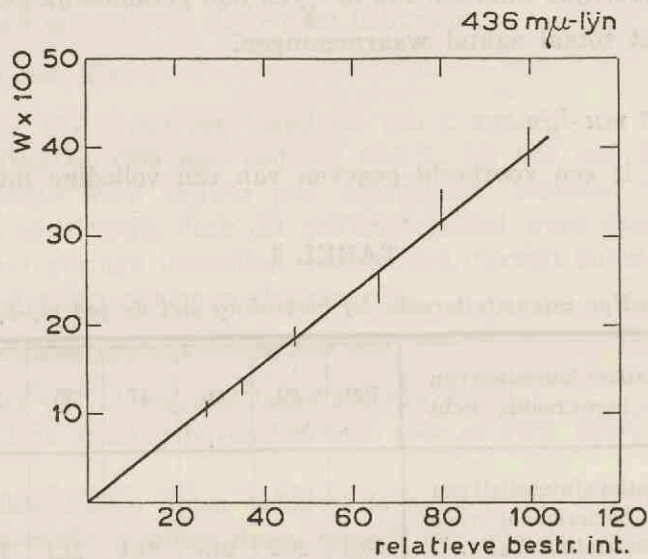


Fig. 4.

Verband tusschen de relatieve bestralingsintensiteit en de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 436 $m\mu$ -lijn.

2. De 405 $m\mu$ -lijn.

Het voor de isolering van de 405 $m\mu$ -lijn gebruikte filter had slechts een vrij geringe doorlating (25%) voor deze golflengte, aangezien het niet mogelijk was een groot doorlatend vermogen voor de 405 $m\mu$ -lijn te combineren met een geringe doorlaatbaarheid voor de 436 $m\mu$ -lijn.

Bij de toch al betrekkelijk geringe intensiteit van de 405 $m\mu$ -lijn in het kwikspectrum, was het hierdoor niet mogelijk het verband tusschen W en de ingestraalde intensiteit voor een even groot aantal intensiteiten te onderzoeken

als voor de 436 en de 366 $m\mu$ -lijnen. Wij moesten ons tot drie relatieve intensiteiten beperken.

In tabel III geven wij een voorbeeld van een intensiteitsreeks.

TABEL III.

Intensiteitsreeks bij bestraling met de 405 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	118	100	80
Relatieve intensiteit van het bacterieelicht vóór de bestraling, Y_0 . . .	15.05	16.20	12.30
Relatieve intensiteit van het bacterieelicht na de bestraling, Y	12.40	13.70	10.93
$W = \ln \frac{Y_0}{Y} (\times 100)$. .	19.3	16.7	11.8

Het overzicht van de voor $W \times 100$ in een aantal intensiteitsreeksen gevonden waarden is weergegeven in tabel IV.

TABEL IV.

Samenvatting van de uit de intensiteitsreeksen berekende waarden van de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 405 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	Waarden voor $W \times 100$ berekend uit de intensiteitsreeksen						$W \times 100$ gemiddeld	ϵ
118	19.3	18.9	18.2	—	—	—	18.8	± 0.4
100	16.7	19.1	12.6	18.3	14.0	15.7	16.1	± 1.1
80	11.8	14.4	9.9	12.4	—	—	12.1	± 0.9

In figuur 5 is tabel IV grafisch voorgesteld.

Ook voor de 405 $m\mu$ -lijn vinden wij evenredigheid tusschen de relatieve bestralingsintensiteiten en de daardoor veroorzaakte photochemische werkingen.

3. De 366 $m\mu$ -lijn.

Tabel V biedt een voorbeeld van een volledige intensiteitsreeks.

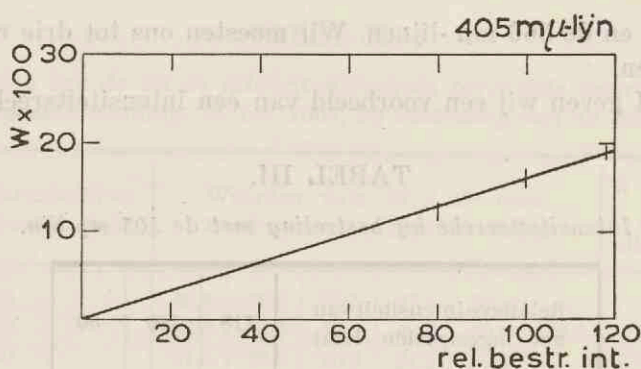


Fig. 5.

Verband tusschen de relatieve bestralingsintensiteit en de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 405 $m\mu$ -lijn.

TABEL V.

Volledige intensiteitsreeks bij bestraling met de 366 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	100	80	66	47	35	27
Relatieve intensiteit van het bacterieel licht vóór de bestraling, Y_0 . . .	15.3	15.2	26.9	16.0	27.0	25.1
Relatieve intensiteit van het bacterieel licht na de bestraling, Y	7.42	8.50	16.7	18.2	22.5	23.4
$W = \ln \frac{Y_0}{Y} (\times 100)$. .	72.2	58.1	47.6	35.6	18.2	7.0

Tabel VI geeft een overzicht van de voor $W \times 100$ in een aantal intensiteitsreeksen gevonden waarden.

TABEL VI.

Samenvatting van de uit de intensiteitsreeksen berekende waarden van de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 366 $m\mu$ -lijn.

Relatieve intensiteit van het ingestraalde licht	Waarden voor $W \times 100$ berekend uit de intensiteitsreeksen				$W \times 100$ gemiddeld	ϵ
100	72.2	93.4	72.3	62.6	75.1	± 6.7
80	58.1	53.8	64.8	—	58.9	± 3.5
66	47.6	42.2	49.5	—	46.4	± 2.5
47	35.6	37.1	31.6	29.1	33.4	± 2.2
35	18.2	16.5	22.2	29.4	21.6	± 3.1
27	7.0	20.3	13.4	—	13.6	± 3.4

In figuur 6 is tabel VI grafisch voorgesteld.

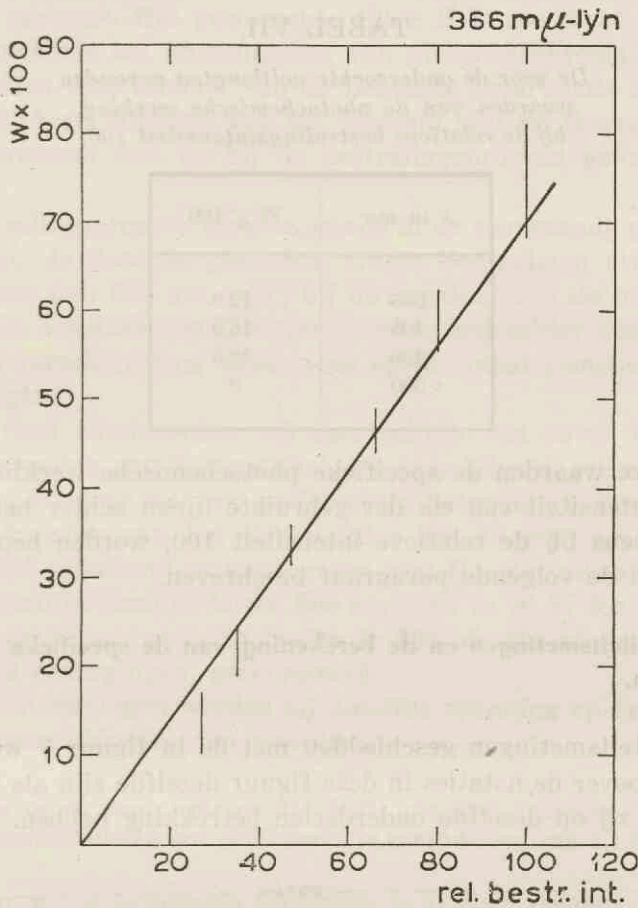


Fig. 6.

Verband tusschen de relatieve bestralingsintensiteit en de photochemische werking $W (\times 100)$, bij bestraling met de 366 m μ -lijn.

Evenals voor de beide vorige lijnen vinden wij voor de 366 m μ -lijn evenredigheid tusschen de relatieve bestralingsintensiteiten en de photochemische werkingen.

4. Het golflengtegebied boven 500 m μ .

Hoewel dit gebied eenige zeer intensieve lijnen bevat, waaronder de groene kwiklijn bij 546 m μ en de gele kwiklijnen bij 577 en 579 m μ , trad door bestraling met dit spectraalgebied geen intensiteitsverandering van het bacterieelicht op. Straling in dit golflengtegebied werkt dus op het lichtemitterend systeem van *Ph. phosphoreum* photochemisch niet in.

In tabel VII hebben wij de door aflezing uit de grafieken verkregen

waarden voor de photochemische werkingen $W (\times 100)$ bij de relatieve intensiteit 100, weergegeven.

TABEL VII.

De voor de onderzochte golflengten gevonden waarden van de photochemische werking, bij de relatieve bestralingsintensiteit 100.

λ in $m\mu$	$W \times 100$
366	72.0
405	16.0
436	39.5
> 500	0

Om uit deze waarden de specifieke photochemische werkingen te berekenen, moet de intensiteit van elk der gebruikte lijnen achter het voorvlak van cuvet C_1 , eveneens bij de relatieve intensiteit 100, worden bepaald. Deze bepaling wordt in de volgende paragraaf beschreven.

§ 3. De intensiteitsmetingen en de berekening van de specifieke photochemische werkingen.

De intensiteitsmetingen geschieden met de in figuur 7 weergegeven opstelling. Voor zoover de notaties in deze figuur dezelfde zijn als in figuur 3 wil dit zeggen, dat zij op dezelfde onderdelen betrekking hebben.

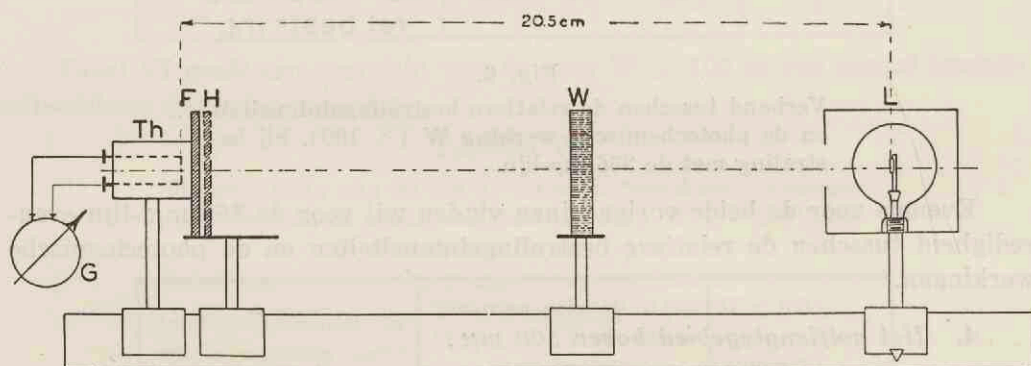


Fig. 7.

Opstelling voor het meten van de bestralingsintensiteit in $\text{erg per cm}^2 \times \text{sec}$.

Th is een groote-oppervlakte thermozuul volgens Moll en Burger en G de daarop aangesloten gevoelige galvanometer met spiegelaflazing. F is het kleurfilter voor de isolering der kwiklijnen, H het Schott GG 11-filter en W een cuvet met een 20%-ige oplossing van CuSO_4 in water.

Th is een absoluut geijkte thermozuul volgens Moll en Burger, welke

is aangesloten op een gevoelige galvanometer G met spiegelaflezing. De uitslag van G is evenredig met de per seconde op het systeem van Th vallende energie in erg per cm^2 . Het gewenschte filter F is zoo dicht mogelijk tegen Th geplaatst, teneinde het binnentreden van niet-monochromatisch verstrooid licht te voorkomen. Het midden van de lichtende kwartsbuis der lamp L bevindt zich op 20.5 cm afstand van het systeem van de thermozuil Th. Deze afstand komt overeen met de bij de bestralingsproeven gebruikte relatieve intensiteit 100.

Bij de bestralingsproeven stoorde, zooals in de voorgaande paragraaf reeds werd opgemerkt, de door de gebruikte filters doorgelaten straling met een golflengte grooter dan 500 $\text{m}\mu$ niet; bij de bepaling van de intensiteiten van de photochemisch werkzame golflengten moesten wij echter deze straling door middel van een verschilmeting bepalen en op de totaal gemeten intensiteit in mindering brengen.

Het infra-rood elimineerden wij met behulp van cuvet W, gevuld met een 20 %-ige oplossing van kopersulfaat. De verschilmetingen ter elimineering van de zichtbare straling met een golflengte grooter dan 500 $\text{m}\mu$ geschieden door tussenplaatsing van het Schott-filter GG 11 met een laagdikte van 4 mm (gestippeld geteekend en aangegeven met H), dat alle straling beneden 500 $\text{m}\mu$ tegenhoudt en straling boven 500 $\text{m}\mu$ voor ca 90 % doorlaat. Uiteraard werd hierbij voor de verzwakking, welke de 366, de 405 en de 436 $\text{m}\mu$ -lijnen door deze filters ondergingen, gecorrigeerd.

De intensiteitsmetingen werden bij dezelfde spanning op de lamp L uitgevoerd als de bestralingsproeven voordien.

De spanning op de lamp bedroeg 215 Volt; per Volt spanningsverandering vertoonde de galvanometeruitslag een gelijkgerichte verandering van 1.1 %.

Wij vonden, na de genoemde correcties te hebben toegepast, voor de drie kwiklijnen op 20.5 cm van het midden der lamp L de in tabel VIII onder I weergegeven intensiteiten in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec}$.

Met behulp van deze gegevens en met de in tabel VII (blz. 64) aangegeven waarden voor de photochemische werkingen W, zijn wij thans in staat voor de onderzochte golflengten de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ (de photochemische werking per ingestraald quant) te berekenen.

Met de in § 5 van hoofdstuk IX aangegeven formule zetten wij de intensiteiten in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec}$. om in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec}$. Deze vindt men in de kolom I_q . In de kolom $I_q \times t$ staat het totale aantal ingestraalde quanten ($t = 600 \text{ sec.}$). Tenslotte zijn in de kolom $W(\lambda)$ de specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$ voor de onderzochte golflengten berekend.

De resultaten van de hierboven beschreven proeven zijn in figuur 8 grafisch weergegeven. De gevonden punten van het photochemische inactiveringsspectrum stellen volgens het vroeger besprokene tevens punten voor van het relatieve absorptiespectrum der photochemisch omgezette verbinding.

TABEL VIII.

Berekening uit de experimentele gegevens van de specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, voor de 366, de 405 en de 436 m μ -lijn

λ in m μ	I erg/cm 2 $\times$ sec.	I_q quanten/cm 2 $\times$ sec.	$I_q \times t$ quanten/cm 2	W	$\frac{W(\lambda)}{I_q \times t}$
366	6.9×10^3	128.5×10^{13}	77.1×10^{16}	0.72	0.93×10^{-18}
405	7.2×10^2	148.5×10^{12}	89.1×10^{15}	0.16	1.70×10^{-18}
436	3.5×10^3	77.5×10^{13}	46.5×10^{16}	0.395	0.85×10^{-18}
> 500	—	—	—	0	0

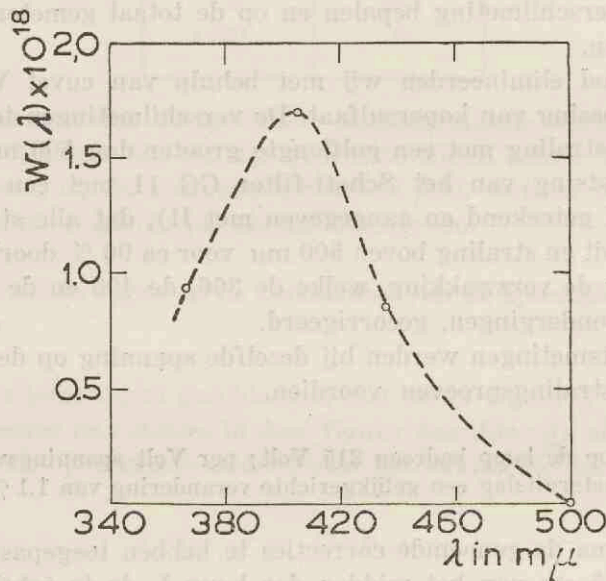


Fig. 8.

De uit de voorloepige bestralingsproeven berekende specifieke photochemische werkingen van de golflengten 366, 405 en 436 m μ en van het golflengtegebied > 500 m μ .

Bij vergelijking van deze waarden met die, welke wij voor dezelfde golflengten bij onze definitieve bestralingsproeven vonden, blijkt, dat de overeenkomst qua grootte-orde goed is, doch dat de laatstgenoemde waarden ongeveer een factor 2 lager zijn. Een omstandigheid, welke hierbij zeker een rol heeft gespeeld, is de groote lichtverstrooiing, welke in een bacteriesuspensie optreedt, waardoor tengevolge van de terugverstrooiing de gemiddelde bestralingsintensiteit in de bacteriesuspensie zeker hoger is geweest dan die, welke door ons ter plaatse van het midden der suspensie werd bepaald.

Een indruk van de lichtverstrooiing in een suspensie van *Ph. phosphoreum* met een dichtheid van 10 T.E. per cm 3 kregen wij door de volgende proef.

De cuvet C_1 , gevuld met de bacteriesuspensie (in figuur 5 niet aangegeven), werd zoo dicht mogelijk tegen de thermozuil Th geplaatst; het kleurfilter F zetten wij zoo dicht mogelijk voor de cuvet. Vervolgens bepaalden wij voor de 436, de 405 en de 366 $m\mu$ -lijn de galvanometeruitslagen van de thermozuil-galvanometercombinatie. Daarna deden wij hetzelfde, terwijl cuvet C_1 met water was gevuld. In tabel IX zijn de verkregen galvanometeruitslagen in cm samengevat.

TABEL IX.

Invloed van de lichtverstrooiing op de hoeveelheid doorgelaten licht, bij doorstraling van een suspensie van Ph. phosphoreum met een dichtheid van 10 T.E. per cm^3 .

λ in $m\mu$		436	405	366
1	Cuvet C_1 gevuld met de bacteriesuspensie; galvanometeruitslag in cm. .	4.43	0.90	1.33
2	Cuvet C_1 gevuld met water; galvanometeruitslag in cm.	10.20	2.05	2.80
3	Percentage doorgelaten licht (1 gedeeld door 2) .	43.5	44.0	47.5

In tabel IX is onder 3 uitgerekend, hoeveel procent de intensiteit van het door de bacteriesuspensie doorgelaten licht bedraagt van die, welke door de met water gevulde cuvet C_1 wordt doorgelaten. Deze percentages stemmen voor de drie onderzochte golflengten nagenoeg overeen.

In de eerste plaats kunnen wij constateeren, dat het intensiteitsverlies in de richting van de ingestraalde bundel bij doorstraling van de bacteriesuspensie aanzienlijk is, namelijk ruim 50 %.

In de tweede plaats valt uit de beschreven proef af te leiden, dat de intensiteitsvermindering optredend bij doorstraling van de bacteriesuspensie in wezen berust op verstrooiing en dat hierbij de lichtabsorptie is te verwaarloozen. Zou namelijk ook de lichtabsorptie een invloed van beteekenis hebben, dan ware het intensiteitsverlies in de richting van het ultra-violet zeker sterk toegenomen. Het is toch een bekend feit, dat de lichtabsorptie in biologisch materiaal in de richting van het ultra-violette spectraalgebied zeer sterk toeneemt. Hierbij moge nog worden opgemerkt, dat de lichtverstrooiing in veel mindere mate van de golflengte afhankelijk is.

Bovengenoemde conclusie is voor de interpretatie van de bestralingsproeven van veel belang, aangezien wij in hoofdstuk VII bij de afleiding van de formuleering voor de photochemische werking zijn uitgegaan van de ver-

onderstelling, dat het lichtverlies door *absorptie* bij het doorstralen van een bacteriesuspensie met de gebruikte dichtheid slechts een te verwaarloozen fractie zou zijn van de intensiteit van het ingestraalde licht. Deze veronderstelling is door de hierboven beschreven uitkomsten thans in eerste benadering experimenteel bevestigd.

Wij kunnen het resultaat van de bovenbeschreven proef ook tot uitdrukking brengen door te zeggen, dat voor de drie gebruikte spectraallijnen de gemiddelde intensiteiten in de bacteriesuspensie in dezelfde verhouding staan tot de intensiteiten, waarmede zij werden ingestraald.

Zooals hierboven reeds werd opgemerkt, zien wij uit de in tabel IX gegeven cijfers, dat de lichtverstrooiing door de gebruikte suspensie van *Ph. phosphoreum* zeer aanzienlijk is. De consequentie hiervan is dat wij, alhoewel de absolute quantenintensiteit van het ingestraalde licht is bepaald op de plaats, die wij bij de bestralingsproeven aangaven met: relatieve intensiteit 100, geenszins in staat zijn om de werkelijke intensiteit (c.q. het intensiteitsverloop) in de bacteriesuspensie aan te geven.

Hieruit volgt, dat aan de door ons gevonden waarden voor de specifieke photochemische werking zeker geen absolute waarde mag worden toegekend, echter volgens bovenstaande uiteenzetting wel relatieve. Zoolang slechts voor iedere onderzochte golflengte blijft gelden, dat de gemiddelde intensiteit in de bacteriesuspensie in dezelfde verhouding staat tot de ingestraalde intensiteit, stellen punten van het photochemische inactiveringsspectrum tevens punten voor van het relatieve absorptiespectrum van de photochemisch omgezette verbinding.

§ 4. Pogingen tot uitbreiding der proefnemingen over meer golflengten.

Gezien het bemoedigende resultaat van onze voorloopige bestralingsproeven leek het gewenscht, deze proeven tot een grooter aantal golflengten uit te breiden. Weldra bleek echter, dat dit niet met de tot dusverre gevolgde methode kon worden gerealiseerd, omdat het niet mogelijk was, behalve de drie reeds gebruikte lijnen, nog meer lijnen van voldoende intensiteit te isoleeren. Zelfs bij gebruik van lichtbronnen die slechts lijnen uitzenden (bijv. de kwiklamp en de heliumbuis), bleek het geenszins eenvoudig te zijn in het spectraalgebied, dat voor ons onderzoek moest worden gebruikt: het blauw, het violet en het ultraviolet, met filtercombinaties lijnen te isoleeren. Het lukte dan ook noch bij gebruik van een kwiklamp, noch bij dat van een heliumbuis, verdere spectraallijnen van voldoende zuiverheid in de voor onze proeven gewenschte intensiteit af te zonderen.

Aanvankelijk hadden wij voor ons doel veel verwachtingen van het dispersiefilter volgens Christansen-Weigert, dat bij evenwijdig invallend licht een hoog rendement aan monochromatische straling geeft en waarvan het doorgelaten golflengtegebied door de temperatuur van het filter wordt bepaald. Het gebruik van dit filter bracht echter evenmin verbetering, aangezien de groote verliezen hier optreden bij het evenwijdig maken van de lichtbundel, door de geringe openingshoek van het daarvoor benodigde optische systeem.

Nu het niet mogelijk bleek om langs de weg van met filters geïsoleerde lijnen onze waarnemingen tot een grooter aantal golflengten uit te breiden, restte ons slechts een poging te wagen om onder gebruikmaking van een spectrograaf en onder gelijktijdige reductie van de afmetingen van de bestralingscuvet, de bij bestraling van een bacteriesuspensie optredende photochemische werking aan te toonen.

De bacteriesuspensie bevond zich daartoe in een ronde cuvet van 3 cm lengte en $\frac{3}{4}$ cm doorsnede, die aan de buitenzijde wit was geverfd, op een verticale streep van 1 cm lengte en 1 mm breedte na. De cuvet werd tot even boven de streep gevuld met een suspensie van *Ph. pnospnorem* met een dichtheid van 10 T.E./cm³, waarvoor 2 cm³ suspensie voldoende waren. De aeratie geschiedde met een fijn-uitgetrokken buisje. Een koolboog werd scherp afgebeeld op de voorspleet van een Fuess kwartsspectrograaf. De streep op de cuvet diende nu als spleet voor een bestraling gedurende tien minuten met het bij ca 436 m μ liggende deel van het continue spectrum van de koolboog achter de spectrograaf. Vóór en na de bestraling werd de intensiteit van het bacterie-licht bepaald, door meting van het uit de streep tredende licht, met behulp van de in § 1 sub b beschreven visuele methode. Door de cuvet geheel wit te verven bereikten wij, dat het in de cuvet gestraalde licht door herhaalde inwendige reflecties zoo volledig mogelijk werd benut. Desondanks namen wij bij deze proef geen photochemische werking waar in een golflengtegebied, waarin deze, blijkens onze in § 2 beschreven proeven, bij voldoende intensiteit van het ingestraalde licht moet optreden.

Het was na deze pogingen duidelijk, dat wij, hoe hoopvol het aanvankelijk bereikte resultaat ook leek, voor een mogelijke uitbreiding van het inactiveringsspectrum over een grooter golflengtegebied, naar een geheel andere methode moesten omzien.

Wij vonden de oplossing, door van de bestraling van homogene bacteriesuspensies over te gaan naar die van plaatcultures.

De beschrijving van de gevolgde methode en de daarmee bereikte resultaten vormt het onderwerp van de volgende hoofdstukken van dit proefschrift.

HOOFDSTUK IX.

DE DEFINITIEVE METHODE TER BEPALING VAN HET PHOTOCHEMISCHE INACTIVEERINGSSPECTRUM.

§ 1. De grondslagen der methode.

In § 4 van hoofdstuk VIII beschreven wij een poging om photochemische werking aan te toonen bij bestraling van een bacteriesuspensie, welke zich in een achter een spectrograaf geplaatste microcuvet bevond. Deze poging mislukte, doch bij critische beschouwing van de gebruikte proefopstelling liet het zich aanzien, dat er nog één principiële verbetering moest zijn aan te brengen.

Wanneer het namelijk zou gelukken alle bacteriën, welke bij deze proef homogeen in de suspensie waren verdeeld, samen te brengen voor de op de cuvet aangebrachte spleet, zouden wij bereiken, dat alle bacteriën tegelijkertijd aan de hoogste bestralingsintensiteit zouden zijn blootgesteld.

In beginsel was deze mogelijkheid te realiseeren door van een bacteriesuspensie over te gaan naar een *plaatcultuur*, bij welke wijze van kweken de cellen een zeer compacte laag vormen.

Dat door toepassing van een plaatcultuur inderdaad een vergrooting van de bestralingseffectiviteit kan worden verkregen, bewees de volgende proef.

Onder gebruikmaking van dezelfde koolboog en spectrograaf als bij de hierboven genoemde bestralingsproef, bestraalden wij gedurende vijf minuten een plaatcultuur van *Ph. phosphoreum*, waarvan het oppervlak scherp op het uit de spectrograaf tredende spectrum was ingesteld. Na afloop der bestraling namen wij over een gebied van ca 380 tot ca 460 $m\mu$ een duidelijke photochemische werking waar, in de vorm van een streep van geringere lichtintensiteit dan de daarnaast gelegen onbestraalde cultuurgedeelten. Wij brengen hierbij in herinnering, dat bij de overeenkomstige in § 4 van hoofdstuk VIII beschreven bestralingsproef, bij een bestraling van 2 cm^3 bacteriesuspensie met het golflengtegebied bij ca 436 $m\mu$ gedurende tien minuten, geen vermindering van de intensiteit van het bacterielicht kon worden geconstateerd.

Bovendien bood het gebruik van de plaatcultuur boven dat van een suspensie nog de volgende voordeelen:

- 1e een plaatcultuur heeft gedurende eenige uren een zeer constante lichtintensiteit;
 - 2e er is directe vergelijking mogelijk van de lichtintensiteiten van naast elkaar gelegen bestraalde en onbestraalde cultuurgedeelten.
- De overgang van de homogene bacteriesuspensie naar de plaatcultuur be-
teekende dus een principiële methodische verbetering.

Een omstandigheid, die zeker ook aanmerkelijk tot het uiteindelijk succes

heeft bijgedragen, was, dat wij in dit stadium voor ons onderzoek de beschikking kregen over een lichtbron, die de door ons aanvankelijk gebruikte koolboog en superhoogedruk-kwiklamp in intensiteit meermalen overtrof: de met water gekoelde Philips superhoogedruk-kwiklamp SP 500. Zonder deze lichtbron zou het ons niet mogelijk zijn geweest het photochemische werkingsspectrum, zooals thans is geschied, tot beneden 300 m μ te bepalen.

Een overweging, die eveneens heeft bijgedragen tot de overgang naar de plaatcultures was, dat het lichtverlies door verstrooiing in de zeer compacte bacterielaag van een plaatcultuur waarschijnlijk geringer zou zijn dan in een homogene suspensie met gemiddeld veel grootere onderlinge afstand der cellen. Blijkens onze ervaringen bij de in § 3 van hoofdstuk VIII beschreven intensiteitsmetingen is het door verstrooiing optredende lichtverlies bij bestraling van een homogene bacteriesuspensie zeer aanzienlijk.

In § 6 van dit hoofdstuk beschrijven wij een bestralingsproef, die bovenstaande zienswijze ten eerste steunt.

De bepaling van de intensiteit van het bacterielicht vóór en na de bestraling geschiedde na invoering van de plaatcultuur niet meer visueel, doch langs objectieve, fotografische weg. Het bleek namelijk mogelijk te zijn de bacteriecultuur door middel van het eigen licht te fotografeeren, waarvoor expositietijden van slechts 30 à 45 seconden noodig waren. In principe was hierdoor de mogelijkheid geopend om door één enkele bestralingsproef de photochemische werking voor het geheele ingestraalde golflengtegebied te bepalen.

De intensiteit van het ingestraalde licht werd direct in het spectrum achter de spectrograaf gemeten met de combinatie vacuumthermoelement-galvanometer.

Het bleek wegens de geringe dispersie van de kwartsspectrograaf in het gebied > 400 m μ noodzakelijk te zijn voor de bepaling van de photochemische werking in het zichtbare spectrum een glasspectrograaf te gebruiken.

Het methodisch gedeelte van de bestralingsproeven valt uiteen in de volgende vier hoofdpunten:

- a De gebruikte bacteriecultures.
- b De bestraling van de bacteriecultures.
- c Het bepalen van de intensiteit van het bacterielicht voor en na de bestraling en de berekening van de photochemische werking.
- d De meting van de spectrale energieverdeling in het op de bacteriecultuur geworpen spectrum en de berekening van de specifieke photochemische werking.

Deze hoofdpunten zullen achtereenvolgens worden besproken.

§ 2. De gebruikte bacteriecultures.

Van de aanvang af was het duidelijk, dat de eischen, welke aan de te gebruiken bacteriecultures moesten worden gesteld, zeer hoog waren: de intensiteit van het bacterielicht moest zoo hoog mogelijk zijn, teneinde de belichtingstijd bij de fotografische intensiteitsbepaling zoo kort mogelijk te maken;

verder diende de cultuur qua intensiteitsverdeling zeer homogeen te zijn.

Onder de tot onze beschikking staande lichtbacteriestammen waren er slechts drie, welke een voor onze proeven voldoende lichtintensiteit bezaten, namelijk *Ph. phosphoreum*, *Ph. Fischeri* en *Ph. splendidum*. Een verdere beperking echter in de keuze van het voor onze proeven bruikbare bacteriemateriaal was gelegen in de noodzakelijkheid, de bacteriën te bestralen op een volkomen heldere, dus niet licht-verstrooiende, onderlaag. Een vaste voedingsbodem bereid met behulp van agar-agar is sterk opalescent en verstrooit dus het licht zeer sterk. Het ligt voor de hand, dat ten gevolge hiervan de intensiteit van het op een willekeurige plaats der bacteriecultuur ingestraalde licht door een niet met zekerheid vast te stellen verstrooiingsfactor wordt beïnvloed, terwijl door de verstrooiing tevens verontreiniging door licht van andere golflengten plaats vindt en dus de breedte van de ingestraalde golflengtegebieden op onoverzichtelijke wijze afneemt. Een vaste voedingsbodem bereid met door middel van kippeneiwit geklaarde gelatine is — althans in het zichtbare gebied — afgezien van een geringe Tyndall-verstrooiing optisch helder en is naar wij meenen de eenige, welke aan deze eisch voldoet. Dientengevolge bleef ons als eenig proefobject *Ph. phosphorum* over, aangezien zoowel *Ph. Fischeri* als *Ph. splendidum* gelatine doen vervloeien.

Het kweken van *Ph. phosphoreum* geschiedde in Petri-schalen op een voedingsbodem, bestaande uit 1% pepton-gelatine, die 3% keukenzout bevatte en 12% gelatine. Deze voedingsbodem werd geënt met een bacteriesuspensie met een dichtheid van 5 à 8 T.E. per cm^3 , welke door filtreren (door filtreerpapier van Schleicher en Schüll no. 595) zorgvuldig was bevrijd van vlokjes geagglutineerde cellen.

Dit filtreren kon uiteraard nauwelijks onder aseptische voorwaarden geschieden. In dit stadium is dit echter niet zeer belangrijk meer, omdat vreemde micro-organismen naast de sterke overmaat der lichtbacteriën in de korte kweektijd van 18 à 20 uur en bij een temperatuur van 15° à 17° C. waarbij werd gekweekt, zich blijkens onze ervaringen niet ontwikkelen op de door toevoeging van 3% NaCl vrij selectieve voedingsbodem. Wij hebben er ons van overtuigd, dat de cultures bij de bovenbeschreven wijze van behandelen na 3 maal 24 uur staan nog geen infectie vertoonden, terwijl wij ze steeds na omstreeks 24 uur gebruikten.

Door heen en weer zwenken van de Petri-schaal bereikten wij, dat de suspensie homogeen over het geheele oppervlak werd verdeeld, waarbij het soms geruime tijd duurde, voordat alle luchtbelletjes van het oppervlak waren verdwenen. Nadat het gelatine-oppervlak geheel door de suspensie was bevochtigd, werd deze zoo volledig mogelijk afgeschonken. Het kweken geschiedde vervolgens bij een temperatuur van 15° à 17° C. gedurende 18 à 20 uur. Na deze tijd was de lichtintensiteit optimaal, bleef vervolgens eenige uren vrijwel constant, om tenslotte met de tijd langzaam af te nemen.

Voor de bestralingsproeven met het in § 3 te beschrijven apparaat was het noodig, dat uit een aldus gekweekte cultuur gelatineblokjes werden gesneden met een volkomen gelijkmatige dikte. Wij bereikten dit door de volgende kunstgreep.

De leege Petri-schalen werden op een zoo goed mogelijk horizontale onderlaag opgesteld en tot een hoogte van $\frac{1}{4}$ cm gevuld met een 2%-ige oplossing van agar-agar, welke 3% NaCl bevatte. Nadat deze laag was gestold, werden in iedere Petri-schaal twee steriele microscopische voorwerpglaasjes met ca 1 cm tusschenruimte op de agarlaag gelegd. Hierop werd dan de peptongelatine in een laagdikte van $\frac{3}{4}$ à 1 cm gegoten. Nadat deze laag was gestold, entten en kweekten wij op de boven beschreven wijze. Op elk der voorwerpglaasjes bevond zich nu een overal even dikke laag gelatine, waarop de bacteriën waren gegroeid.

Wilden wij tot een bestralingsproef overgaan, dan werd een voorwerpglaasje met de geheele daarop liggende gelatinelaag uitgesneden, waarbij de onderzijde van het voorwerpglaasje van agar-agar werd bevrijd. Van de op het voorwerpglaasje liggende gelatinelaag sneden wij met een scherp mes zooveel weg, dat wij een in de lengterichting van het glaasje liggend gelatineblokje overhielden, dat aan de bovenzijde 3,5 cm lang en 1 cm breed was. De zijkanten van het gelatineblokje waren schuin weggesneden, zoodat de basis iets grootere afmetingen had; dit werd gedaan om het aanhechtingsvlak van het gelatineblokje te vergrooten, teneinde met het naderhand verticaal stellen van het voorwerpglas een doorzakken van de gelatinelaag te voorkomen. Het uiteindelijke beeld is in figuur 9 weergegeven.

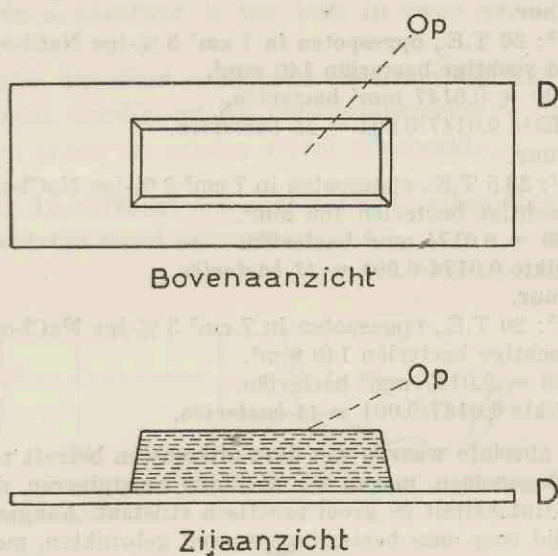


Fig. 9.

Boven- en zijaanzicht van een op het voorwerpglaasje D uitgesneden gelatineblokje. De bacterielaag bevindt zich op het oppervlak Op van het gelatineblokje.

Gedurende de verdere bewerkingen — photografeeren en bestralen — werd het voorwerpglaasje in de slede S van het in § 3 beschreven instelapparaat bevestigd.

Microscopisch zijn bij een vergrooting van ca 120 maal op het gelatine-oppervlak geen afzonderlijke koloniën van *Ph. phosphoreum* meer te zien; deze zijn vergroeid tot een samenhangend geheel zonder plekken, waarop het gelatine-oppervlak niet volledig met bacteriën is bedekt.

Wij konden aantonen, dat na het bereiken van de optimale lichtintensiteit geen verdere groei van de bacteriecultuur meer optrad. Dit geschiedde door de volgende benaderende bepaling van de gemiddelde dikte der bacterielaag.

De in de Petri-schaal gegroeide bacteriën werden na de gewenschte incubatietijd met behulp van een zacht penseel en een 3 %-ige NaCl-oplossing van het gelatine-oppervlak afgeborsteld en homogeen verdeeld in een bekend volumen 3 %-ige NaCl-oplossing. Van de verkregen suspensie bepaalden wij in duplo de dichtheid in Tromsdorff-eenheden per cm^3 suspensie (mm^3 vochtige bacteriën per cm^3 suspensie). Zodoende vonden wij het volumen van de bacteriemassa, die op het geheele gelatine-oppervlak was gegroeid. Uit het bekende oppervlak van de cultuur kon nu worden berekend het volumen in mm^3 van de bacteriën, welke op 1 mm^2 van het cultuuroppervlak waren gegroeid.

Microscopisch was voor de gemiddelde doorsnede van de coccenvormige cellen van *Ph. phosphoreum* de waarde van ca 1μ gevonden. Van een enkelvoudige laag bacteriën bedraagt de inhoud aanwezig op 1 mm^2 cultuuroppervlak dus 0.001 mm^3 . Uit het voor de betreffende cultuur bepaalde bacterievolumen per mm^2 kon, door deeling door het volumen bij een laagdikte één, de gemiddelde laagdikte van de cultuur worden gevonden.

Straal van de Petri-schaal 55 mm, oppervlak 9500 mm^2 .

Proeven:

- a. incubatietijd 70 uur.
 dichtheid per cm^3 : 20 T.E., opgespoten in 7 cm^3 3 %-ige NaCl-oplossing.
 totale hoeveelheid vochtige bacteriën 140 mm^3 .
 per mm^2 $140/9500 = 0.0147 \text{ mm}^3$ bacteriën.
 gemiddelde laagdikte $0.0147/0.001 = 15$ bacteriën.
- b. incubatietijd 43 uur.
 dichtheid per cm^3 : 23.5 T.E., opgespoten in 7 cm^3 3 %-ige NaCl-oplossing.
 totale volumen vochtige bacteriën 165 mm^3 .
 per mm^2 $165/9500 = 0.0174 \text{ mm}^3$ bacteriën.
 gemiddelde laagdikte $0.0174/0.001 = 17$ bacteriën.
- c. incubatietijd 20 uur.
 dichtheid per cm^3 : 20 T.E., opgespoten in 7 cm^3 3 %-ige NaCl-oplossing.
 totale volumen vochtige bacteriën 140 mm^3 .
 per mm^2 $140/9500 = 0.0147 \text{ mm}^3$ bacteriën.
 gemiddelde laagdikte $0.0147/0.001 = 15$ bacteriën.

Hoewel wat de absolute waarde van deze uitkomsten betreft zeker eenige reserve moet worden in acht genomen, mogen wij nochtans constateeren, dat na het bereiken van de optimale lichtintensiteit de groei practisch stilstaat. Aangezien wij de cultures nooit binnen deze tijd voor onze bestralingsproeven gebruikten, mogen wij aannemen, dat de bestralingsproeven niet door tusschentijdsche groei en daarmee verbonden veranderingen van de lichtintensiteit zijn gecompliceerd.

Wij kunnen uit de bepaling van de gemiddelde laagdikte der gebruikte cultures nog een belangrijke conclusie trekken. Bij onze voorbereidende bestralingsproeven (zie hoofdstuk VIII) vonden wij bij de intensiteitsmeting van het doorgestraalde licht, dat — tenminste voor de 436, de 405 en de $366 \text{ m}\mu$ -lijn — het intensiteitsverlies van de lichtbundel bij het doorstralen van een suspensie van *Ph. phosphoreum* met een dichtheid van 10 T.E. per cm^3 in wezen een verstrooiingseffect is en dat het lichtverlies door absorptie verwaarloosbaar klein is. Denken wij ons de bacteriën uit de suspensie, welke een laagdikte had van 1 cm, neergeslagen als een vlakke laag, waarvan het oppervlak

in cm^2 in getalwaarde gelijk is aan het volumen in cm^3 der suspensie, dan bedraagt de dikte van deze bacterielaag 100 bacteriën.

Voor deze laag toonden wij aan, dat de absorptie bij de lichtverzwakking geen invloed van beteekenis heeft; eerst recht geldt dit dus voor de gebruikte plaatcultures, waarvan de gemiddelde laagdikte zooals wij zagen slechts ongeveer 15 bacteriën bedraagt.

§ 3. De bestraling van de bacteriecultures.

Zooals in de inleiding over de grondslagen der methode reeds werd opgemerkt, kon de bepaling van het inactiveringsspectrum voor het ultra-violette en het zichtbare spectraalgebied bezwaarlijk met één en dezelfde spectrograaf geschieden. Door de geringe dispersie in het zichtbare gebied was het met name niet goed mogelijk het begin van het inactiveringsspectrum aan de zijde der lange golflengten met een kwartsspectrograaf voldoende nauwkeurig vast te leggen. Onze bestralingsproeven vallen dus noodzakelijkerwijze in twee gedeelten uiteen. Aangezien wij de meeste experimenten met het ultra-violette spectraalgedeelte hebben verricht, zullen wij de voorbeelden, welke ter illustratie van de gevolgde methode worden gegeven, kiezen uit de opnamen met de kwartsspectrograaf. Het eenige verschil tusschen de twee opstellingen is, dat voor metingen in het zichtbare spectraalgebied de kwartsspectrograaf wordt vervangen door een glasspectrograaf met grootere dispersie.

De benodigde apparatuur is het best in twee gedeelten te beschrijven en wel:

1. Het gedeelte, dat dient voor het ontwerpen van het spectrum.
2. Het apparaat, noodig om het cultuuroppervlak te brengen in het vlak, waarin het spectrum scherp wordt afgebeeld.

ad 1. Figuur 10 vertoont een schematische afbeelding van de opstelling, waarmede het spectrum werd ontworpen.

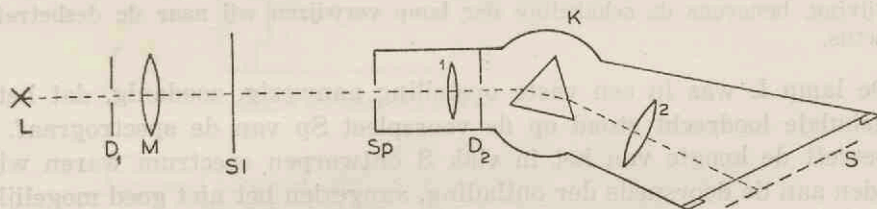


Fig. 10.

Schematische afbeelding van de opstelling voor het ontwerpen van het voor de bestralingen gebruikte zeer lichtsterke kwikspectrum. L is de lichtende kwartsbuis van de watergekoelde Philips superhoogedruk-kwiklamp; K is de kwartsspectrograaf. Het spectrum is scherp in het achter de spectrograaf gelegen vlak S. Voor de verdere beschrijving zie men de tekst.

De lichtbron L werd via het onveranderlijke diafragma D_1 door middel van de kwartslens M scherp afgebeeld op de voorspleet Sp van de kwartspectrograaf K.

Lens 1 bevond zich op een afstand van 13 cm van de voorspleet Sp; de afstand van lens 2 tot aan het gebied bij 360 $m\mu$ in het spectrum bedroeg 15 cm. De doorsnede der lenzen 1 en 2 was 3 cm. De dispersie in het spectrum bij 360 $m\mu$ bedraagt 10 $m\mu/mm$. Als constante breedte van de spleet Sp namen wij 0.3 mm. Deze spleetbreedte kwam in het spectrum overeen met een golflengtegebied, waarvan de breedte bedraagt: bij 400 $m\mu$, 12 $m\mu$; bij 360 $m\mu$, 9 $m\mu$; bij 320 $m\mu$, 6,5 $m\mu$; bij 280 $m\mu$, 4 $m\mu$. De overeenkomstige getallen, behorende bij de voor metingen in het zichtbare spectraalgebied gebruikte glasspectrograaf, zijn op blz. 105 vermeld.

Het spectrum was scherp in het vlak S, dat op geringe afstand voorbij het achtervlak van de spectrograaf is gelegen. De intensiteit van het geheele spectrum kon worden geregeld met behulp van het in de spectrograaf aangebrachte irisdiafragma D₂. Vóór de spectrograaf bevond zich nog een sluitersl.

Als lichtbron L gebruikten wij een watergekoelde Philips superhoogedruk-kwiklamp S.P. 500. Het spectrum van deze lamp vertoont een, vooral in het zichtbare spectraalgebied, sterke continue emissie, waarop de verbrede kwiklijnen zijn gesuperponeerd. Ook in het nabije ultra-violet vertoont het continuüm nog een aanmerkelijke intensiteit. Men zie hiervoor § 5 van dit hoofdstuk, waarin de energiemetingen in het spectrum worden beschreven.

De lamp bestaat uit een dikwandig buisje van kwarts met ingesmolten wolfram-electroden. In het capillaire lumen van het buisje bevindt zich een weinig kwik en een inactief gas onder hoge druk (± 70 atm.). De lengte van de ontleding, die door 700 Volt 50 perioden wordt in stand gehouden, bedraagt 12.5 mm, de doorsnede 1 mm. De lamp werd via een transformator aangesloten op het 220 Volt wisselstroomnet en heeft een vermogen van 500 Watt. Om de lamp bevindt zich een metalen koelinrichting, waarin een kwartsvenster is aangebracht ter doorlating van de straling. De koeling geschiedde met stroomend leidingwater. Op de lange duur vormde zich op de kwarts-ontladingsbuis een zeer gering neerslag, dat de ultra-violet straling met een golflengte korter dan 300 $m\mu$ sterk absorbeert. Teneinde een hinderlijke vorming van dit neerslag te voorkomen werd de ontladingsbuis dikwijls gereinigd. Voor een nadere beschrijving, benevens de schakeling der lamp verwijzen wij naar de desbetreffende prospectus.

De lamp L was in een vaste opstelling aanwezig, zoodanig, dat het ontladingsbuisje loodrecht stond op de voorspleet Sp van de spectrograaf. Voor wat betreft de hoogte van het in vlak S ontworpen spectrum waren wij dus gebonden aan de doorsnede der ontleding, aangezien het niet goed mogelijk was hetzij de lamp L, hetzij de spectrograaf met toebehooren over een hoek van 90 graden te draaien. De doorsnede van de ontleding bedroeg 1 mm, de vergrooting door de lens M bedroeg 2 : 1, waardoor bij de afbeelding 1 : 1 door de spectrograaf de hoogte van het spectrum uiteindelijk 2 mm werd. Dit was bij de door ons gevolgde methode voldoende.

ad 2. Voor het scherpstellen van het spectrum op het oppervlak van de bacteriecultuur ontwierpen wij het in de figuren 11 en 12 weergegeven apparaat.

Boven de grondplaat A (zie: fig. 11), welke aan het chassis C is bevestigd, loopen twee ronde rails r_1 en r_2 , door middel waarvan het eigenlijke instelapparaat met behulp

van een schroefbeweging met trommelaflezing naar voren en naar achteren kan worden verplaatst. Het instelapparaat bestaat uit de plaat B, waaraan van onderen eenige blokjes zitten ter geleiding langs de rails r_1 en r_2 en waarvan de voorzijde de sledehouder H draagt. De voortbeweging van het instelapparaat geschiedt door middel van

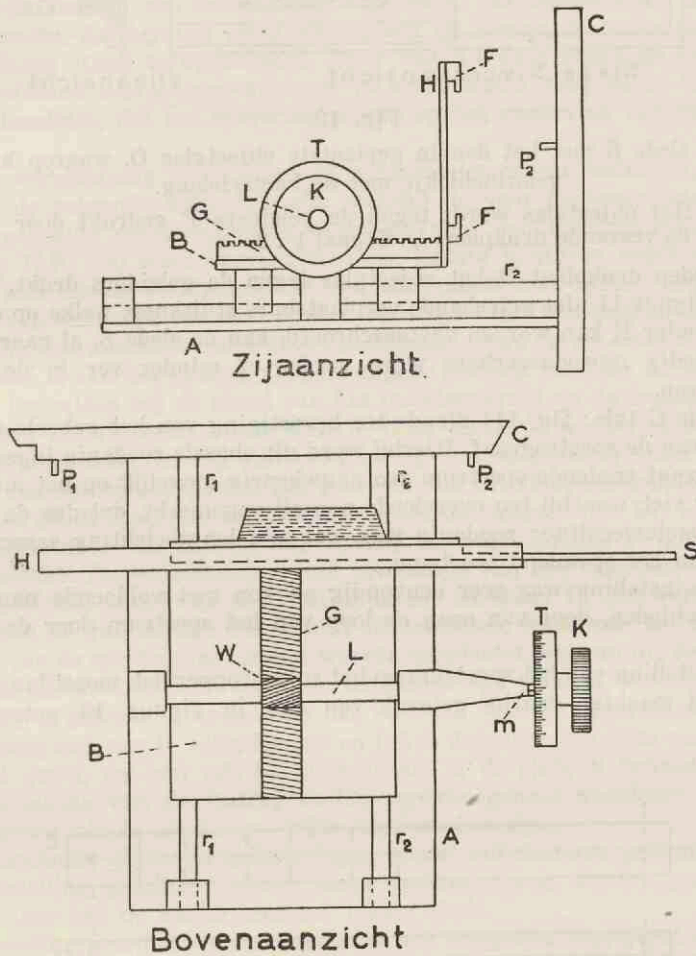


Fig. 11.

Apparaat voor het scherpstellen van het bestralingsspectrum op het oppervlak van de bacteriecultuur.

In het bovenaanzicht is de slede S met het gelatineblokje in de sledehouder H geplaatst; in het zijaanzicht is de slede S weggelaten. Voor de beschrijving van het apparaat verwijzen wij naar de tekst.

Schaal 1 : 2.

de knop K, welke op de as L is bevestigd; het eveneens op de as L geplaatste wormwiel W grijpt in een op de plaat B van het instelapparaat bevestigde getande staaf G. In de sledehouder H past de slede S (zie: fig. 12), welke op zijn beurt weer het objectglas met de zich daarop bevindende gelatinelaag plus bacteriecultuur draagt. Het objectglas O wordt in de slede S gefixeerd, doordat de door middel van twee veertjes met de

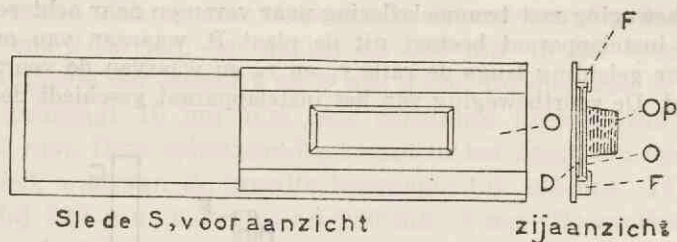


Fig. 12.

De slede S met het daarin geplaatste objectglas O, waarop het gelatineblokje met de bacterielaag.

Het objectglas wordt tegen de geleiders F gedrukt door de veerende drukplaat D. Schaal 1 : 2.

slede S verbonden drukplaat D het objectglas tegen de geleiders drukt. Door middel van een in de figuur 11 niet geteekende verplaatsbare stuitknop, welke op de bovenrand van de sledehouder H kan worden vastgeschroefd, kan de slede S, al naar de proef dit eischt, op volledig reproduceerbare wijze verder of minder ver in de sledehouder worden geschoven.

Het chassis C (zie: fig. 11) diende ter bevestiging van het geheele apparaat aan de achterzijde van de spectrograaf. Hierbij werd dit chassis zoodanig ingesteld, dat het uit de spectrograaf tredende spectrum zoo nauwkeurig mogelijk op het midden van de bacteriecultuur viel, waarbij ten overvloede nog zij opgemerkt, dat dus de uiteindelijke stand van de bacteriecultuur zoodanig was, dat zijn lengterichting samenviel met de lengterichting in het opvallend spectrum.

De hoogte-instelling was zeer eenvoudig en kon met voldoende nauwkeurigheid op het oog geschieden, door van opzij de loop van het spectrum door de gelatinelaag waar te nemen.

De scherpstelling van het spectrum op het cultuuroppervlak moest langs een omweg geschieden. Wij maakten daarbij gebruik van het in figuur 13 geteekende hulpparaat.

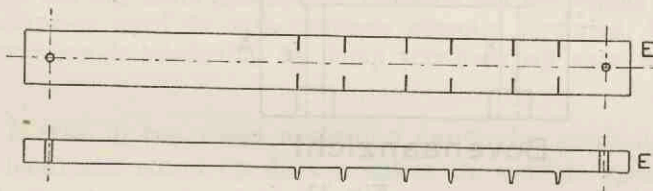


Fig. 13.

Hulpparaat voor het scherpstellen van het bestralingsspectrum op het oppervlak van de bacteriecultuur. Beschrijving in de tekst.

Op een massieve messing staaf E zijn volgens de teekening messing wiggetjes aangebracht, welke een lengte hebben van 2.5 mm en waarvan de uiteinden een doorsnede hebben van $1/3$ mm. De hoogte van de wiggetjes bedraagt 3 mm en is voor alle wiggetjes nauwkeurig even groot. Verder zijn in de messing staaf twee cilindervormige gaten geboord, wier afstand en diameter zoodanig zijn gekozen, dat de staaf kan worden bevestigd aan het chassis C (in fig. 11) door hem op de pennetjes P_1 en P_2 te schuiven. De hoogte waarop de pennetjes zijn aangebracht is zoodanig, dat het midden van de open ruimte, welke door de uiteinden der wiggetjes wordt begrensd (in fig. 13 door de stippellijn aangegeven), even hoog is gelegen als het midden van de bacteriecultuur.

De scherpstelling van het spectrum op het oppervlak van de bacteriecultuur geschiedde nu als volgt:

De messing staaf E werd op de pennetjes P_1 en P_2 geschoven en de bacteriecultuur werd door draaien aan de instelknop K juist met zijn oppervlak tegen de wiggetjes aangedrukt. De hierbij behorende stand van het instelapparaat werd op de trommel T tot in tienden van schaaldeelen afgelezen. Vervolgens werd de bacteriecultuur teruggedraaid, de messing staaf verwijderd en hierna de bacteriecultuur in de daareven afgelezen stand teruggebracht. Door van uit deze stand de bacteriecultuur nog over een afstand overeenkomende met 16 schaaldeelen naar voren te verplaatsen, bereikten wij tenslotte, dat het spectrum scherp op het oppervlak van de cultuur was afgebeeld.

Dat deze verplaatsing naar voren 16 schaaldeelen moest bedragen, was eens en voor altijd op de volgende wijze bepaald, waarbij de voor de bestralingsproeven gebruikte watergekoelde superhoogedruk-kwiklamp door een luchtgekoelde superhoogedruk-kwiklamp H.P. 500 werd vervangen. Deze laatste lichtbron zendt slechts smalle lijnen uit en niet zooals eerstgenoemde een continuüm met lijnen, hetgeen voor de scherpstelling van wezenlijk voordeel is. Een objectglas met een daarop gekit vierkant, gepolijst staafje van fluoresceerend glas (uraanglas) werd in de slede S geschoven en de messing staaf E aan het chassis C opgehangen. Evenals dit voor de bacteriecultuur is beschreven, bepaalden wij de stand van het instelapparaat op de trommel T, waarbij het voorvlak van het fluoresceerende staafje juist tegen de wiggetjes was geplaatst: stand I. Vervolgens brachten wij, na verwijdering van de messing staaf E, door naar voren draaien van het instelapparaat het voorvlak van het fluoresceerende staafje op de plaats, waar het uit de spectrograaf tredende spectrum scherp was. Dit kon zeer nauwkeurig geschieden, door waarneming van de loop der afzonderlijke kwiklijnen (resp. de door deze opgewekte fluorescenties) in het inwendige van het fluoresceerende staafje. De hierbij behorende stand van het instelapparaat zij stand II. Het verschil tusschen stand I en stand II gaf nu aan het aantal schaaldeelen, waarover het instelapparaat in de richting van de spectrograaf moest worden verplaatst, om van uit de stand waarin het fluoresceerende staafje juist tegen de wiggetjes van staaf E was aangedrukt, het spectrum scherp afgebeeld te krijgen op het voorvlak van het fluoresceerende staafje. Deze verplaatsing bedroeg 16 schaaldeelen en het is duidelijk, dat deze waarde evenzeer geldt voor het geval, dat wij een bacteriecultuur in de slede S hebben geplaatst en onder gebruikmaking van de watergekoelde superhoogedruk-kwiklamp als lichtbron.

De voordeelen van de beschreven wijze van instellen zijn:

- a. de wisselende dikte der gelatinelagen wordt automatisch geëlimineerd;
- b. de instelling geschiedt geheel langs indirecte weg, zoodat geen voortijdige bestraling van de bacteriecultuur plaats vindt.

Bij de instelling werd er steeds op gelet of alle wiggetjes tegelijkertijd het cultuuroppervlak raakten, met andere woorden er werd vastgesteld, of de betreffende gelatinelaag wel een gelijkmatige dikte bezat. Bleek dit niet zoo te zijn, dan werd een dergelijke cultuur niet voor een bestralingsproef gebruikt.

Als gevolg van de beschreven wijze van instellen verschenen op de bacteriecultuur twee reeksen streepjes op de plaatsen, waar de wiggetjes het cultuuroppervlak hadden geraakt. Deze streepjes zijn bij de uitwerking der proeven nog van belang, zooals bij de bespreking van de fotografische intensiteitsbepaling van het bacterieelicht (§ 4 van dit hoofdstuk) nader zal worden toegelicht.

Een bestralingsproef verliep nu als volgt:

1. Het objectglas met de daarop uitgesneden bacteriecultuur werd in de slede S bevestigd en deze in de sledehouder van het instelapparaat geplaatst.
2. De messing staaf E werd aan het chassis C bevestigd en het oppervlak

van de bacteriecultuur juist tegen de wiggetjes gedraaid. De bijbehorende stand van het instelapparaat werd op de trommel T afgelezen.

3. De onbestraalde cultuur werd gefotografeerd (beschrijving zie volgende paragraaf).

4. Na herplaatsing van de slede in het instelapparaat werd dit, na verwijdering van de messing staaf E, gebracht in de onder 2 afgelezen stand, minus 16 schaaldeelen.

5. De bacteriecultuur werd gedurende de gewenschte tijd en met de gewenschte intensiteit bestraald.

6. De bestraalde cultuur werd gefotografeerd.

Tijdens de bestraling zoowel als tijdens het photografeeren, bleef het objectglas met de gelatinelaag in de slede S geplaatst. De slede werd in zijn geheel van het bestralings- naar het fotografisch apparaat overgebracht.

Op de bestralingsproef volgde dan steeds nog de meting van de spectrale energieverdeling in het achter de spectrograaf ontworpen spectrum. Deze meting wordt afzonderlijk in § 5 van dit hoofdstuk beschreven. Eerst volgt thans de beschrijving van de langs fotografische weg uitgevoerde intensiteitsbepaling van het door de bacteriën uitgezonden licht vóór en na de bestraling.

§ 4. Het bepalen van de intensiteit van het bacterielicht voor en na de bestraling en de berekening van de photochemische werking.

De gevolgde methode is weer het gemakkelijkst in twee gedeelten te bespreken:

1. Het photografeeren van de bacteriecultuur vóór en na de bestraling.
2. Het afleiden van de intensiteiten van het bacterielicht vóór en na de bestraling uit de fotografische opnamen.

ad 1. Voor het photografeeren gebruikten wij de in figuur 14 schematisch aangegeven, eenvoudige opstelling.

De lens L ontwierp een beeld 1 : 1 van de lichtende bacteriecultuur op de fotografische plaat A (Ilford Special Rapid, extra sensitive; ontwikkeld bij 18° C., gedurende zes minuten in metol-borax).

Het diafragma D, waarvan de rechthoekige opening 35×8 mm bedraagt, was zoo geplaatst, dat, wanneer het oppervlak van de bacteriecultuur in één vlak lag met de achterrand van het diafragma, de cultuur scherp op de fotografische plaat was afgebeeld.

Om deze instelling te bereiken werd de slede S, waarin het objectglas met de bacteriecultuur was aangebracht, in het instelapparaat C geplaatst. De slede werd hierin op zijn plaats gehouden door de geleider R en de knop K. Het instelapparaat C bezat twee micrometerschroeven (in de figuur niet geteekend), voor zijwaartsche en vóór- en achterwaartsche beweging. De hoogte-instelling van het instelapparaat C was onveranderlijk. De fotografische plaat A was in een in verticale richting verplaatsbaar chassis geplaatst (niet geteekend), waardoor het mogelijk was meerdere opnamen op één plaat te verkrijgen.

Reproductie van enkele fotografische negatieven, verkregen door het opnemen van eenige bacterieculturen in het eigen licht, op verschillende tijden na afloop der bestraling.

A onmiddellijk na een bestraling gedurende twee minuten; de afzonderlijke kwiklijnen zijn duidelijk waarneembaar.

B twee uur na afloop der bestraling; de photochemische werking is reeds weer sterk afgenomen. In het gebied $< 300 \text{ m}\mu$ is de intensiteit van het bacterieel licht hooger dan in het naastgelegen onbestraalde gebied.

C de normale photochemische werking is geheel verdwenen. In het gebied $< 300 \text{ m}\mu$ is volledige uitdoving opgetreden.

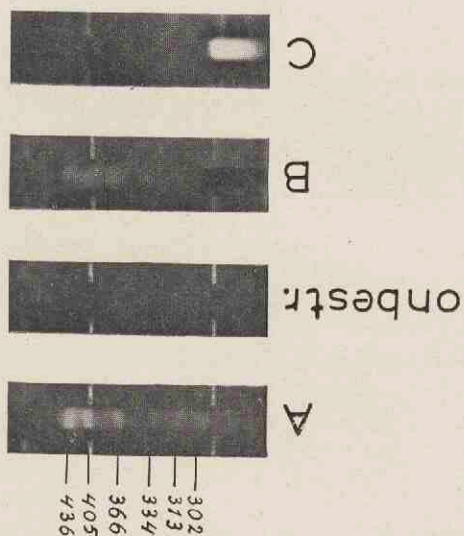


Fig. 29.

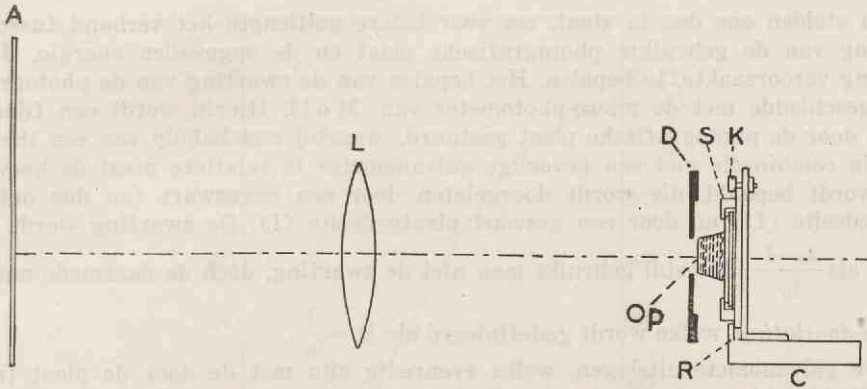


Fig. 14.

Schematische afbeelding van de opstelling voor het photografeeren van de onbestraalde en de bestraalde bacteriën.

De lens L ontwerpt een beeld 1 : 1 van de lichtende bacteriecultuur Op op de fotografische plaat A. Verdere beschrijving in de tekst.

Omdat de intensiteit van het bacterielicht van dag tot dag eenigszins varieerde in afhankelijkheid van niet geheel controleerbare uitwendige omstandigheden, bepaalden wij vóór iedere serie bestralingsproeven door middel van een tijdreeks de meest geschikte belichtingstijd. Deze belichtingstijd varieerde tusschen 30 en 45 seconden.

In fig. 15 zijn de fotografische opnamen weergegeven van een onbestraalde en een bestraalde bacteriecultuur.

Zowel op de bestraalde, als op de onbestraalde cultuur ziet men de indrukken van de wiggetjes (zie § 3, ad 2). Deze indrukken speelden bij de beoordeling van de bruikbaarheid van de opnamen en bij de uitwerking ervan een belangrijke rol. In de eerste plaats was aan de scherpte waarmee zij waren weergegeven de afbeeldingsscherpte van de bacteriecultuur op de fotografische plaat te controleren en in de tweede plaats dienden zij, om overeenkomstige gedeelten van de onbestraalde en de bestraalde cultuur op elkaar te betrekken.

ad 2. Het afleiden van de intensiteiten, welke op overeenkomstige plaatsen door de bacteriën vóór en na de bestraling waren uitgezonden, uit de verkregen opnamen, geschiedde langs de voor fotografische intensiteitsmetingen gebruikelijke weg, door photometreeren van de negatieven, uitmeten van de photogrammen en het met behulp van de zwartingskrommen omzetten van de procentueele doorlatingen in relatieve intensiteiten. Deze methode is uitvoerig beschreven in de monographie: „Objektive Spektralphotometrie” van Ornstein, Moll en Burger (96). In het kort geven wij slechts de hoofdpunten van de door ons gevolgde werkwijze weer en verwijzen voor een uitvoerige bespreking naar genoemde monographie.

Na het opnemen van de werkingsspectra, plaatsten wij op dezelfde fotografische plaat de zwartingsmerken met behulp van een geijkte wolfram bandlamp, door voor een reeks intensiteiten — verkregen door variatie van de stroomsterkte — de door de lamp en een willekeurige spectrograaf ontworpen spectra te photografeeren. Voor iedere golflengte was de relatieve intensiteit af te leiden uit de gebruikte stroomsterkte. De

spectra stelden ons dus in staat, om voor iedere golflengte het verband tusschen de zwarting van de gebruikte fotografische plaat en de opgevallen energie, die deze zwarting veroorzaakte, te bepalen. Het bepalen van de zwarting van de fotografische plaat geschiedde met de micro-photometer van Moll. Hierin wordt een fijne lichtbundel door de fotografische plaat gestuurd, waarbij met behulp van een thermoëlement in combinatie met een gevoelige galvanometer in relatieve maat de hoeveelheid licht wordt bepaald, die wordt doorgelaten door een ongezwart (en dus onbelicht) plaatgedeelte (I_0) en door een gezwart plaatgedeelte (I). De zwarting wordt gedefinieerd als $\frac{I_0 - I}{I_0}$. Meestal gebruikt men niet de zwarting, doch de daarmee nauw ver-

bonden *doorlating*, welke wordt gedefinieerd als $D = \frac{I}{I_0}$.

De galvanometeruitslagen, welke evenredig zijn met de door de plaat tredende hoeveelheid licht, worden registrografisch vastgelegd.

Voor iedere golflengte kon nu de zoogenaamde *zwartingskromme* worden geteekend, waarbij de gemeten zwarting werd uitgezet tegen de logarithme van de opgevallen energie. Heeft men de zwartingskromme éénmaal voor een bepaalde golflengte geconstrueerd, dan kan men omgekeerd uit de zwarting door licht van deze golflengte teweegebracht, de opgevallen energie op de zwartingskromme aflezen. Strikt genomen zouden wij — aangezien het door de bacteriën uitgezonden licht niet monochromatisch is — de zwartingskromme voor licht van die samenstelling moeten bepalen. Dit bleek echter overbodig te zijn, omdat voor de golflengten tusschen 4400 en 5000 Å — het hoofdemissiegebied der lichtbacteriën — de zwartingskrommen vrijwel evenwijdig waren, terwijl bovendien boven 5000 Å de gevoeligheid der gebruikte fotografische plaat snel tot vrijwel 0 daalde. Wij bepaalden dan ook slechts voor vier golflengten uit het spectrum der wolfram bandlamp tusschen 4400 en 5000 Å de zwartingskrommen en gebruikten het gemiddelde hiervan als zwartingskromme voor het afleiden van de door de bacteriecultures uitgezonden lichtintensiteiten uit de gemeten zwartingen.

In fig. 16 is een dergelijke zwartingskromme weergegeven.

In de figuur zijn zoowel de procentueele zwarting als de procentueele doorlating aangegeven. De energie is in een willekeurige maat logarithmisch uitgezet. Aangezien de energieën het nauwkeurigst vastliggen op het lineaire gedeelte der zwartingskromme (tusschen 30 en 70 % zwarting, resp. doorlating), hebben wij de belichtingstijd steeds zoo gekozen, dat de zwartingen binnen dit gedeelte vielen.

De door het photometreeren verkregen micro-photogrammen vertoonen steeds eenigszins getande lijnen, welke tandingen worden veroorzaakt door de korrel van de fotografische plaat. In ons geval kwamen hier nog bij de onregelmatigheden veroorzaakt door de uiteraard nooit volkomen homogene lichtemissie der bacteriecultuur. Voorzover deze onregelmatigheden van systematische aard waren, werden zij voldoende geëlimineerd door de photometreering van de opnamen vóór en na de bestraling nauwkeurig op dezelfde hoogte uit te voeren. De toevallige onregelmatigheden konden grotendeels worden uitgeschakeld door in het te bestralen, resp. bestraalde cultuurgedeelte niet éénmaal, doch drie maal te photometreeren op verschillende hoogte en wel: precies in het midden van het werkingsspectrum, 0.3 mm boven en 0.3 mm onder het midden ervan en deze drie photometercurven te middelen.

Fig. 17 geeft schetsmatig de wijze van photometreeren van een fotografische opname eener bacteriecultuur in onbestraalde en in bestraalde toestand weer.

h is de hoogte van het bestraalde cultuurgedeelte. In fig. 17 zijn de drie photometreeringen in het bestraalde gebied (resp. het te bestralen gebied) aangegeven met b_1 , b_2 en b_3 . Verder werden beide opnamen op de plaatsen aangegeven met a , dat wil zeggen op overeenkomstige hoogten in het niet bestraalde cultuurgedeelte, gephotometreerd. De reden hiervoor was, dat wij rekening moesten houden met een geringe achteruitgang van de intensiteit van het bacterielicht door andere oorzaken dan de uitwendige bestraling, bijv. door temperatuurschommeling tijdens de proef, door vocht-

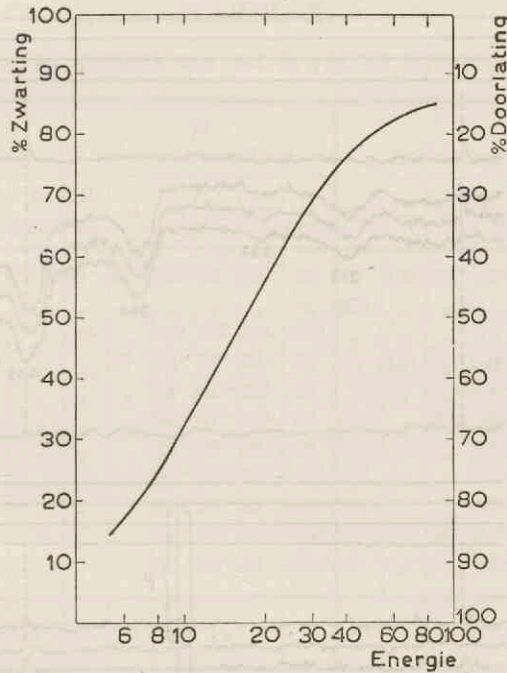


Fig. 16.

Voorbeeld van een zwartingskromme.

Abscis: de relatieve energie, logaritmisch uitgezet; ordinaat: de procentuele zwarting en de procentuele doorlating. Tusschen 30 en 70% doorlating (zwarting) verloopt de zwartingskromme lineair.

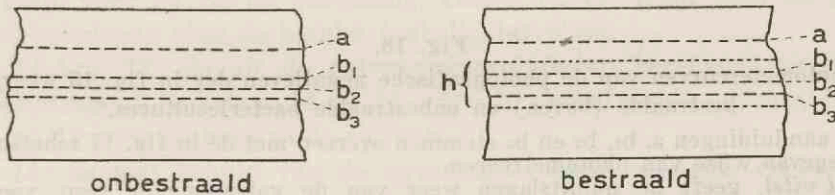


Fig. 17.

Schetsmatig beeld van de plaatsen waarop de fotografische negatieven werden gefotometreerd.

De hoogte van het bestraalde gebied is aangegeven met h . De photometreeringen b_1 , b_2 en b_3 vallen op overeenkomstige plaatsen in het te bestralen resp. bestraalde gebied; de photometreeringen a vallen op overeenkomstige plaatsen in het onbestraalde gebied.

verlies van de bacteriën, etc. Deze achteruitgang werd procentueel voor de geheele bestraalde bacteriecultuur in rekening gebracht.

In fig. 18 geven wij twee micro-photogrammen weer, afkomstig van één en dezelfde bacteriecultuur resp. vóór de bestraling en na de bestraling.

Ter verduidelijking van de gevolgde werkwijze volgt thans in tabel X de volledige uitwerking van een klein gedeelte van het in fig. 18 weergegeven photogram.

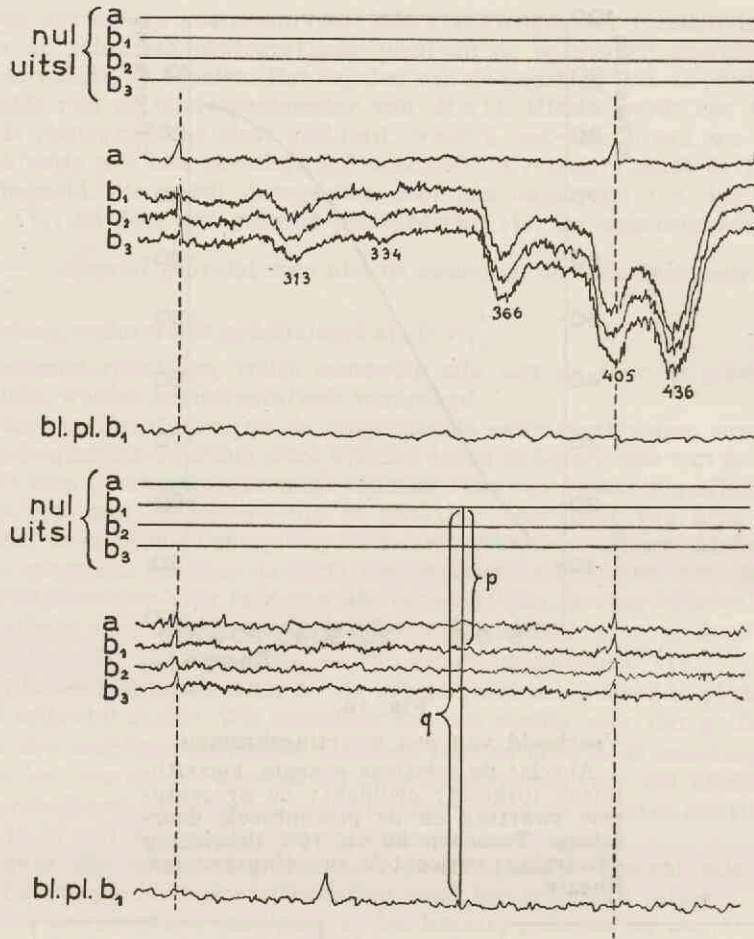


Fig. 18.

Micro-photometercurven van de fotografische negatieven der in fig. 15 weergegeven bestraalde (boven) en onbestraalde bacteriecultures.

De aanduidingen a, b₁, b₂ en b₃ stemmen overeen met de in fig. 17 schetsmatig aangegeven wijze van photometreeren.

Nul uitsl. geeft de nuluitslagen weer van de galvanometer resp. voor de plaatsen a, b₁, b₂ en b₃.

a, b₁, b₂ en b₃ (zonder nadere toevoeging) zijn de galvanometeruitslagen bij het photometreeren van de betreffende plaatsen van het fotografisch negatief.

bl. pl. b₁ is de galvanometeruitslag bij het photometreeren van een onbelicht (blank) gedeelte van het fotografisch negatief, behoorende bij de photometreering b₁. Voor a, b₂ en b₃ zijn hiervoor de galvanometeruitslagen niet aangegeven, aangezien deze met b₁ een zelfde bedrag verschillen als de nuluitslagen.

Voorbeeld: p is de galvanometeruitslag voor een willekeurig punt van de photometreering b₁, in het te bestralen gebied; q is de hierbij behorende galvanometeruitslag bij het photometreeren van de onbelichte plaat; $\frac{p}{q} \times 100$ stelt dan de procentueele doorlating voor op de beschouwde plaats van het fotografisch negatief.

In de practijk gebruikten wij niet de hier weergegeven photometercurven zelf, doch vloeiende lijnen, welke zoo goed mogelijk gemiddeld door de sterk getande photometercurven werden gelegd. Deze lijnen zijn in bovenstaande figuur niet geteekend.

De golflengten van enkele der ingestraalde kwiklijnen zijn in het micro-photogram aangegeven.

TABEL X.

Uitwerking van een gedeelte van het in fig. 18 weergegeven photogram.

Af- st.	I Voor de bestraling						II Na de bestraling						% Doorlating				E _{b_I}	Y _o	Y	W	λ
	Bl. pl.	a	b _I	b ₂	b ₃	b gem.	Bl. pl.	a	b _I	b ₂	b ₃	b gem.	a _I	a _{II}	b _I	b _{II}					
62	65	23-	23	22+	23	23-	67-	27	32-	32	32-	32	35	40 ⁵	35	47 ⁵	23 ⁵	20 ³	16 ⁶⁵	20-	329
64	"	23	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	35 ⁵	"	"	"	"	"	"	20-	327
65 ⁵	"	"	23-	"	"	"	66 ⁵	"	32 ⁵	32 ⁵	32 ⁵	32 ⁵	"	"	"	49	"	"	16	24	325
67 ⁵	"	"	"	"	23+	"	"	27-	33+	33-	33-	33	35-	40+	"	50-	"	"	15 ⁷	26-	322 ⁵
69	"	22 ⁵	"	"	"	"	"	"	34	34+	33 ⁵	34	"	"	"	51+	"	"	15	30	320
71	65-	"	23	"	"	"	"	"	36-	37	35 ⁵	36	35+	"	35+	54+	23 ⁴	20 ²	13 ⁸	38+	318
73	"	23-	"	22	"	"	"	"	38-	39-	38-	38	35-	"	"	57+	"	"	127	46+	315 ⁵
75	"	22 ⁵	"	"	23	"	"	26 ⁵	39-	40+	39 ⁵	39 ⁵	34 ⁵	40	"	59 ⁵	"	"	119 ⁵	52+	313
77	"	22+	23+	22-	"	"	"	"	37+	38-	39	38	34	"	"	57+	"	"	127	46+	311 ⁵
79	"	22	23	"	23-	22 ⁵	"	"	34	34 ⁵	34 ⁵	34+	34 ⁵	"	35-	51 ⁵	23 ⁷	20 ⁵	14 ⁹	32-	309 ⁵
81	64 ⁵	22+	23-	"	"	"	"	"	32	32 ⁵	32	32+	35	"	35	48 ⁵	23 ⁵	20 ³	16 ²	23-	307 ⁵
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

Kolom 1: horizontale afstand in mm op het photogram vanaf het midden der 436 mμ -lijn.

Kolom 2 t.m. 13: op het registrogram afgelezen galvanometeruitslagen in mm, vóór de bestraling en na de bestraling. In de kolommen 7 en 13 staan de door middelen van b₁, b₂ en b₃ gevonden waarden van de photometreeringen b resp. voor en na de bestraling. Onder bl. pl. vindt men de galvanometeruitslagen voor de blanke (onbelichte) plaat.

Kolom 14 t.m. 17: de uit de galvanometeruitslagen berekende procentueele doorlatingen; in kolom 14 en 16 voor de onbestraalde cultuur, in kolom 15 en 17 voor de bestraalde cultuur.

Kolom 18: de met behulp van de zwartingskromme bepaalde energieën, behorende bij de in kolom 16 weergegeven doorlatingen. Deze kolom stelt dus tevens de relatieve intensiteiten voor, welke op de te bestralen plaatsen door de bacteriecultuur vóór de bestraling werden uitgezonden.

Kolom 19: dezelfde energieën als in kolom 18, doch omgerekend op na de bestraling. Dit geschiedde met behulp van de gemiddelde waarden voor a uit kolom 14 en 15. De hierbij behorende waarden geven de gemiddelde intensiteiten weer van de niet bestraalde cultuurgedeelten, resp. vóór en na de bestraling. De verhouding van deze intensiteiten levert de procentueele intensiteitsvermindering door andere oorzaken dan de bestraling. De waarden in kolom 19 volgen uit de overeenkomstige in kolom 18 door vermenigvuldiging met deze verhouding.

Kolom 20: de met behulp van de zwartingskrommen bepaalde energieën, behorende bij de in kolom 17 weergegeven doorlatingen. In kolom 20 staan

dus de relatieve intensiteiten, welke direct na de bestraling door de bacteriën in het bestraalde gebied werden uitgezonden.

Het is duidelijk, dat de kolommen 19 en 20 ons de in hoofdstuk VII bedoelde intensiteiten Y_0 en Y leveren, de intensiteiten dus, welke op overeenkomstige plaatsen resp. vóór en na de bestraling door de bacteriecultuur worden uitgezonden.

Kolom 21: De uit de intensiteiten vóór en na de bestraling, resp. Y_0 en Y , berekende photochemische werking $W = \ln \frac{Y_0}{Y}$, vermenigvuldigd met 100.

Kolom 22: De met de afstanden in kolom 1 corresponderende golflengten.

Aparte golflengtemerken waren hiervoor overbodig, aangezien wij door de nauwkeurig bekende ligging der kwiklijnen en de scherpe reproductie hiervan in het werkingsspectrum, over een door de methode zelve gegeven middel beschikten om de geheele dispersiekromme — d.w.z. het verband tusschen golflengte en afstand — te kunnen teekenen. Uit deze dispersiekromme konden wij omgekeerd voor de tusschen de kwiklijnen gelegen continua de corresponderende golflengten aflezen.

In fig. 19 is een complete photochemische werkingcurve geteekend.

Deze geeft dus het verloop weer van de photochemische werking W met de golflengte, zooals dit zich manifesteert bij de intensiteitsverdeling in het gebruikte bestralingsspectrum.

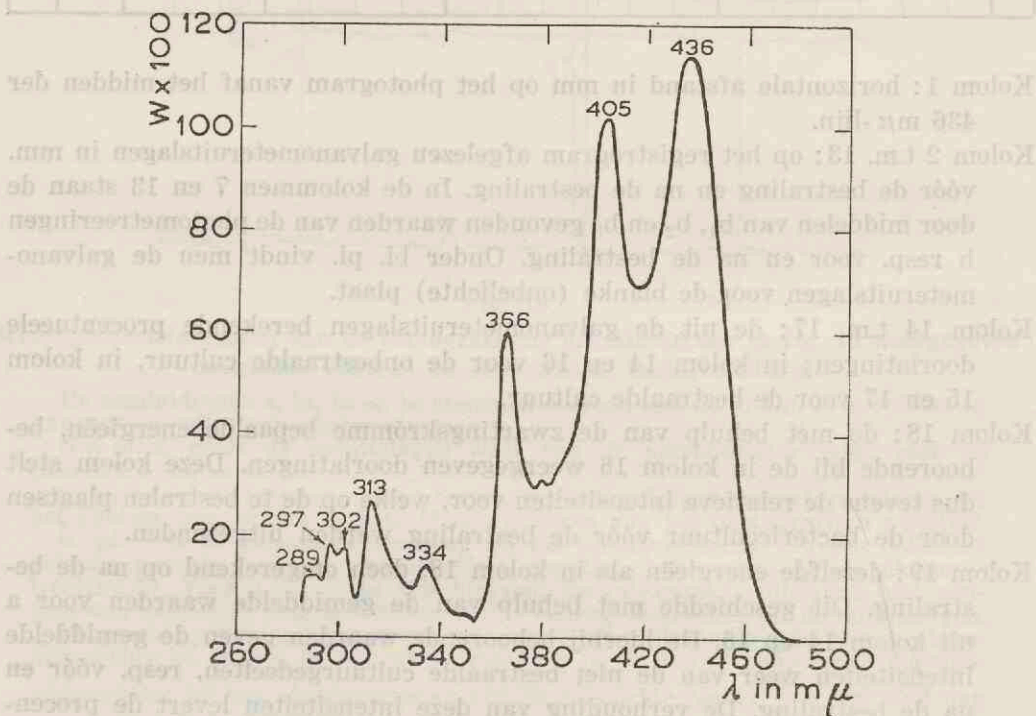


Fig. 19.

Werkingskromme, weergevende de afhankelijkheid van de photochemische werking W van de golflengte, bij de in het bestralingsspectrum heerschende intensiteitsverdeling.

$W \times 100$ is uitgezet tegen de golflengte in $m\mu$.

Bij vergelijking van deze photochemische werkingscurve met het bijbehorende in fig. 20 weergegeven energiespectrum van de gebruikte kwiklamp zien wij, dat de werkingscurve op het eerste gezicht overeenkomst vertoont met het energiespectrum. Het is echter geen getrouwe afspiegeling ervan, omdat voor de grootte van de photochemische werking behalve de intensiteitsverdeling in het kwikspectrum, ook de specifieke photochemische werking der afzonderlijke golflengten bepalend is.

§ 5. De meting van de spectrale energieverdeling in het op de bacteriecultuur geworpen spectrum; berekening van de specifieke photochemische werking.

De intensiteit van het ontworpen spectrum was voldoende groot om met de combinatie vacuum-thermoëlement (volgens Moll) en daarmee in serie geschakelde gevoelige galvanometer te kunnen worden gemeten.

Het systeem van het thermoëlement bestond uit een manganien-constantaan bandje, dat 1μ dik, 0.1 mm breed en 7 mm lang was. Het bandje was gezwart met een niet selectief absorbeerende stof (roet). Omdat het thermoëlement voor energiemetingen in het ultra-violet moest worden gebruikt, was het venster van kwarts vervaardigd. De stroomsterkte in de keten van het thermoëlement is recht evenredig met de op het bandje vallende stralingsenergie.

Op het kwartsvenster was een diafragma bevestigd, waarvan de hoogte kleiner was dan de hoogte van het door te meten spectrum. De hoogte van het spectrum neemt in de richting van de korte golflengten af en aangezien wij niet de energie over de totale hoogte, doch de energiedichtheid wilden meten, moest de hoogte van het diafragma steeds kleiner zijn dan de hoogte van het door te meten spectrum.

Om het spectrum te kunnen doormeten was het thermoëlement achter de spectrograaf gemonteerd op een slede, welke kon worden verplaatst door middel van een micrometerschroef waarop de verplaatsing kon worden afgelezen. De instelling van het thermoëlement was zoodanig, dat:

1e het spectrum scherp op het bandje was afgebeeld en dat bij verplaatsing van het thermoëlement door middel van de micrometerschroef het bandje zich evenwijdig aan de achterwand van de spectrograaf voortbewoog;

Dit was aan de halfwaardebreedten der kwiklijnen te beoordeelen; had het thermoëlement de juiste stand, dan moest deze achtereenvolgens voor alle kwiklijnen minimaal zijn.

2e het bandje bij verplaatsing van het thermoëlement zich horizontaal door het spectrum verplaatste.

Dit was nauwkeurig visueel te beoordeelen.

Wij vonden zoo de spectrale energieverdeling voorloopig nog uitgedrukt in mm uitslag van de galvanometer. Door teekenen van de dispersiekromme waren wij in staat, de met iedere stand van de micrometerschroef corresponderende golflengte af te lezen.

Wij zetten deze uitslag in mm van de galvanometer om in de absolute

intensiteiten in het spectrum, uitgedrukt in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$, door de uitslag van de thermoëlement-galvanometer combinatie te vergelijken met die eener absoluut geijkte combinatie van een groote oppervlakte thermozuil volgens M o l l en een galvanometer, bij gelijke intensiteit van het opvallende licht (wij gebruikten voor deze vergelijking wit licht). Hieruit was de intensiteit van het opgevallen licht in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ voor 1 mm uitslag van de thermoëlement-galvanometer combinatie te berekenen. Aangezien de gevoeligheid van het gebruikte thermoëlement in de loop van de tijd langzaam afnam, moest bij iedere bestralingsproef waaruit wij waarden voor het photochemische inactiverings-spectrum wilden afleiden op de boven beschreven wijze de absolute intensiteit in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ per mm uitslag van de thermoëlement-galvanometer combinatie opnieuw worden bepaald. Zooals in hoofdstuk VI, § 2 en in hoofdstuk VII is uiteengezet, gebruikten wij uit theoretische overwegingen niet de ingestraalde lichtenergie in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$, doch in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$

Zij de absolute intensiteit van het ingestraalde licht I erg / $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$, dan vindt men voor de quantenintensiteit I_q :

$$I_q = \frac{\lambda}{hc} \times I \text{ (quanten/cm}^2 \times \text{sec.)}.$$

Hierin is: λ de golflengte in cm

c de lichtsnelheid (3×10^{10} cm per sec.)

h de constante van P l a n c k (6.55×10^{-27} erg $\times$ sec.)

Slechts bij die bestralingsproeven, waaruit wij tenslotte het *absolute* photochemische inactiveringspectrum wilden afleiden, was het noodig de quantenintensiteit van het ingestraalde licht in absolute maat vast te leggen. Bij de overige proeven was het voldoende de quantenintensiteit in relatieve maat te bepalen, door de afgelezen uitslagen van de thermoëlement-galvanometer combinatie met de bijbehorende golflengte te vermenigvuldigen.

Ter illustreering van hetgeen over de energiemetingen is gezegd, is in fig. 20 de intensiteitsverdeling in het ingestraalde spectrum, behorende bij de in fig. 19 weergegeven werkingskromme, geteekend. In het bedoelde geval bedroeg de absolute intensiteit per mm uitslag van de galvanometer:

$$1.21 \times 10^3 \text{ (erg/cm}^2 \times \text{sec.)}.$$

Voor een bepaalde golflengte λ (uitgedrukt in $m\mu$) bedraagt dus de ingestraalde quantenintensiteit:

$$I_q = \frac{\lambda \times 10^{-7} \times 1.21 \cdot 10^3}{6.55 \cdot 10^{-27} \times 3 \cdot 10^{10}} \times a = 0.616 \cdot 10^{12} \times a \lambda \text{ (quanten/cm}^2 \times \text{sec.)}.$$

Hierin is a de galvanometeruitslag in mm.

Door het product $a \lambda$ nog door een factor 100 te deelen krijgen wij

$$I_q = 0.616 \cdot 10^{14} \times \frac{a\lambda}{100} \text{ (quanten/cm}^2 \times \text{sec.)}.$$

In fig. 20 is $I_q \times 10^{-14}$ uitgezet tegen λ in $m\mu$.

Deze curve geeft het verloop van de quantenintensiteit weer in het spectrum achter de spectrograaf.

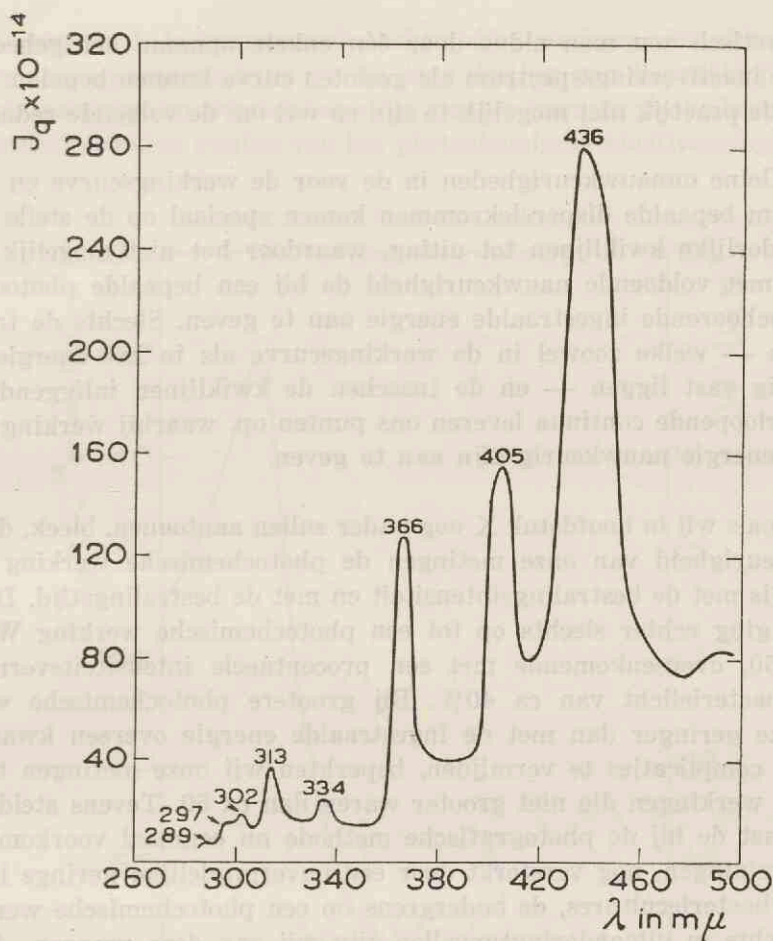


Fig. 20.

De door directe meting bepaalde intensiteitsverdeling in het kwikspectrum, behorende bij de in figuur 19 weergegeven werkingsschijf.

De intensiteit, in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$, is uitgezet tegen de golflengte in $\text{m}\mu$.

De optredende photochemische werking W wordt echter niet door de quantenintensiteit I_q bepaald, doch door het totale aantal ingestraalde quanten $I_q \times t$ (t is de bestralingstijd in sec.).

De quantenenergiecurve, weergevende het totale aantal ingestraalde quanten, ontstaat uit de intensiteitscurve door vermenigvuldiging van de intensiteiten met de bestralingstijd in seconden.

De berekening van de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ — de photochemische werking W per ingestraald quant — geschiedde nu in principe, door de, volgens de in dit hoofdstuk in § 4 besproken methode bepaalde, photochemische werkingsschijf te deelen door de daarbij behorende quantenenergiecurve.

Theoretisch zou men aldus door één enkele opname het geheele photochemische inactiveringspectrum als gesloten curve kunnen bepalen. Dit bleek echter in de practijk niet mogelijk te zijn en wel om de volgende redenen:

1. Kleine onnauwkeurigheden in de voor de werkingscurve en het energiespectrum bepaalde dispersiekrommen komen speciaal op de steile hellingen der afzonderlijke kwiklijnen tot uiting, waardoor het niet mogelijk is op de hellingen met voldoende nauwkeurigheid de bij een bepaalde photochemische werking behorende ingestraalde energie aan te geven. Slechts de toppen der kwiklijnen — welke zoowel in de werkingscurve als in het energiespectrum nauwkeurig vast liggen — en de tusschen de kwiklijnen inliggende, slechts weinig verlopende continua leveren ons punten op, waarbij werking en bijbehorende energie nauwkeurig zijn aan te geven.

2. Zooals wij in hoofdstuk X nog nader zullen aantonen, bleek, dat binnen de nauwkeurigheid van onze metingen de photochemische werking W recht evenredig is met de bestralingsintensiteit en met de bestralingstijd. Deze evenredigheid ging echter slechts op tot een photochemische werking $W (\times 100)$ van ca 50, overeenkomende met een procentueele intensiteitsvermindering van het bacterieelicht van ca 40%. Bij grotere photochemische werkingen waren deze geringer dan met de ingestraalde energie overeen kwam ¹⁾. Om onnoodige complicaties te vermijden, beperkten wij onze metingen tot photochemische werkingen die niet groter waren dan ca 50. Tevens stelden wij in verband met de bij de fotografische methode nu eenmaal voorkomende vrij groote spreidingen, nog versterkt door een onvermijdelijke geringe inhomogeniteit der bacteriecultures, de ondergrens op een photochemische werking van ca 10. Slechts in uitzonderingsgevallen zijn wij van deze grenzen afgeweken. De in dat geval gevonden waarden voor de specifieke werking zijn dienovereenkomstig als minder vaststaand te beschouwen.

Uit beide overwegingen volgt, dat wij dus tenslotte het photochemische inactiveringspectrum niet als gesloten curve, doch als afzonderlijke punten moesten bepalen en tevens, dat wij, gezien de zeer uiteenlopende intensiteitsverdeeling in het gebruikte kwikspectrum, genoodzaakt waren voor ieder spectraalgebied door variatie van de bestralingsintensiteit of van de bestralingstijd de photochemische werking een voor de meting geschikte waarde te geven.

Wij hebben beide variaties toegepast.

Ter illustreering van de in deze paragraaf besproken bepaling van de specifieke photochemische werking, is in fig. 21 voor een gedeelte van het

1) Indien men niet, zooals wij in hoofdstuk VII hebben gedaan, uitgaat van de veronderstelling, dat in alle bacteriën die met dezelfde intensiteit I_q worden bestraald dezelfde intensiteit I_{q_0} heerscht, doch dat integendeel deze laatste intensiteiten uiteenloopen, is een afwijking van de $I \times t$ -wet, zooals door Mej. A. van der Burg langs mathematische weg kon worden aangetoond, in de hierboven genoemde zin bij groote photochemische werkingen theoretisch te verwachten.

spectrum geteekend de gemeten photochemische werking, het daarbij behorende gemeten energiespectrum en de door deeling van bepaalde punten van het energiespectrum op overeenkomstige punten van de photochemische werkingsspectrum gevonden punten van het photochemische inactiveringsspectrum.

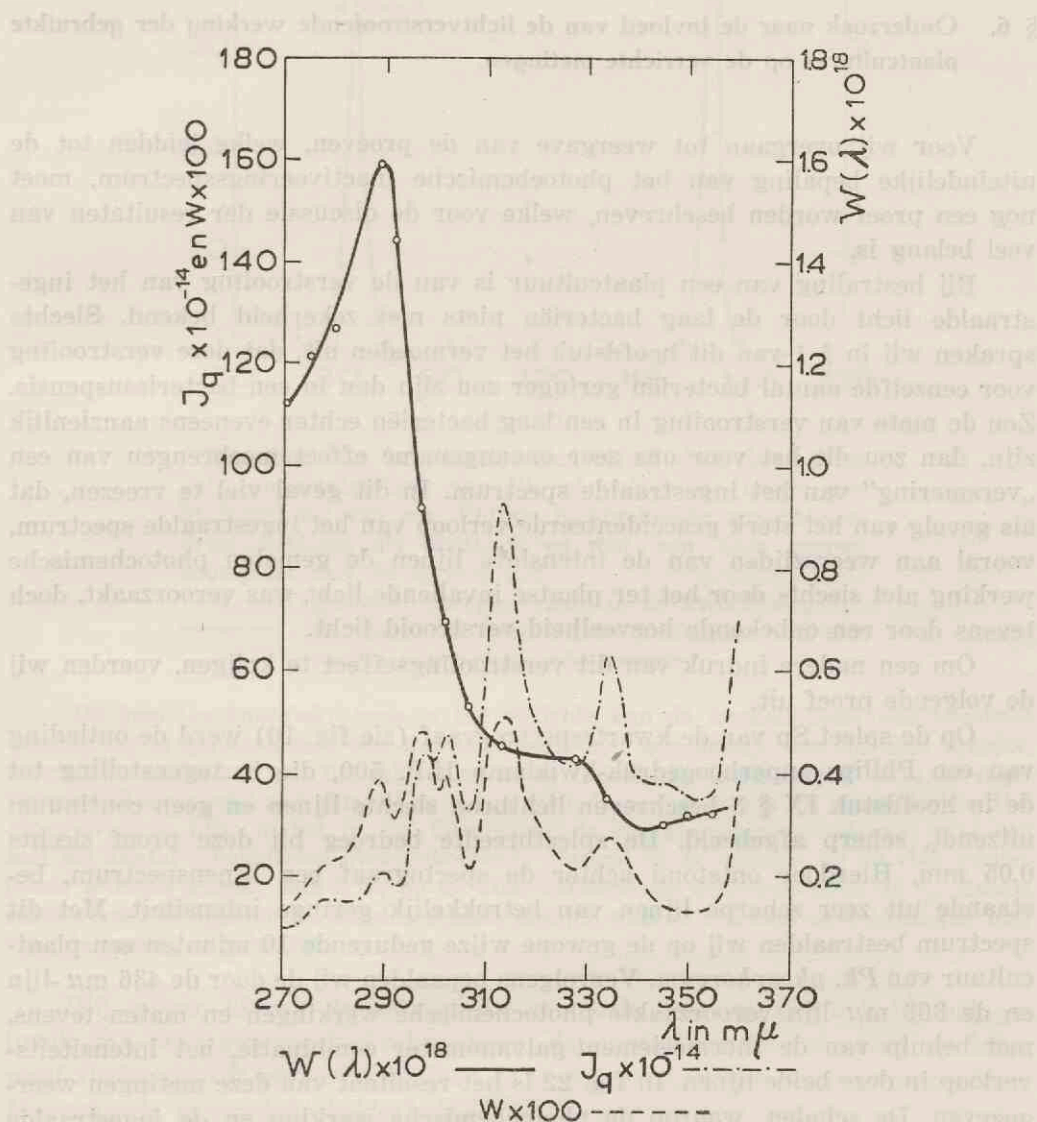


Fig. 21.

Bepaling van de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ uit de photochemische werking W , de intensiteit van het ingestraalde licht I_q in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ en de bestralingstijd t in sec. De met $\circ$ aangegeven punten zijn berekend met de formule

$$W(\lambda) = \frac{W}{I_q \times t} \quad (t = 120 \text{ sec.}).$$

Het volledige experimenteele materiaal en het daaruit afgeleide definitieve photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum* worden in het volgende hoofdstuk weergegeven.

§ 6. Onderzoek naar de invloed van de lichtverstrooiende werking der gebruikte plaatcultures op de verrichte metingen.

Voor wij overgaan tot weergave van de proeven, welke leidden tot de uiteindelijke bepaling van het photochemische inactiveringsspectrum, moet nog een proef worden beschreven, welke voor de discussie der resultaten van veel belang is.

Bij bestraling van een plaatcultuur is van de verstrooiing van het ingestraalde licht door de laag bacteriën niets met zekerheid bekend. Slechts spraken wij in § 1 van dit hoofdstuk het vermoeden uit, dat deze verstrooiing voor eenzelfde aantal bacteriën geringer zou zijn dan in een bacteriesuspensie. Zou de mate van verstrooiing in een laag bacteriën echter eveneens aanzienlijk zijn, dan zou dit het voor ons zeer onaangename effect meebrengen van een „versmering” van het ingestraalde spectrum. In dit geval viel te vreezen, dat als gevolg van het sterk geaccidenteerde verloop van het ingestraalde spectrum, vooral aan weerszijden van de intensieve lijnen de gemeten photochemische werking niet slechts door het ter plaatse invallende licht was veroorzaakt, doch tevens door een onbekende hoeveelheid verstrooid licht.

Om een nadere indruk van dit verstrooiingseffect te krijgen, voerden wij de volgende proef uit.

Op de spleet Sp van de kwartsspectrograaf (zie fig. 10) werd de ontlading van een Philips superhoogedruk-kwiklamp H.P. 500, die in tegenstelling tot de in hoofdstuk IX § 3 beschreven lichtbron slechts lijnen en geen continuum uitzendt, scherp afgebeeld. De spleetbreedte bedroeg bij deze proef slechts 0.05 mm. Hierdoor ontstond achter de spectograaf een lijnenspectrum, bestaande uit zeer scherpe lijnen van betrekkelijk geringe intensiteit. Met dit spectrum bestraalden wij op de gewone wijze gedurende 10 minuten een plaatcultuur van *Ph. phosphoreum*. Vervolgens bepaalden wij de door de 436 m μ -lijn en de 366 m μ -lijn veroorzaakte photochemische werkingen en maten tevens, met behulp van de thermoëlement-galvanometer combinatie, het intensiteitsverloop in deze beide lijnen. In fig. 22 is het resultaat van deze metingen weergegeven. De schalen, waarop de photochemische werking en de ingestraalde energie zijn uitgezet, zijn zoo gekozen, dat voor de 366 m μ -lijn de toppen van de W- en de I-curve even hoog zijn (ter vergemakkelijking van het vergelijken der halfwaardebreedten).

W en I zijn tegen dezelfde, willekeurig gekozen, afstandsmaat uitgezet. Men ziet, dat de werkings- en de energiecurve vrijwel samenvallen en dat met name de halfwaardebreedten nagenoeg even groot zijn, zoodat wij kunnen constateeren, dat het door ons gevreesde verstrooiingseffect geheel afwezig is.

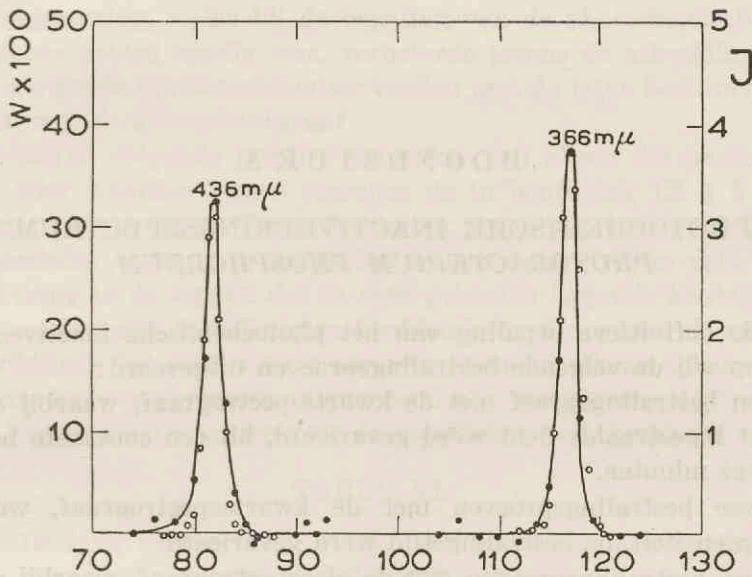


Fig. 22.

Bepaling van het verstrooiingseffect door bestraling van een plaatcultuur van *Ph. phosphoreum*, onder gebruikmaking van een Philips luchtgekoelde superhooedruk-kwiklamp als lichtbron en met een zeer nauwe voorspleet van de spectograaf.

○ ○ ○ gemeten energieverloop in de kwiklijnen,
 —●—●— de door de betreffende kwiklijnen veroorzaakte photo-chemische werking.

De gemeten energiekromme is ten opzichte van de werkelijkheid iets verbreed doordat zij is gemeten met een thermoëlement met een bandje van 0.1 mm breedte, hetgeen overeenkomt met 0.3 schaaldeel in de figuur. De „versmering” van de ingestraalde lijnen strekt zich dus uit over een gebied van hoogstens 0.6 schaaldeelen. Het energieverloop bijv. in het in fig. 20 geteekende energiespectrum bedraagt over een met dit aantal schaaldeelen overeenkomende afstand in de maxima en de vlak verlopende minima minder dan 2 %, op de steil verlopende hellingen circa 15 %. Zooals reeds eerder is opgemerkt, werden echter, ook om andere redenen, deze hellingen niet voor de metingen gebruikt.

Wij mogen hieruit de belangrijke conclusie trekken, dat ook bij het gebruik van onze gewone bestralingsbron, de photochemische werking op ieder punt slechts wordt veroorzaakt door de in dat punt in het bestralingsspectrum heerschende oppervlaktehelderheid.

HOOFDSTUK X.

HET PHOTOCHEMISCHE INACTIVEERINGSSPECTRUM VAN *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

Voor de definitieve bepaling van het photochemische inactiveringspectrum hebben wij de volgende bestralingsproeven uitgevoerd:

a. Een bestralingsproef met de kwartsspectrograaf, waarbij de intensiteit van het ingestraalde licht werd gevarieerd, bij een constante bestralings-tijd van twee minuten.

b. Twee bestralingsproeven met de kwartsspectrograaf, waarbij, bij constante intensiteit, de bestralingstijd werd gevarieerd.

c. Twee bestralingsproeven met de glasspectrograaf, waarbij de intensiteit van het ingestraalde licht werd gevarieerd, bij een constante bestralings-tijd van twee minuten.

In principe was het gunstig om de bestralingstijd zoo kort mogelijk te nemen en dus de intensiteit zoo hoog mogelijk, om zoo min mogelijk storing te ondervinden van de herstelreactie¹⁾. Het bleek, dat wij bij maximale diafragma-stand in het minst intensieve spectraalgebied (het continuüm bij ca 350 m μ) minstens één minuut moesten bestralen om betrouwbare metingen van de photochemische werking te kunnen uitvoeren. Om ook in dit gebied nog metingen met intensiteits- en tijdsvariaties mogelijk te maken, stelden wij bij al onze proeven als basis een bestralingstijd vast van twee minuten. Bij de proeven met intensiteitsvariaties werden met behulp van het diafragma D₂ (zie: fig. 10) de intensiteiten op ongeveer $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ en $\frac{1}{16}$ van de maximale waarde gebracht; bij de proeven met tijdsvariaties bestraalden wij resp. $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 en 4 minuten met maximaal geopend diafragma.

Deze bestralingstijden zijn in ieder geval, zooals later nog zal blijken, door de geringe snelheid van de herstelreactie, kort ten opzichte van de hersteltijd.

In de navolgende paragrafen zullen de resultaten van de genoemde proeven worden weergegeven.

§ 1. Bestralingsproef met de kwartsspectrograaf onder toepassing van intensiteitsvariatie.

Hierbij was het mogelijk om zoowel voor het zichtbare als voor het ultraviolette gebied de photochemische werkingen te bepalen. Weliswaar bezit de kwartsspectrograaf in het zichtbare spectrum een geringe dispersie, doch de

1) Nader gediscussieerd in hoofdstuk XI.

sterke diafragmeering, welke bij de bepaling van de photochemische werking in het zichtbare gebied noodig was, verbeterde tevens de afbeeldingsscherpte, zoodat wij een goede overeenstemming vonden met de later beschreven bestralingsproeven met de glasspectrograaf.

Uit de hierna volgende tabellen gebruiken wij alleen die photochemische werkingen, wier waarden liggen tusschen de in hoofdstuk IX § 5 genoemde grenzen van ca 10 en ca 50. Ter oriëntering geven wij voor gebieden waarin de photochemische werking aanmerkelijk buiten deze grenzen valt, slechts de gemeten werking in de toppen der in deze gebieden liggende kwiklijnen weer. Aangezien, zooals reeds in het vorige hoofdstuk werd opgemerkt, op de hellingen der kwiklijnen het nauwkeurig aangeven van bij elkaar behoorende energieën en daardoor veroorzaakte photochemische werkingen niet mogelijk is, leidden wij hieruit geen waarden voor de specifieke photochemische werking af.

TABEL XI.

Photochemische werkingen W ($\times 100$), gevonden bij de bestralingsproef met intensiteitsvariatie.

λ in $m\mu$	W $\times 100$					λ in $m\mu$	W $\times 100$				
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$		diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$
490	3.9	0	0	1.0	0	355	14.0	4.5	—	—	—
470	31.0	3.0	1.0	4.1	0	350	10.0	4.9	—	—	—
460	—	20-	9.2	5.1	2.9	345	12.8	5.4	—	—	—
436	142.5	114	80.0	52-	27.0	334	26.2	14.6	7.3	—	—
4215	—	—	39+	19.9	10.6	328	19.3	9.9	—	—	—
4185	—	—	38-	19.6	9.7	313	52+	27.0	12.4	—	—
415	—	—	37.0	19.2	9.0	3065	20.7	7.4	—	—	—
4135	—	—	38-	19.9	9.0	302	33-	17.7	—	—	—
405	134.5	102	67+	40.0	21.6	297	35.6	18.4	—	—	—
390	—	37-	20.7	8.5	—	292	23.3	12.6	—	—	—
386	—	33.5	17.9	8.5	—	289	27.0	12.2	—	—	—
3795	—	31.0	13.6	7.6	—	280	15.4	—	—	—	—
376	57.5	29.5	14.1	8.5	—	275	10.6	—	—	—	—
366	91.5	60.0	32.9	18.1	9.8	270	6.2	—	—	—	—

Wij moeten bij de beschouwing van de gevonden photochemische werkingen bedenken, dat de voor één punt bepaalde werking een vrij groote waarschijnlijkke fout zal bezitten. In de eerste plaats passen wij de fotografische intensiteitsmeting toe onder ongunstige omstandigheden: onvermijdelijke spreidingen in de homogeniteit van het bacterieel licht, welke veel grooter zijn dan bij normale fotografische intensiteitsmetingen voorkomen. Verder blijkt het steeds weer, dat bij bestudeering van een bepaalde werking op biologisch materiaal de spreidingen in de proefuitkomsten door tal van moeilijk te controleeren nevenfactoren ongunstig worden beïnvloed. De grootte van de voor afzonderlijke punten te verwachten fout is moeilijk te schatten, doch zal toch zeker van de orde van 10 à 20% zijn. Het best liggen uiteraard die punten vast, waarvoor wij bij meerdere intensiteiten de photochemische werking konden bepalen.

TABEL XII.

Absolute intensiteiten in quanten per cm² × sec. bij de bestralingsproef met intensiteitsvariatie.

λ in m μ	$I_q \times 10^{-14}$					λ in m μ	$I_q \times 10^{-14}$				
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$		diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$
490	153	83.0	45.0	22.0	11.6	355	31.4	15.2	8.07	3.97	—
470	149	79	39.4	19+	9.85	350	30.2	14.2	7.88	3.98	—
460	148	92.5	41.5	20.5	10.9	345	31.6	14.95	8.32	4.10	—
436	520	281	151	74.9	37.4	334	50	25.0	13.55	6.46	—
421 ⁵	—	87.5	50.7	24.6	12.55	328	32.3	15.95	8.38	—	—
418 ⁵	—	—	44+	21.4	10.95	313	73.0	36.6	19.9	—	—
415	—	79.0	40.1	20.2	9.9	306 ⁵	25	13.0	6.78	—	—
413 ⁵	—	—	40.4	20+	9.85	302	37.0	19+	10.4	—	—
405	288	157	83.6	41.8	20.9	297	33.0	16.6	9.3	—	—
390	82+	40.7	21+	10.3	5.05	292	12.6	6.55	—	—	—
386	80.0	40.0	21+	10.2	4.98	289	14.9	7.9	—	—	—
379 ⁵	—	40.5	21.0	10.8	5.35	280	10.7	—	—	—	—
376	95	47.5	23.4	11.6	6.0	275	9.0	—	—	—	—
366	248	127 ⁵	69.2	33.7	16.9	270	6.9	—	—	—	—

Uit de tabellen XI en XII vinden we de in tabel XIII weergegeven waarden voor de specifieke photochemische werking $W(\lambda) = \frac{W}{I_q \times t}$.

Voorbeeld: voor $W(334)$ bij diafragma 1 vinden wij

$$W(334) = \frac{0.262}{50 \times 10^{14} \times 120} = 0.44 \times 10^{-18} \text{ (cm}^2/\text{quant)}.$$

Wij kunnen uit de in tabel XIII gegeven cijfers direct de belangrijke conclusie trekken, dat, evenals dit reeds vroeger was gevonden bij de bestralingsproeven met homogene suspensies, *de photochemische werking W evenredig is met de bestralingsintensiteit*, omdat voor iedere golflengte binnen de nauwkeurigheidsgrenzen van de methode de waarden van $W(\lambda)$ voor verschillende bestralingsintensiteiten constant blijken te zijn.

In figuur 23 zijn de gemiddelde waarden van $W(\lambda)$ uitgezet tegen de bijbehorende golflengten; deze grafiek toont ons dus het uit de beschreven bestralingsproef afgeleide absolute photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum*.

Bij de beschouwing van deze figuur moeten wij bedenken, dat niet aan alle punten dezelfde betekenis toekomt. Zoo is bij de metingen in het gebied bij ca 350 m μ voor de drie daarin onderzochte golflengten telkens slechts één meetpunt voor de photochemische werking beschikbaar; bovendien liggen de hierbij gevonden waarden dicht aan de door ons gestelde onderste grens.

TABEL XIII.

Absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, berekend uit de bestralingsproef met intensiteitsvariatie.

λ in $m\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.	λ in $m\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$			diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$	
490	0.03	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01	355	0.37	—	—	—	—	0.37
470	0.17	0.03	0.02	0.18	0.00	0.08	350	0.28	—	—	—	—	0.28
460	—	0.18	0.18 ⁵	0.21	—	0.19	345	0.34	—	—	—	—	0.34
436	—	—	—	0.58	0.60	0.59	334	0.44	0.49	0.45	—	—	0.46
421 ⁵	—	—	0.64 ⁵	0.67 ⁵	0.70	0.67	328	0.50	0.52	—	—	—	0.51
418 ⁵	—	—	0.71	0.76 ⁵	0.74	0.74	313	0.60	0.61 ⁵	0.52	—	—	0.58
415	—	—	0.77	0.79	0.76	0.77	306 ⁵	0.70	—	—	—	—	0.70
413 ⁵	—	—	0.78	0.82	0.76	0.79	302	0.74	0.77	—	—	—	0.76
405	—	—	—	0.80	0.86	0.83	297	0.90	0.92	—	—	—	0.91
390	—	0.75	0.81	0.69	—	0.75	292	1.55	1.60	—	—	—	1.57
386	—	0.70	0.70	0.69	—	0.70	289	1.51	1.29	—	—	—	1.40
379 ⁵	—	0.64	0.54	0.58 ⁵	—	0.59	280	1.20	—	—	—	—	1.20
376	—	0.52	0.50	0.61	—	0.54	275	0.98	—	—	—	—	0.98
366	—	—	0.40	0.45	0.48	0.44	270	0.75	—	—	—	—	0.75

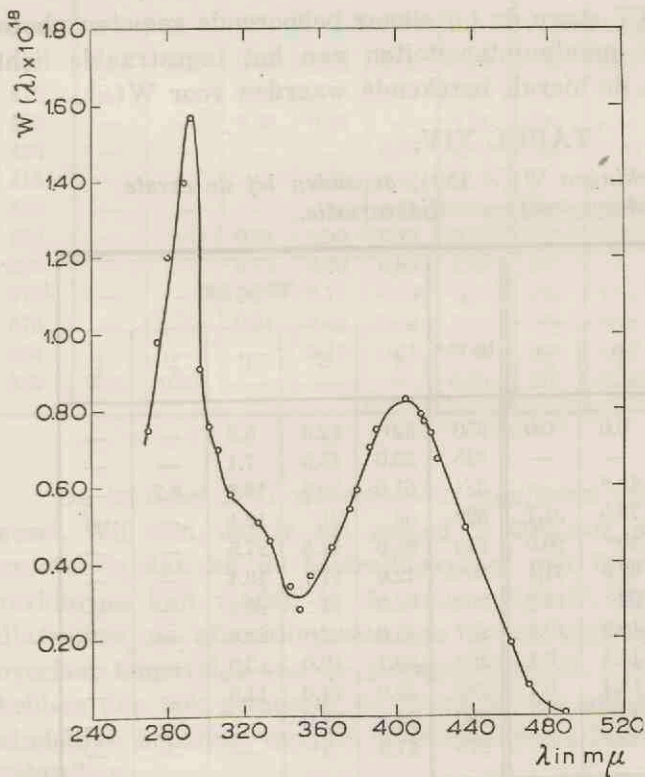


Fig. 23.

Het bij de bestralingsproef met intensiteitsvariatie gevonden verband tussen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

Door middel van proeven met tijdsvariatie konden evenwel ook in dit gebied betrouwbare waarden voor de specifieke photochemische werking worden gevonden.

In het gebied van 334 tot 302 $m\mu$ vertoont de curve een kenmerkende knik. Wanneer men ook in dit gebied geneigd zou zijn de curve, zooals dit in het gebied bij ca 350 $m\mu$ is geschied, zoo goed mogelijk gemiddeld door de gevonden punten te trekken, moge men bedenken, dat juist in het gebied van 334 tot 302 $m\mu$ ieder punt het gemiddelde vormt van een aantal afzonderlijke waarden voor de photochemische werking. Bovendien liggen in dit gebied de gevonden waarden ruimschoots binnen de gestelde grenzen van ca 10 tot ca 50, zoodat het alleszins geoorloofd is in dit gebied de curve vloeiend door de gevonden punten heen te trekken. Wij zullen dan ook zien, dat deze karakteristieke knik eveneens bij de proeven met tijdsvariatie wordt gevonden.

§ 2. Bestralingsproeven met de kwartsspectrograaf onder toepassing van tijdsvariatie.

Achtereenvolgens zullen de resultaten van twee bestralingsproeven tabelarisch worden weergegeven.

Eerste bestralingsproef.

De eerste bestralingsproef geschiedde met de bestralingstijden $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 en 4 minuten.

In tabel XIV en tabel XV staan de bij elkaar behorende gemeten photochemische werkingen en de quantenintensiteiten van het ingestraalde licht.

In tabel XVI vindt men de hieruit berekende waarden voor $W(\lambda)$.

TABEL XIV.

Photochemische werkingen $W (\times 100)$, gevonden bij de eerste bestralingsproef met tijdsvariatie.

λ in $m\mu$	$W \times 100$					λ in $m\mu$	$W \times 100$				
	4'	2'	1'	$\frac{1}{2}$ '	$\frac{1}{4}$ '		4'	2'	1'	$\frac{1}{2}$ '	$\frac{1}{4}$ '
490	19.5	10.0	3.0	0.0	0.0	350	32+	12.6	5.3	—	—
470	—	—	15.0	—	—	345	33.0	15.5	7.1	—	—
460	—	—	34.8	13.8	—	334	61.0	30.5	13.1	8.7	—
436	243	155	114	73.5	34.7	328	53-	21-	12.4	—	—
415	—	—	—	40+	20.0	313	85.0	47.5	27.5	—	—
405	247	150	94.0	62.5	31.4	306 ⁵	42.0	17+	13.4	—	—
390	—	—	38.0	22+	11.6	302	62.5	31-	20.6	—	—
386	—	—	35-	18.9	10.0	297	65.0	32+	22.8	—	—
379 ⁵	—	—	33.2	17.4	9.4	292	39.7	19.0	13.0	—	—
376	—	—	31.6	18.4	9.1	289	45.0	24.0	14.6	—	—
366	189	97.0	57.8	33.5	19.4	280	24.5	11.0	—	—	—
355	34.5	12.5	6.5	—	—	275	17.5	7+	—	—	—

TABEL XV.

Absolute intensiteiten in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ bij de eerste bestralingsproef met tijdsvariatie.

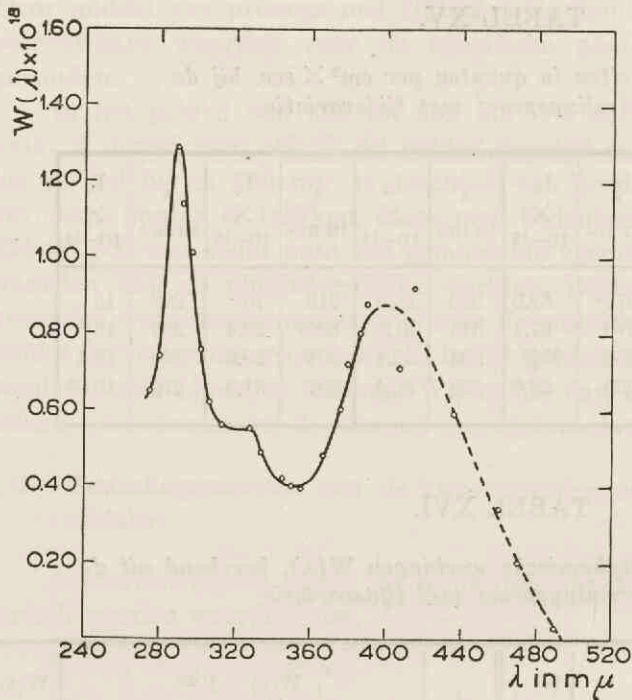
λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10-14
490	142+	415	145+	379 ⁵	82.0	350	30.2	313	76+	292	16
470	127	405	294	376	97.4	345	31.8	306 ⁵	29.4	289	16+
460	151 ⁵	390	78+	366	252 ⁵	334	52.4	302	39.6	280	12.4
436	490	386	78.5	355	32.0	328	36.4	297	31.9	275	10.0 ³

TABEL XVI.

Absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, berekend uit de eerste bestralingsproef met tijdsvariatie.

λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.	λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.
	4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$	$\frac{1}{4}'$			4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$	$\frac{1}{4}'$	
490	0.06	0.06	0.03	0.00	0.00	0.03	350	0.44 ⁵	0.35	—	—	—	0.40
470	—	—	0.20	—	—	0.20	345	0.43	0.41	—	—	—	0.42
460	—	—	0.38	0.30	—	0.34	334	—	0.48 ⁵	0.42	0.55	—	0.48 ⁵
436	—	—	—	—	0.59	0.59	328	0.60	0.47 ⁵	0.57	—	—	0.55
415	—	—	—	0.92	0.92	0.92	313	—	0.52	0.60	—	—	0.56
405	—	—	—	—	0.71	0.71	306 ⁵	0.60	0.49	0.76	—	—	0.62
390	—	—	0.81	0.95	0.88	0.88	302	—	0.65	0.87	—	—	0.76
386	—	—	0.74	0.80	0.85	0.80	297	—	0.84	1.19	—	—	1.01
379 ⁵	—	—	0.67 ⁵	0.71	0.76 ⁵	0.72	292	1.05	1.00	1.38	—	—	1.14
376	—	—	0.54	0.63	0.62	0.60	289	1.15	1.23	1.50	—	—	1.29
366	—	—	—	0.44	0.51	0.48	280	0.82	0.66	—	—	—	0.74
355	0.45	0.33	—	—	—	0.39	275	0.72 ⁵	0.58	—	—	—	0.65

De in tabel XVI weergegeven resultaten zijn in figuur 24 grafisch uitgezet. Wij zien, dat in het gebied $> 400 \text{ m}\mu$ de spreiding der punten veel grooter is dan bij de bestralingsproef met intensiteitsvariatie, hetgeen zijn verklaring kan vinden in de omstandigheid, dat door het geheel geopende diafragma de afbeeldingsscherpte in dit golflengtegebied zeer te wensen overlaat tengevolge van de geringe dispersie van de kwartsspectrograaf. Wij hebben dan ook gemeend, de in dit gebied gelegen punten niet voor de uiteindelijke bepaling van het photochemische inactiveringsspectrum te mogen gebruiken.



Het bij de eerste bestralingsproef met tijdsvariatie gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

Tweede bestralingsproef.

Bij de tweede bestralingsproef was door een onvoldoende homogeniteit van de gebruikte bacteriecultuur de opname met een bestralingstijd van $\frac{1}{4}$ minuut onbruikbaar.

TABEL XVII.

Photochemische werkingen $W(\times 100)$, gevonden bij de tweede bestralingsproef met tijdsvariatie.

λ in $m\mu$	$W \times 100$				λ in $m\mu$	$W \times 100$			
	4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$		4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$
490	3.5	7-	2.0	0.0	345	25+	14.0	—	—
470	24.0	22.0	8.0	4-	334	52.0	27-	14-	—
460	—	40.5	20+	14.0	328	43+	21.5	11.0	—
436	—	144.5	89+	56-	313	88.0	51.0	29.5	14-
415	—	—	—	30.5	306 ⁵	40.0	21-	10.0	—
405	—	136.5	77.0	45+	302	67+	40.0	20.0	—
390	—	—	28.5	14.8	297	73+	48.5	26.5	16.0
386	—	56.0	26.5	14.5	292	—	30.5	15+	—
379 ⁵	—	53.0	25.6	13.8	289	—	39.0	19.5	—
376	—	56.5	27.5	15-	280	38-	23+	15.0	—
366	142	97-	53.5	29.5	275	31.0	18.5	9.5	—
355	28.2	14.5	8.8	—	270	26.0	13.5	—	—
350	22+	13.5	—	—					

TABEL XVIII.

Absolute intensiteiten in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ bij de tweede bestralingsproef met tijdsvariatie.

λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10^{-14}	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10^{-14}	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10^{-14}	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10^{-14}	λ in $\text{m}\mu$	I_q $\times$ 10^{-14}
490	172	405	339	366	302	328	42.0	292	17.7
470	165 ⁵	390	96.0	355	38.2	313	93.5	289	20.4
460	193 ⁵	386	96.4	350	34.7	306 ⁵	32.6	280	15.3
436	588	379 ⁵	100.4	345	38.4	302	48.0	275	12.7
415	184 ⁺	376	113 ⁺	334	64	297	43.9	270	10.0

Uit tabel XVII en tabel XVIII zijn weer de in tabel XIX weergegeven absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$ berekend.

TABEL XIX.

Absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, berekend uit de tweede bestralingsproef met tijdsvariatie.

λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$				$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.	λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$				$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$ gem.
	4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$			4'	2'	1'	$\frac{1}{2}'$	
490	0.01	0.03	0.02	0.00	0.02	345	0.27	0.30	—	—	0.28
470	0.06	0.11	0.08	0.08	0.08	334	0.34	0.35	0.36	—	0.35
460	—	0.17	0.17	0.24	0.19	328	0.43	0.43	0.44	—	0.43
436	—	—	—	0.32	0.32	313	—	0.45 ⁵	0.53	0.49	0.49
415	—	—	—	0.55	0.55	306 ⁵	0.51	0.53	0.51	—	0.52
405	—	—	—	0.44	0.44	302	—	0.69 ⁵	0.69 ⁵	—	0.69 ⁵
390	—	—	0.49 ⁵	0.51	0.50	297	—	0.92	1.01	1.22	1.05
386	—	0.48 ⁵	0.46	0.50	0.48	292	—	1.44	1.44	—	1.44
379 ⁵	—	0.44	0.42 ⁵	0.46	0.44	289	—	1.59	1.59	—	1.59
376	—	0.41 ⁵	0.40 ⁵	0.43	0.41	280	1.03	1.27	1.63	—	1.31
366	—	—	—	0.33	0.33	275	1.02	1.21 ⁵	1.25	—	1.16
355	0.31	0.32	—	—	0.32	270	1.08	1.12 ⁵	—	—	1.10
350	0.27	0.32	—	—	0.29						

In figuur 25 vindt men de in tabel XIX gegeven waarden grafisch voorgesteld. Ook bij deze proef vertoonen de punten van het photochemische inactiveringsspectrum, die in het gebied $> 400 \text{ m}\mu$ liggen, een aanzienlijke spreiding. Bij de afleiding van het uiteindelijke inactiveringsspectrum zijn ook deze punten niet in de berekening betrokken.

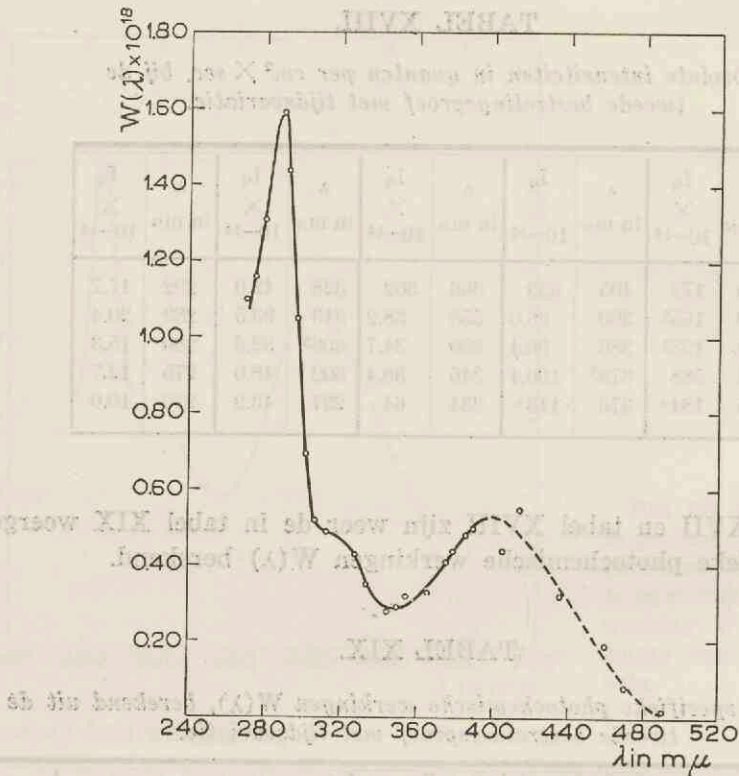


Fig. 25.

Het bij de tweede bestralingsproef met tijdsvariatie gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

Uit de tabellen XVI en XIX zien wij, dat, zij het ook met grootere spreidingen dan bij de proeven met intensiteitsvariatie, de voor de afzonderlijke golflengten gevonden waarden van $W(\lambda)$ bij de verschillende bestralings-tijden constant zijn. Hieruit volgt, dat de photochemische werking W evenredig is met de bestralingstijd, zoodat wij thans hebben aangetoond, dat tot photochemische werkingen van ca 50 de wet van Bunsen-Roscoe voor de bestudeerde photochemische reactie geldt, dus dat:

$$W = \alpha I_q \times t.$$

Deze relatie geldt blijkbaar over het geheele onderzochte golflengte-gebied.

§ 3. Bestralingsproeven met de glasspectrograaf.

Wegens de snelle afneming van het doorlatend vermogen voor golflengten $< 400 \text{ m}\mu$ was de kortste golflengte, waarvoor wij met behulp van de glasspectrograaf de photochemische werking hebben bepaald, $405 \text{ m}\mu$.

Met de glasspectrograaf zijn twee bestralingsproeven verricht, welke weer na elkander zullen worden besproken.

Aangezien wij bij de proeven met behulp van de kwartsspectrograaf de geldigheid van de wet $W = \alpha I_q \times t$ reeds hadden aangetoond, achtten wij het overbodig deze geldigheid ook nog eens te bewijzen bij gebruik van de glasspectrograaf. Wij zagen derhalve af van proeven met tijdvariatie, zoodat beide bestralingsproeven met intensiteitsvariatie zijn geschied. De bestralingstijd bedroeg wederom twee minuten.

Bij de bepaling van de absolute waarde van de ingestraalde intensiteit bleek, dat bij de eerste bestralingsproef een uitslag van 1 mm van de thermo-element-galvanometer combinatie overeenkwam met 4.17×10^3 erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ en bij de tweede bestralingsproef met 8.80×10^2 erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$

Met behulp van de op blz. 88 genoemde formule herleidden wij de intensiteiten in erg per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ in intensiteiten in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$

Eerste bestralingsproef.

TABEL XX.

Photochemische werkingen $W (\times 100)$, gevonden bij de eerste bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $\text{m}\mu$	$W \times 100$					λ in $\text{m}\mu$	$W \times 100$				
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$		diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$
490	0	0	0	0	—	436	—	—	52 ⁺	33 ⁵	15 ⁴
478	0	0	0	0	—	427	—	44 ⁺	25 ⁺	13.4	—
468	5 ⁵	5 ⁺	0	0	—	424	—	40.5	21 ⁺	11.9	—
460	24 ⁺	13.3	—	—	—	418 ⁵	—	36.0	15.2	11.1	—
451	—	34.0	21 ⁺	7.5	—	413	—	33.5	16.8	10.0	—
445	—	—	—	—	—	405	—	54.0	26 ⁺	18.5	—

TABEL XXI.

Absolute intensiteiten in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ bij de eerste bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $\text{m}\mu$	$I_q \times 10^{-15}$					λ in $\text{m}\mu$	$I_q \times 10^{-15}$				
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$		diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	d afr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$
490	14.5 ⁵	7.0 ³	3.8 ¹	1.99 ⁵	0.94 ⁵	427	13.4	6.4 ⁸	3.5 ¹	1.83 ⁵	0.87
478	12.7	6.1 ¹	3.3 ¹	1.73	0.82 ⁵	424	11.4	5.5 ²	2.9 ³	1.56	0.74
468	11.1	5.3 ⁷	2.9 ¹	1.52	0.72	418 ⁵	7.9 ⁵	3.8 ⁵	2.0 ⁸	1.09	0.52
460	10.8	5.2 ⁶	2.8 ⁴	1.49	0.71	413	6.8 ⁵	3.3 ¹	1.7 ⁹	0.94	0.44 ⁵
451	13.1	6.3 ³	3.4 ²	1.79 ⁵	0.85	405	12.3	5.9 ⁶	3.2 ²	1.69	0.80
436	32.4	15.6 ⁵	8.5	4.43	2.10						

TABEL XXII.

Absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, berekend uit de eerste bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $m\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda) \times 10^{18}$ gem.	λ in $m\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$					$W(\lambda) \times 10^{18}$ gem.
	diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$			diafr. 1	diafr. $\frac{1}{2}$	diafr. $\frac{1}{4}$	diafr. $\frac{1}{8}$	diafr. $\frac{1}{16}$	
490	0	0	0	0	—	0	427	—	0.565	0.59	0.61	—	0.59
478	0	0	0	0	—	0	424	—	0.61	0.58	0.64	—	0.61
468	0.04	0.07	0	0	—	0.03	418 ⁵	—	0.78	0.61	0.85	—	0.75
460	0.19	0.21	—	—	—	0.20	413	—	0.845	0.78	0.885	—	0.84
451	—	0.45	0.50	0.35	—	0.43	405	—	0.755	0.68	0.91	0.91	0.81
436	—	—	0.51	0.71	0.61	0.61							

In fig. 26 is tabel XXII grafisch voorgesteld.

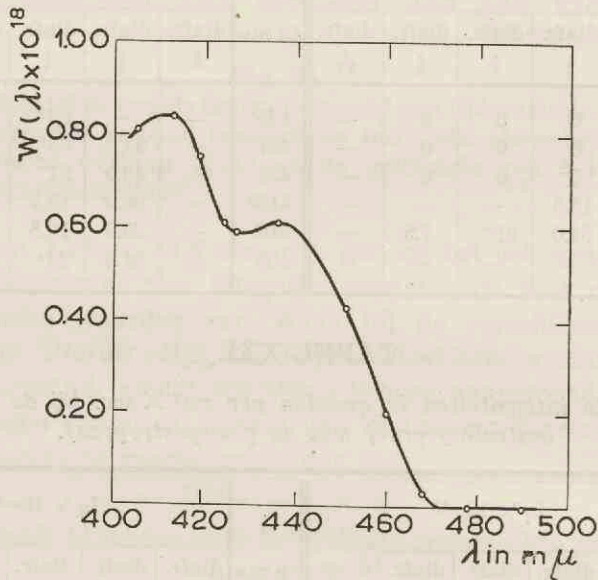


Fig. 26.

Het bij de eerste bestralingsproef met de glasspectrograaf gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

Bij de beschreven eerste bestralingsproef met de glasspectrograaf be-

droeg de spleetbreedte van de voorspleet der spectrograaf 1.45 mm, hetgeen bij de vergrooting 1 : 2 neerkomt op een breedte in het spectrum van 2.90 mm. Hiermede kwamen in het spectrum overeen de in tabel XXIII weergegeven golflengtegebieden in $m\mu$.

Gezien het feit, dat wij bij ca 430 $m\mu$ een aanduiding hebben gevonden voor de aanwezigheid van een nevenmaximum, was het gewenscht bij de tweede bestralingsproef met de glasspectrograaf de voorspleet nauwer te maken en zoodoende de golflengte-nauwkeurigheid te verhoogen, waardoor een eventueel nevenmaximum scherper tot zijn recht zou kunnen komen.

TABEL XXIII.

λ in $m\mu$	390	400	420	440	460
Golfl. gebied in $m\mu$	7	8.5	10	13	15

TABEL XXIV.

λ in $m\mu$	390	400	420	440	460
Golfl. gebied in $m\mu$	2.5	3	3.5	4.5	5

Bij de tweede bestralingsproef bedroeg de breedte der voorspleet 0.48 mm; in tabel XXIV vindt men de hiermede overeenkomende golflengtegebieden in het spectrum voor eenige golflengten opgegeven.

Tweede bestralingsproef.

TABEL XXV.

Photochemische werkingen W ($\times 100$), gevonden bij de tweede bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $m\mu$	$W \times 100$			λ in $m\mu$	$W \times 100$		
	diafr.	diafr.	diafr.		diafr.	diafr.	diafr.
	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$		1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$
490	0	0	—	427	33.1	17 ⁻	—
465	0	0	—	424	28.0	13.4	—
460	2 ⁺	—	—	422	25 ⁻	11 ⁺	—
455 ⁵	7.5	4.5	—	420	22 ⁻	11 ⁺	—
451	12 ⁺	6.6	—	418 ⁵	20 ⁻	9.5	—
445	27 ⁻	12.9	—	415	20.5	10 ⁻	—
436	101	66.0	36.0	413	24.7	—	—
429	39 ⁺	18.4	—	405	—	34.5	15.5

TABEL XXVI.

Absolute intensiteiten in quanten per $\text{cm}^2 \times \text{sec.}$ bij de tweede bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $\text{m}\mu$	$I_q \times 10^{-14}$			λ in $\text{m}\mu$	$I_q \times 10^{-14}$		
	diafr.	diafr.	diafr.		diafr.	diafr.	diafr.
	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$		1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$
490	46.5	24.4	11.9	427	34.9	18.5	8.95
465	29.7	15.6	7.6	424	28.3	14.8	7.25
460	30.9	16+	7.9	422	25.3	13+	6.5
455 ⁵	34.2	18.0	8.75	420	22.6	11.9	5.8
451	36.4	19.1	9.3	418 ⁵	20.4	10.7	5.2
445	46.0	24.2	11.8	415	20.0	10.5	5.1
436	156.5	82.0	40.0	413	22.6	11.9	5.8
429	40.2	21.1	10.3	405	57.1	30.0	14.6

TABEL XXVII.

Absolute specifieke photochemische werkingen $W(\lambda)$, berekend uit de tweede bestralingsproef met de glasspectrograaf.

λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$			$W(\lambda) \times 10^{18}$ gem.	λ in $\text{m}\mu$	$W(\lambda) \times 10^{18}$			$W(\lambda) \times 10^{18}$ gem.
	diafr.	diafr.	diafr.			diafr.	diafr.	diafr.	
	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$			1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	
490	0	0	—	0	427	0.79	0.75 ⁵	—	0.77
465	0	0	—	0	424	0.82 ⁵	0.75 ⁵	—	0.79
460	0.05	—	—	0.05	422	0.81 ⁵	0.71	—	0.76
455 ⁵	0.18	0.21	—	0.19 ⁵	420	0.80 ⁵	0.79	—	0.80
451	0.28	0.29	—	0.28 ⁵	418 ⁵	0.81	0.74	—	0.77 ⁵
445	0.48 ⁵	0.44 ⁵	—	0.46 ⁵	415	0.85 ⁵	0.77 ⁵	—	0.81 ⁵
436	—	—	0.75	0.75	413	0.91	—	—	0.91
429	0.81 ⁵	0.73	—	0.77	405	—	0.96	0.88 ⁵	0.92

In fig. 27 vindt men de resultaten uit tabel XXVII grafisch uitgezet.

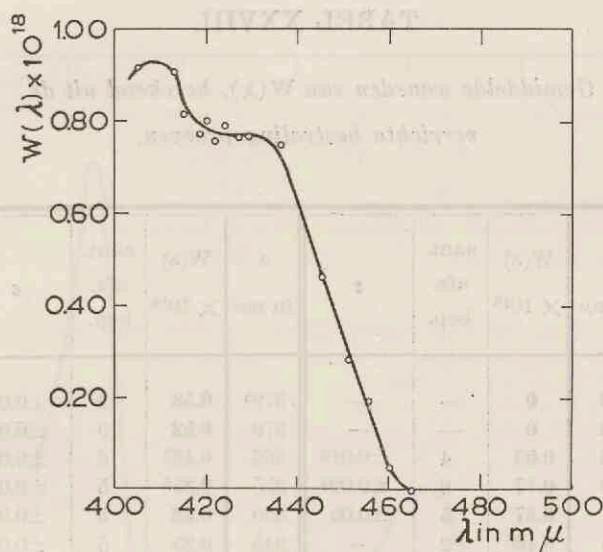


Fig. 27.

Het bij de tweede bestralingsproef met de glasspectrograaf gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

§ 4. Samenvatting van de verkregen uitkomsten.

Wij zullen thans de verkregen gegevens samenvatten; deze samenvatting levert ons het photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum* in absolute maat.

Om reeds genoemde redenen zullen wij de resultaten van de bestralingsproeven met tijdvariatie slechts gebruiken voor zoover ze zijn verkregen met het golflengtegebied beneden 400 m μ ; de resultaten van de bestralingsproef met intensiteitsvariatie (kwartsspectrograaf) worden over het geheele golflengtegebied gebruikt; van de proeven genomen met de glasspectrograaf nemen wij slechts de uitkomsten verkregen met de golflengten grooter dan 400 m μ .

Zoодоende krijgen wij de volgende samenvatting onzer proeven, waarbij de gemiddelden zijn opgegeven van de bij de afzonderlijke proeven gevonden waarden voor $W(\lambda)$ (in $\frac{\text{cm}^2}{\text{quant}}$); achter ieder gemiddelde is het aantal afzonderlijke bepalingen, waarop dit gemiddelde betrekking heeft, aangegeven, benevens de door ϵ voorgestelde halve middelbare fout, welke met de reeds op blz. 59 genoemde formule is berekend.

TABEL XXVIII.

Gemiddelde waarden van $W(\lambda)$, berekend uit de
verrichte bestralingsproeven.

λ in $m\mu$	$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$	aant. afz. bep.	ϵ	λ in $m\mu$	$W(\lambda)$ $\times 10^{18}$	aant. afz. bep.	ϵ
490	0	—	—	379 ⁵	0.58	9	± 0.046
478	0	—	—	376	0.52	9	± 0.032
468	0.03	4	± 0.013	366	0.43 ⁵	6	± 0.025
460	0.17	6	± 0.023	355	0.35 ⁵	5	± 0.027
451	0.37	5	± 0.05	350	0.33	5	± 0.034
445	0.46 ⁵	2	—	345	0.35	5	± 0.035
436	0.63	6	± 0.04	334	0.43	9	± 0.025
427	0.66	5	± 0.055	328	0.49 ⁵	8	± 0.024
424	0.68	5	± 0.054	313	0.54	8	± 0.022
422 }	0.71	5	± 0.027	306 ⁵	0.58 ⁵	7	± 0.044
421 ⁵ }				302	0.74	6	± 0.032
418 ⁵	0.75	8	± 0.024	297	1.00	7	± 0.061
415	0.79	5	± 0.016	292	1.35	7	± 0.095
413	0.82 ⁵	7	± 0.024	289	1.41	7	± 0.081
405	0.84 ⁵	8	± 0.035	280	1.10	6	± 0.148
390	0.74	8	± 0.06	275	0.96	6	± 0.115
386	0.66	9	± 0.052	270	0.98	3	—

In fig. 28 geven wij tenslotte het beeld van het door ons bepaalde photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum* in absolute maat.

Wij vinden een spectrum met twee uitgesproken maxima bij 405 à 410 $m\mu$ en bij 290 $m\mu$ en met twee aanduidingen voor nevenmaxima bij ca 430 $m\mu$ en bij ca 320 $m\mu$. Voorts is er een minimum bij 350 $m\mu$, terwijl het spectrum eindigt bij ca 470 $m\mu$.

Zooals men in de figuur ziet, is de aansluiting van het met de kwartspectrograaf bepaalde deel van het spectrum (270—390 $m\mu$) aan het met de glasspectrograaf bepaalde gedeelte (405 $m\mu$ en hoger) voortreffelijk.

Ten overvloedige zij nog opgemerkt, dat de beschreven bestralingsproeven op zeer uiteenlopende data en met bacterieculturen met varierende lichtintensiteiten zijn geschied.

Voor een nadere bespreking van het gevonden inactiveringsspectrum wordt hier naar hoofdstuk XIV verwezen.

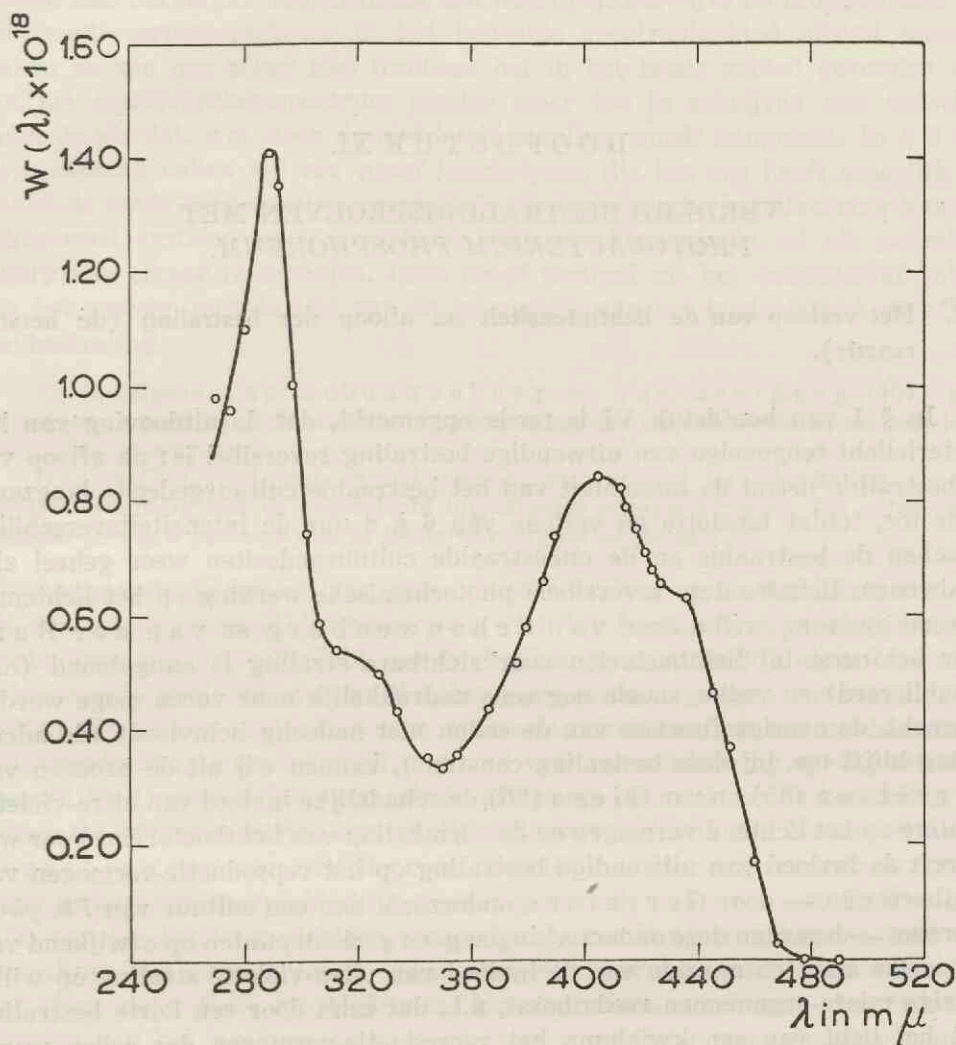


Fig. 28.

Photochemisch inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum* in absolute maat. De curve vormt het gemiddelde van de in het voorgaande beschreven bestralingsproeven.

HOOFDSTUK XI.

VERDERE BESTRALINGSPROEVEN MET *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

§ 1. Het verloop van de lichtintensiteit na afloop der bestraling (de herstelreactie).

In § 1 van hoofdstuk VI is reeds opgemerkt, dat de uitdooving van het bacterieel licht tengevolge van uitwendige bestraling reversibel is: na afloop van de bestraling neemt de intensiteit van het bestraalde cultuurgedeelte langzaam weer toe, totdat tenslotte na verloop van 6 à 8 uur de intensiteitsverschillen tusschen de bestraalde en de onbestraalde cultuurgedeelten weer geheel zijn verdwenen. Behalve deze reversibele photochemische werking op het lichtemitterend systeem, welke door van Schouwenburg en van der Burg voor het eerst bij lichtbacteriën voor zichtbare straling is aangetoond (niet gepubliceerd) en welke, zooals nog eens nadrukkelijk naar voren moge worden gebracht, de overige functies van de cellen niet nadeelig beïnvloedt (de ademhaling blijft o.a. bij deze bestraling constant), kennen wij uit de proeven van Gerritsen (35) en van Giese (36) de schadelijke invloed van ultra-violette straling op het lichtend vermogen en de ademhaling van lichtbacteriën. Voor wat betreft de invloed van uitwendige bestraling op het reproductie-vermogen van lichtbacteriën — door Gerritsen onderzocht aan een cultuur van *Ph. phosphoreum* — leverden deze onderzoekingen geen gezichtspunten op afwijkend van die, welke men ten aanzien van de invloed van ultra-violette straling op willekeurige micro-organismen reeds bezat, n.l., dat zelfs door een korte bestraling met het licht van een kwiklamp het reproductie-vermogen der cellen wordt opgeheven en dat deze werking wordt veroorzaakt door straling met zeer korte golflengte.

Uit later gedane, meer quantitatieve onderzoekingen over de invloed van bestraling met ultra-violet licht op bacteriën weten wij, dat straling met een golflengte kleiner dan 300 m μ een sterke bactericide werking vertoont en dat boven de 300 m μ deze werking snel tot nul daalt ¹⁾.

Aangezien het door ons gevonden inactiveringsspectrum zich tot in dit „letale” stralingsgebied uitstrekt, moesten wij bij onze proeven rekening houden met een mogelijke doorkruising van het bestudeerde reversibele bestralings-effect op het lichtemitterend systeem en het letale effect op de cel als

1) Zie voor een nauwkeurig quantitatief onderzoek naar de invloed van ultra-violette stralen op bacteriën: F. L. Gates (32) en voor een recent algemeen overzicht over de invloed van bestraling op bacteriën het desbetreffende hoofdstuk in: B. M. Duggar, Biological Effects of Radiation (23).

geheel. Een dergelijke doorkruising zou begrijpelijkerwijze de interpretatie van het inactiveringsspectrum in het bedoelde spectraalgebied uiterst onzeker maken en zou ons zeker niet toestaan het in het letale gebied gevonden deel van het inactiveringsspectrum zonder meer toe te schrijven aan hetzelfde molecuul als dat, wat door de niet-letale straling wordt aangetast. In § 2 van dit hoofdstuk zullen wij een proef beschrijven, die het ons heeft mogelijk gemaakt de beide processen — reversibele photochemische inactivering van het lichtgevend systeem en irreversibele letale werking op de cel als geheel — scherp van elkaar te scheiden. Deze proef bestond uit het quantitatief volgen van het verloop met de tijd van de intensiteit van het bacterieelicht na afloop der bestraling.

Er is volgens van Schouwenburg en van der Burg (107) geen invloed van uitwendige bestraling op de ademhaling der lichtbacteriën in het niet-letale deel van het spectrum.

Giese (36) vond, dat in het ultra-violette gebied de ademhaling van *Ph. Fischeri* evenredig met de hoeveelheid ingestraalde energie afneemt. Dit effect staat blijkbaar in nauw verband met de letale werking op de geheele cel.

Aangaande de invloed van ultra-violette straling op de lichtintensiteit van *Ph. phosphoreum* vond Gerretsen, dat bij bestraling van een lichtende plaatcultuur met het volle licht van een kwiklamp, onmiddellijk na de bestraling de bestraalde gebieden even goed lichtten als ernaast gelegen onbestraalde gedeelten. Na verloop van enkele uren daalde de lichtintensiteit van het bestraalde cultuurgedeelte; na zes à twaalf uur trad volledige uitdooving op. Bij sommige proeven trad evenwel het verrassende effect op, dat vlak na de bestraling het bestraalde cultuurgedeelte aanmerkelijk *intensiever* lichtte dan het onbestraalde. Gerretsen nam aan, dat door de bestraling in het cultuurmedium sporen eener actieve zuurstofverbinding werden gevormd, welke tot een snellere oxydatie van het luciferine leidden en zodoende een hogere lichtintensiteit veroorzaakten. Hij wees er voorts op, hoe het blijkbaar door middel van bestraling met ultra-violet licht mogelijk was, het reproductie-vermogen der cellen te scheiden van het luminesceerend vermogen, waarbij het reproductie-vermogen het eerst verloren ging.

Hij herinnerde in dit verband aan een proef van Beijerinck (9), die in staat was, door het kweken van lichtbacteriën bij een hogere temperatuur dan de optimale, donkere mutanten te verkrijgen. Onder deze omstandigheden is dus blijkbaar omgekeerd de lichtfunctie gevoeliger dan het reproductie-vermogen.

Giese vond, dat na bestraling van *Ph. Fischeri* met ultra-violet licht de lichtintensiteit sneller afneemt dan de ademhaling en tevens, dat bij kleine bestralingsintensiteiten de afneming van de intensiteit van het bacterieelicht evenredig is met de ingestraalde energie. Hij meent het waargenomen effect te moeten toeschrijven aan de photochemische ontleding van het bacterie-luciferine. Deze verklaring kan echter niet voldoende zijn, omdat hieruit niet is te begrijpen, dat de intensiteit van het bacterieelicht ook na afloop van de bestraling blijft afnemen.

Waarschijnlijker is het, dat Giese een irreversibele afneming van de intensiteit van het bacterieel licht als gevolg van een beschadiging van de cel als geheel heeft waargenomen.

De proeven van Giese zijn niet scherp te interpreteren, omdat hij bij zijn proeven geen monochromatische straling heeft gebruikt, terwijl toch steeds rekening moet worden gehouden met het feit, dat in photochemisch opzicht de verschillende golflengten zich niet alleen quantitatief, maar ook kwalitatief verschillend kunnen gedragen.

Het bleek ons, dat het door Gerretsen vermelde effect van een tijdelijk hogere lichtintensiteit op de bestraalde plaatsen, alléén optreedt na bestraling met golflengten korter dan $300\text{ m}\mu$; in dit zelfde golflengtegebied vindt naderhand volledige irreversibele uitdooving plaats door het afsterven der cellen. Ter illustreering zijn in fig. 29 enkele fotografische opnamen weergegeven van een plaatcultuur van *Ph. phosphoreum* op verschillende tijden na afloop van de bestraling met het complete kwikspectrum.

Opname A, een cultuur van *Ph. phosphoreum* gefotografeerd direct na afloop van een bestraling gedurende twee minuten met het volledige spectrum van de watergekoelde superhoogedruk-kwiklamp. De door de afzonderlijke kwiklijnen veroorzaakte photochemische werking is duidelijk waarneembaar. In de reproductie zijn de golflengten van eenige lijnen aangegeven.

Opname B, een cultuur ca 2 uur na de bestraling gefotografeerd. Het gebied links van de $302\text{ m}\mu$ -lijn vertoont een aanmerkelijk hogere lichtintensiteit dan de naastgelegen onbestraalde gebieden. Rechts van de $302\text{ m}\mu$ -lijn (golflengten $> 302\text{ m}\mu$) zien wij, dat de photochemische werking, vergeleken met die van opname A, alweer aanmerkelijk is afgenomen.

Opname C, een cultuur ca 6 uur na de bestraling gefotografeerd. Het gebied links van de $302\text{ m}\mu$ -lijn is thans volledig uitgedoofd. Deze uitdooving is irreversibel. In het gebied rechts van de $302\text{ m}\mu$ -lijn bezit het bestraalde cultuurgedeelte weer vrijwel dezelfde intensiteit als de aangrenzende niet-bestraalde gedeelten.

Door deze proef bewijzen wij dus:

- 1e, dat, althans in het onderzochte intensiteitsgebied, slechts straling met een golflengte kleiner dan $300\text{ m}\mu$ op *Ph. phosphoreum* letaal werkt;
- 2e, dat, althans in het onderzochte intensiteitsgebied, slechts straling met een golflengte kleiner dan $300\text{ m}\mu$ het door Gerretsen voor het eerst waargenomen effect van een voorbijgaande intensiteitsverhoging van het bacterieel licht kan bewerken.

De verklaring voor de onder 1e genoemde letale werking moet worden gezocht in de photochemische ontleding van voor het leven der cel essentiële eiwitten, waarschijnlijk nucleoproteïden; men vergelijk hiervoor de gedeeltelijk reeds eerder genoemde publicaties van Duggar en Hollander (24, 62).

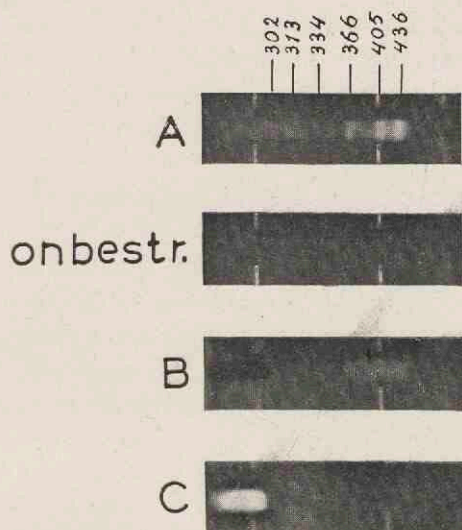


Fig. 29.

Reproductie van enkele fotografische negatieven, verkregen door het opnemen van eenige bacterie-culturen in het eigen licht, op verschillende tijden na afloop der bestraling.

A onmiddellijk na een bestraling gedurende twee minuten; de afzonderlijke kwiklijnen zijn duidelijk waarneembaar.

B twee uur na afloop der bestraling; de photochemische werking is reeds weer sterk afgenomen. In het gebied $< 300 \text{ m}\mu$ is de intensiteit van het bacterielicht hooger dan in het naastgelegen onbestraalde gebied.

C de normale photochemische werking is geheel verdwenen. In het gebied $< 300 \text{ m}\mu$ is volledige uitdoving opgetreden.

Wat betreft de onder 2e genoemde voorbijgaande intensiteitsverhoging van het bacterielicht zou men kunnen veronderstellen, dat het dehydrogeneerend systeem tengevolge van de bestraling tijdelijk wordt geactiveerd. Dit zou beteekenen, dat er per tijdseenheid meer LH_2 uit L wordt gevormd (zie hoofdstuk III § 2 en 3), hetgeen een hogere lichtintensiteit ten gevolge moet hebben. In dit verband zij opgemerkt, dat men als gevolg van een bestraling met ultra-violet licht wel eens een tijdelijke stimuleering van de ademhaling heeft vastgesteld (Measure, 1932 (92)).

Alvorens in te gaan op het mechanisme van de herstelactie, zullen wij thans een proef beschrijven, waarbij wij het verloop der lichtintensiteit van de bestraalde bacteriecultuur na beëindiging der bestraling quantitatief hebben gevolgd.

§ 2. Het quantitative verloop van de herstelreactie.

Wij bestudeerden het verloop van de herstelactie, door een bacteriecultuur gedurende twee minuten te bestralen (onder gebruikmaking van de kwartspectrograaf) en hem daarna op bepaalde tijden te fotografeeren en wel: direct, 4', 8', 15', 30', 60' en 120' na afloop van de bestraling. Op de gewone wijze bepaalden wij uit de micro-fotogrammen de relatieve intensiteiten van het bacterielicht op overeenkomstige onbestraalde en bestraalde plaatsen der cultuur en konden zoo voor een reeks golflengten over het geheele golflengtegebied het verloop van de photochemische werking W met de tijd volgen.

Voor ieder der beschouwde golflengten werd de onmiddellijk na de bestraling gevonden photochemische werking op 100 gesteld en werden de werkingen bij de diverse tijden procentueel in deze beginwerking uitgedrukt. In tabel XXIX geven wij de aldus voor iedere golflengte procentueel bepaalde werkingen weer. Wij hebben de tabel in twee gedeelten gesplitst: boven de streep hebben de gevonden waarden betrekking op het niet-bactericide deel van het spectrum, beneden de streep op het bactericide deel. Van beide gedeelten zijn afzonderlijke gemiddelden opgemaakt.

Na 60 minuten blijkt de intensiteit van het cultuurgedeelte, dat met het golflengtegebied $< 300 \text{ m}\mu$ was bestraald, hooger te zijn dan die van het nevenliggende onbestraalde cultuurgedeelte, terwijl voor de bacteriën, welke met het niet-bactericide golflengtegebied $> 300 \text{ m}\mu$ zijn bestraald, de photochemische werking dan nog 27% bedraagt van zijn waarde op het tijdstip 0'. Bij een beschouwing van de gemiddelden blijkt, dat tot een tijd van 30 minuten na de bestraling het herstel van de lichtintensiteit over het geheele onderzochte golflengtegebied van 280 tot $436 \text{ m}\mu$, dus zoowel in het bactericide als in het niet-bactericide deel van het spectrum, eenzelfde verloop heeft. Dit wil dus zeggen, dat het mechanisme van de herstelreactie over het geheele onderzochte golflengtegebied hetzelfde is, iets wat sterk pleit voor de opvatting, dat bij de primair intredende photochemische reactie slechts één bepaalde component van het lichtgevend systeem wordt aangegrepen.

TABEL XXIX.

De photochemische werkingen op verschillende tijden na afloop der bestraling gemeten. Voor iedere opgegeven golflengte zijn de photochemische werkingen procentueel uitgedrukt in de werking onmiddellijk na de bestraling (tijd 0').

λ in $m\mu$	tijdsverloop na de bestraling						
	0'	4'	8'	15'	30'	60'	120'
Photochemische werking							
436	100	92	82 ⁵	71	51	29 ⁵	11 ⁵
420	100	91	82 ⁵	68 ⁵	49 ⁵	26	10 ⁵
405	100	90	81	69	51	29 ⁵	12
379	100	92	80	66	50 ⁵	25	12 ⁵
366	100	89	81 ⁵	68	49 ⁵	24 ⁵	11
334	100	87	71 ⁵	66	49	—	—
328	100	93 ⁵	78 ⁵	58	50 ⁵	—	—
313	100	82 ⁵	70 ⁵	58	43	—	—
307	100	87 ⁵	76 ⁵	64	53	—	—
302	100	83 ⁵	75	58 ⁵	45	—	—
	100	89	78	65	49	27	11 ⁵
	gemiddeld.						
297	100	83	77 ⁵	65 ⁵	46 ⁵	< 0	< 0
292	100	89 ⁵	77	70	55	< 0	< 0
289	100	87	76 ⁵	73 ⁵	62 ⁵	< 0	< 0
280	100	90 ⁵	84	—	—	< 0	< 0
	100	87 ⁵	79	70	55	< 0	< 0
	gemiddeld.						

< 0 beteekent hier, dat de intensiteit in het bestraalde gebied hooger is dan in het naastgelegen onbestraalde gebied.

Bij hersteltijden langer dan 30 minuten treedt evenwel bij de bacteriën die met het golflengtegebied < 300 $m\mu$ zijn bestraald, de in § 1 reeds besproken secundaire werking op: de lichtintensiteit neemt zeer snel toe tot een waarde, welke ver ligt boven die van de naastgelegen onbestraalde cultuurgedeelten, om na verloop van eenige uren weer vrij snel af te nemen en tenslotte na 5 à 7 uur nul te worden. Dit is dus de reeds genoemde letale werking, welke blijkbaar nog wordt voorafgegaan door een opleving van bepaalde functies van de bacterieel.

Een belangrijk gezichtspunt is nu, dat wij, door aan te toonen dat gedurende de eerste 30 minuten na afloop der bestraling de teruggang van de oorspronkelijke photochemische werking over het geheele golflengtegebied, dus ook in het letale gebied, eenzelfde verloop heeft, de *irreversibele letale werking* scherp hebben kunnen scheiden van de door ons bestudeerde *reversibele inactivering* van het lichtemitterend systeem. Dit houdt tevens de voor ons onder-

zoek zeer belangrijke conclusie in, dat de bepaling van het photochemische inactiveringsspectrum van één der bestanddeelen van het lichtemitterend systeem niet wordt gestoord door een tegelijkertijd optredende photochemische werking op een voor de activiteit van de cel als geheel essentieel bestanddeel.

Wij kunnen nu bij de interpretatie van de herstelreactie van de volgende twee mogelijkheden uitgaan:

- a) het herstel der lichtintensiteit vindt plaats, doordat de bij de lichtemissie betrokken photo-gevoelige stof, welke door de bestraling is omgezet, in de loop van de tijd door de cel wordt bijgevormd;
- b) de photochemische reactie is werkelijk reversibel, wat dus inhoudt, dat het in de lichtgevende reactie actieve molecule in de loop van de tijd uit het omzettingproduct van de photochemische reactie wordt teruggevormd.

Bij het herstel van de lichtintensiteit volgens a) spelen de celenzymen ongetwijfeld een rol. Het is moeilijk te voorspellen, wat in dat geval de orde van de beschouwde naleveringsreactie zal zijn. Verloopt de herstelreactie echter volgens b), dan moet deze ongetwijfeld een monomoleculair karakter hebben. Het verloop van de herstelreactie volgens b) toch eischt, dat de snelheid van terugvorming van de photo-gevoelige stof op ieder moment evenredig is met de op dat moment omgezette hoeveelheid van die stof.

In mathematische vorm:

$$\frac{dm_t}{dt} = \delta(m_0 - m_t)$$

$$\text{of } m_t = m_0 - (m_0 - m)e^{-\delta t}$$

$$\text{en } \frac{m_0 - m_t}{m_0 - m} = e^{-\delta t}.$$

Hierin is: m_0 de hoeveelheid photo-gevoelige stof vóór de bestraling;

m de hoeveelheid photo-gevoelige stof onmiddellijk na de bestraling (voor $t = 0$);

m_t de hoeveelheid photo-gevoelige stof op de tijd t na de bestraling;

δ de snelheidsconstante van de herstelreactie.

Wij voeren nu in:

$$W_t' = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \quad \text{en} \quad W_0' = \frac{m_0 - m}{m_0}$$

Herinneren wij ons de in hoofdstuk VII gemaakte opmerking over de koppeling van de intensiteit van het bacterielicht aan de hoeveelheid photo-gevoelige stof, dan is het duidelijk, dat W_t' en W_0' de procentuele photochemische werkingen voorstellen respectievelijk op de tijden 0 minuten en t

minuten na afloop der bestraling, dus $W_t' = \frac{Y_0 - Y_t}{Y_0}$ en $W_0' = \frac{Y_0 - Y}{Y_0}$.

Hierin zijn Y_0 de intensiteit van de onbestraalde bacteriën, Y_t en Y de intensiteiten van de bestraalde bacteriën op de tijdstippen t minuten en 0 minuten na afloop der bestraling.

Wij krijgen nu:

$$\frac{W_t'}{W_0'} = e^{-\delta t}$$

$$\text{of } \log \frac{W_t'}{W_0'} = -\frac{\delta}{2.3} \times t \quad \text{of} \quad \log W_t' = \log W_0' - \frac{\delta}{2.3} \times t.$$

Wil nu aan de eisch, welke uit de voorstelling sub b) voortvloeit — toeneming van de hoeveelheid photo-gevoelige stof (:) de photochemisch omgezette hoeveelheid — zijn voldaan, dan moeten wij volgens het voorafgaande een lineair verband verwachten, indien wij de logarithme van de procentueele werking uitzetten tegen de tijd, of, wat slechts op een evenwijdige verschuiving neerkomt, indien wij $\log \frac{W_t'}{W_0'}$ uitzetten tegen de tijd.

Uit de in tabel XXIX gegeven gemiddelde waarden voor de photochemische werking W_t berekenen wij de volgende waarden voor de procentueele photochemische werking W_t' en voor $\frac{W_t'}{W_0'}$ (tabel XXX).

TABEL XXX.

Het quantitative verloop van de herstelreactie.

	0'	4'	8'	15'	30'	60'	120'
W_t'	63	59	54	48	39	23 ⁵	11
$\frac{W_t'}{W_0'}$	100	93 ⁵	86	76	62	37	17 ⁵

In fig. 30 is tabel XXX grafisch voorgesteld.

Het blijkt, dat het lineaire verband tusschen $\log \frac{W_t'}{W_0'}$ en t op zeer bevredigende wijze experimenteel is gerealiseerd.

Hiermede is bewezen, dat de restauratie van het lichtemitterend systeem, welke optreedt naar aanleiding van de photochemische inactivering van één der componenten daarvan, het karakter heeft van een monomoleculaire reactie.

Wanneer men op grond van het bovenstaande alléén zou willen concluderen tot de juistheid van het onder b) veronderstelde reversibele verloop van de herstelreactie moge men bedenken, dat weliswaar deze veronderstelling klopt met het experimenteel gevonden verloop, doch dat wij geenszins hebben be-

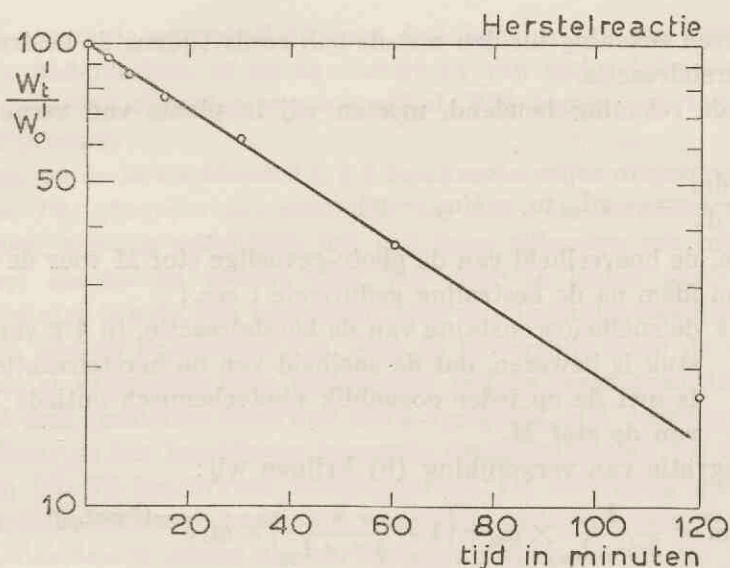


Fig. 30.

Quantitatief verloop van de herstelreactie.

Uit het feit, dat de logarithme van de procentueele photochemische werking evenredig is met de tijd, volgt het monomoleculair karakter van de herstelreactie.

wezen, dat het herstel volgens de mogelijkheid onder a) genoemd niet monomoleculair of schijnbaar monomoleculair zou kunnen verlopen.

Voorloopig zullen wij dan ook dienaangaande nog géén beslissing kunnen treffen. In § 2 van hoofdstuk XIV komen wij nog op deze kwestie terug en zullen dan zien, dat er argumenten zijn aan te voeren ten gunste van de zienswijze, dat de herstelreactie inderdaad een reversie van de photochemische ontleding is.

§ 3. Nadere beschouwing van de formuleering der photochemische werking in verband met de herstelreactie.

In hoofdstuk VII veronderstelden wij bij het zoeken naar een geschikte uitdrukking voor de photochemische werking W , dat een bepaalde, met de lichtemissie verbonden stof M bij de bestraling photochemisch wordt aangegrepen en dat deze omzetting zou gehoorzamen aan de vergelijking:

$$\frac{dm}{dt} = -\alpha I_{q0} m_0 \quad (a)$$

(I_{q0} is de quantenintensiteit van het ingestraalde licht in de bacteriecellen ter plaatse van het absorbeërend systeem, α is de snelheidsconstante van de photochemische reactie, welke ter afkorting in de plaats van het product $\varphi\gamma\beta_\lambda$ is gezet).

Strikt genomen stelden wij toen de gang van zaken te eenvoudig voor,

omdat wij geen rekening hielden met de ook reeds tijdens de bestraling plaats vindende herstelreactie.

Hiermede rekening houdend, moeten wij in plaats van vergelijking (a) schrijven:

$$\frac{dm}{dt} = -\alpha I_{q0} m_0 + \delta(m_0 - m) \quad (b)$$

Hierin is: m_0 de hoeveelheid van de photo-gevoelige stof M voor de bestraling; m idem na de bestraling gedurende t sec.;

δ de snelheidsconstante van de herstelreactie. In § 2 van dit hoofdstuk is bewezen, dat de snelheid van de herstelreactie evenredig is met de op ieder oogenblik photochemisch ontlede hoeveelheid van de stof M.

Bij integratie van vergelijking (b) krijgen wij:

$$m = \frac{\delta}{\delta + \alpha I_{q0}} \times m_0 + \left(1 - \frac{\delta}{\delta + \alpha I_{q0}}\right) \times m_0 e^{-(\delta + \alpha I_{q0})t} \quad (c)$$

Wij hebben in het voorgaande gezien, dat de snelheidsconstante van de photochemische reactie veel grooter is dan die van de herstelreactie. Zorgen wij tevens voor een hooge bestralingsintensiteit, dan is dus αI_{q0} veel grooter dan δ en gaat vergelijking (c) over in:

$$m = m_0 e^{-\alpha I_{q0}t} \text{ of } \ln \frac{m_0}{m} = \alpha I_{q0}t = W.$$

Wij vinden dus, dat de door ons gebruikte formuleering voor W , ook wanneer wij de herstelreactie in de beschouwing opnemen, zijn practische juistheid behoudt.

§ 4. De beteekenis van zuurstof voor de photochemische reactie.

Wij hebben in § 1 van hoofdstuk VI reeds opgemerkt, dat H a r v e y (50) kon aantoonen, dat het lichten van een *Cypridina*-extract door uitwendige bestraling wordt gedoofd en tevens, dat deze dooving zijn oorzaak vindt in een photochemische omzetting van het luciferine, niet van de luciferase.

Hij bewees verder, dat deze omzetting slechts plaats vindt bij aanwezigheid van moleculaire zuurstof; bestraling van zuurstof-vrije *Cypridina*-extracten of van zuurstof-vrije luciferine-oplossingen had niet het minste effect op het lichtemitterend vermogen.

De (reversibele) uitdooving van een lichtend Cypridina-extract door bestraling berust dus op een photochemische oxydatie van het luciferine.

Uit de proeven van H a r v e y volgt nog, dat de snelheid, waarmede deze photo-oxydatie verloopt, grooter moet zijn dan de snelheid, waarmede luciferine onder invloed van luciferase door moleculaire zuurstof wordt geoxydeerd. H a r v e y was niet in staat om bij lichtbacteriën (*Ph. phosphoreum*) een overeenkomstig bestralings-effect aan te toonen (51).

Nu wij eenmaal hadden aangetoond, dat ook bij bestraling van lichtbac-

teriën de lichtemissie reversibel afneemt, leek het dus van veel belang ook voor dit geval te onderzoeken, of de aanwezigheid van moleculaire zuurstof voorwaarde is voor het optreden van het effect. Wij namen daartoe de volgende eenvoudige proeven.

Om een, op de in hoofdstuk IX § 2 beschreven wijze uitgesneden, gelatinecultuur van *Ph. phosphoreum* plaatsten wij een van boven en van onderen vlak geslepen messing manteltje, dat aan twee zijkanten een messing buisje droeg, resp. als in- en uitlaat voor het door te leiden gas. De messing mantel werd met behulp van gesmolten kleefwas luchtdicht gekit op het voorwerpglaasje met de bacteriecultuur. Aan de bovenzijde werd de mantel eveneens luchtdicht afgesloten door middel van een op maat gesneden voorwerpglaasje dat met gesmolten kleefwas werd vastgekit. Het voorwerpglas dat de bacteriecultuur en het beschreven kamertje droeg, plaatsten wij in de slede S van het op blz. 76 beschreven instelapparaat. De bestraling geschiedde met behulp van de kwartsmonochromator, waarbij te bedenken valt, dat wij wegens het glazen dekplaatje echter slechts in het zichtbare en in het nabije ultraviolette spectraalgebied een effect konden verwachten. Wij leidden door middel van de in- en uitlaatbuisjes waterstof, die ter verwijdering van sporen zuurstof over verhit palladium-asbest was gevoerd, door het kamertje. Hoewel de intensiteit van het bacterielicht na eenige minuten doorleiden zeer gering werd en bleef, gelukte het ons niet de cultuur volkomen donker te krijgen. Wij herinneren in dit verband aan eveneens onder alle mogelijke voorzorgen gedane proeven van Johnson, van Schouwenburg en van der Burg (68), die er evenmin in slaagden het licht van een bacteriesuspensie op overeenkomstige wijze volledig te dooven. Deze ervaringen leggen nog eens weer de nadruk op de reeds door Beijerinck aangegeven bruikbaarheid van lichtbacteriën om sporen vrije zuurstof aan te toonen (vergelijk ook: Meyer, 1942 (93)).

Ook doorleiding van gezuiverde stikstof en van gezuiverd koolzuur leidde niet tot volledige uitdooving van het bacterielicht. Hoewel wij er dus niet in slaagden de lichtbacteriën bij deze proeven in een volledig zuurstofvrije gasatmosfeer te brengen, was de zuurstof in ieder geval voor de lichtreactie in hoge mate een beperkende factor.

Nadat het bacterielicht tengevolge van de doorleiding van waterstof een constante, zeer lage intensiteit had verkregen, bestraalden wij onder voortdurend doorleiden van waterstof de cultuur gedurende twee minuten. Na afloop der bestraling viel ondanks de zéér geringe intensiteit van het bacterielicht onmiskenbaar een photochemisch effect waar te nemen. Na toelating van lucht lichtte de bacterie-cultuur in zijn geheel sterk op, *terwijl er geen spoor van een photochemische werking meer waarneembaar was.*

Wij meenen uit deze waarnemingen te moeten besluiten, dat het waargenomen photochemische effect inderdaad gebonden is aan de aanwezigheid van sporen zuurstof. Dat het effect na toetreding der lucht niet langer waarneembaar was, zou dan zijn verklaring moeten vinden in de omstandigheid, dat met sporen zuurstof slechts een zoo geringe hoeveelheid van de photo-

gevoelige component was omgezet, dat dit in de verdere stralingsintensiteit niet tot uiting kwam.

Wij hebben dezelfde proef herhaald, ditmaal met een bestralingstijd van vijf minuten. Ook nu weer zagen wij in de waterstofatmosfeer een duidelijk intensiteitsverschil tusschen de onbestraalde en de bestraalde plaatsen; bij toelating van lucht nam de lichtintensiteit sterk toe en het cultuuroppervlak lichtte weer volkomen homogeen. Ter contrôle bestraalden wij dezelfde cultuur nog eens twee minuten in lucht; de werking vertoonde thans het normale beeld. Deze cultuur werd nu nogmaals in waterstofatmosfeer gebracht en opnieuw bestraald gedurende vier minuten. De normale werking was na afloop dezer bestraling geheel overdekt door de veel diffusere werking in waterstofatmosfeer. Bij toelating van lucht verdween deze laatste werking wederom geheel en de oorspronkelijke photochemische werking (ontstaan door de bestraling in lucht) werd weer zichtbaar.

Lieten wij na een bestraling in waterstofatmosfeer géén lucht toe, dan konden wij constateeren, dat de veroorzaakte photochemische werking reeds na vijf à zes minuten weer volkomen was verdwenen. De bestralingsduur bedroeg hierbij vijf minuten; bij eenzelfde bestralingsduur in lucht duurt het zes à acht uren voor de intensiteiten van de onbestraalde en de bestraalde cultuurgedeelten weer gelijk zijn.

Hoewel het niet doenlijk is voor al deze verschijnselen een passende verklaring te geven, lijkt het toch gerechtvaardigd uit de genomen proeven te concludeeren, dat de aanwezigheid van zuurstof voor het optreden van de normale photochemische werking noodzakelijk is.

Hierbij zijn dan voor wat betreft de beteekenis van de zuurstof nog twee mogelijkheden denkbaar:

1. de photochemische reactie komt neer op een photo-oxydatie;
2. de photo-inactivering zelve is niet afhankelijk van de aanwezigheid van zuurstof, doch het photo-gevoelige molecule is slechts onder aerobe omstandigheden in de cel aanwezig.

In § 2 van hoofdstuk XIV zal blijken, dat er argumenten zijn aan te voeren ten gunste van de laatstgenoemde veronderstelling.

HOOFDSTUK XII.

BESTRALINGSPROEVEN MET *PHOTOBACTERIUM SPLENDIDUM* EN *PHOTOBACTERIUM FISCHERI*.

Om de in hoofdstuk IX § 2 genoemde redenen konden wij voor de definitieve bestralingsproeven met plaatcultures slechts gebruik maken van *Ph. phosphoreum*.

Toch hebben wij gemeend ook nog de twee andere goed lichtende soorten, welke in ons bezit zijn: *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri*¹⁾, in ons onderzoek te moeten betrekken ondanks het feit, dat wij deze bacteriën niet op gelatine konden kweken, doch dit op agar-agar-platen moesten doen.

Ook de bestraling geschiedde met de zeer sterk lichtverstrooiende agar-agar als onderlaag, waardoor de verkregen resultaten zeker minder betrouwbaar zijn dan die met *Ph. phosphoreum*.

Omdat het hier toch slechts om orienteerende proeven ging, voerden wij de bestraling alleen uit met het zichtbare spectraalgebied, onder gebruikmaking van de glasspectrograaf.

De gebruikte bacteriën.

In tegenstelling met *Ph. phosphoreum*, welke voor de groei en het lichten een laag temperatuur-optimum bezit (15° à 17°), moesten *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* bij 23° à 25° worden gekweekt. Overigens geschieden het enten en het kweken op overeenkomstige wijze als dit in hoofdstuk IX uitvoerig voor *Ph. phosphoreum* is beschreven. De kweektijd bedroeg 16 à 20 uur. Het bleek, dat zoowel *Ph. splendidum* als *Ph. Fischeri* slechts gedurende korte tijd hun optimale lichtintensiteit behielden, zoodat het noodig was telkens eenige series platen met twee uur tusschenruimte te enten. Tijdens het kweken plaatsten wij de Petri-schalen onder een geringe helling, aangezien bij een vlakke stand van de schalen de bacterielaag zeer vochtig blijft en dan tijdens de bestralingsproef dooreenvloeit (een agar-cultuur is door het slecht opnemend vermogen van agar-agar voor water, in tegenstelling tot een gelatine-cultuur, steeds vochtig).

Het was ons niet mogelijk om goed lichtende plaatcultures van *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* te verkrijgen met een even geringe dikte van de bacterielaag als dit voor *Ph. phosphoreum* was gelukt (15 à 17 μ).

1) Beide afkomstig uit de verzameling van het Laboratorium voor Microbiologie der Technische Hoogeschool te Delft.

Op overeenkomstige wijze als destijds voor *Ph. phosphoreum* bepaalden wij na een kweektijd van 16 uur de laagdikte, waarbij wij vonden:

voor *Ph. splendidum*: laagdikte ca 55 μ ;

voor *Ph. Fischeri*: laagdikte ca 28 μ .

De bestralingsproeven.

Deze geschieden, evenals de uitwerking ervan, geheel volgens de reeds voor *Ph. phosphoreum* beschreven methode.

Reeds aanstonds viel bij de bestralingen een duidelijk verschil op met *Ph. phosphoreum*: bij eenzelfde bestralingsintensiteit was de photochemische werking bij *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* veel geringer dan bij *Ph. phosphoreum* en bovendien scheen de werking veroorzaakt door de 405 m μ -lijn ten opzichte van die veroorzaakt door de 436 m μ -lijn groter te zijn dan dit destijds bij de bestraling van *Ph. phosphoreum*-cultures was gevonden. Deze laatste waarneming konden wij na het photometreeren en uitwerken der photogrammen bevestigen en objectief vastleggen.

Vooreerst scheen het dus, alsof wij bij *Ph. splendidum* en bij *Ph. Fischeri* niet alleen een kwantitatief, doch ook een aanzienlijk kwalitatief verschil vonden met *Ph. phosphoreum*.

Wij voerden de volgende bestralingsproeven uit:

a. *Ph. splendidum*.

Bestraald gedurende 4' en gedurende 2'. Spleetbreedte 0.48 mm, diafragma maximaal.

b. *Ph. Fischeri*.

Bestraald gedurende 4'. Spleetbreedte 0.48 mm, diafragma maximaal.

De resultaten.

Bij de beoordeeling hiervan moet men bedenken, dat de gevonden waarden voor het meerendeel van één waarneming afkomstig zijn. Wij hechten dan ook slechts belang aan het algemeene karakter der gevonden krommen en de ongeveer ligging van de maxima, niet aan eventueel aanwijsbare nevenmaxima, aangezien deze, in tegenstelling tot de nevenmaxima in het werkingsspectrum van *Ph. phosphoreum* waar wij voor ieder punt over gemiddeld 6 à 7 afzonderlijke waarnemingen beschikten, volkomen binnen de proeffout vallen.

a. *Ph. splendidum*.

Tabel XXXI.

Bepaling van de photochemische werking in absolute maat aan een plaatcultuur van *Ph. splendidum*. Laagdikte 55μ .

λ in $m\mu$	4' bestr. $W \times 100$	2' bestr. $W \times 100$	I_q $\times 10^{-14}$	4' bestr. $\frac{W}{I_q \times t} \times 10^{19}$	2' bestr. $\frac{W}{I_q \times t} \times 10^{19}$	$W(\lambda)$ $\times 10^{19}$ gem.
436	27.0	13.9	216	0.52	0.54	0.53
431	12.5	—	67.0	0.78	—	0.78
426	14.0	—	45.0	1.29	—	1.29
421	12.8	—	32.8	1.62	—	1.62
416	11.5	—	27.0	1.76	—	1.76
414	14.3	—	28.8	2.06	—	2.06
412	19.4	—	32.7	2.48	—	2.48
410	20.0	—	35.3	2.36	—	2.36
405	39.5	20.8	78.8	2.09	2.20	2.14

In fig. 31 zijn de gevonden punten grafisch uitgezet.

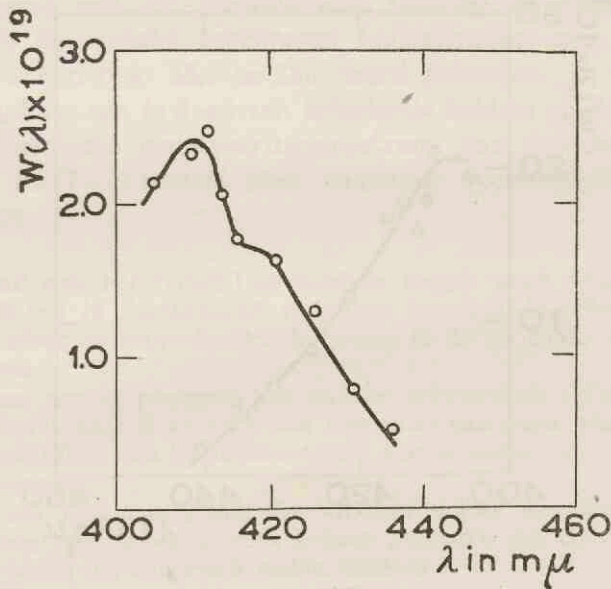


Fig. 31.

Het bij een bestralingsproef met *Ph. splendidum* in het zichtbare spectraalgebied gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

b. *Ph. Fischeri*.

Tabel XXXII.

Bepaling van de photochemische werking in absolute maat aan een plaatcultuur van *Ph. Fischeri*. Laagdikte 28 m μ .

λ in m μ	I' bestr. $W \times 100$	I_q $\times 10^{-14}$	$\frac{W}{I_q \times t} \times 10^{19}$
440 ⁵	(4.6)	100	(0.19)
436	22.5	216	0.43
431	9.2	67.0	0.57
426	8.7	45.0	0.81
421	9.2	32.8	1.17
416	10.9	27	1.67
414	12.2	28.8	1.77
412	12.4	32.7	1.58
411	14.4	33.8	1.78
410	17.9	35.3	2.11
405	37.0	78.8	1.96

In fig. 32 is tabel XXXII grafisch weergegeven.

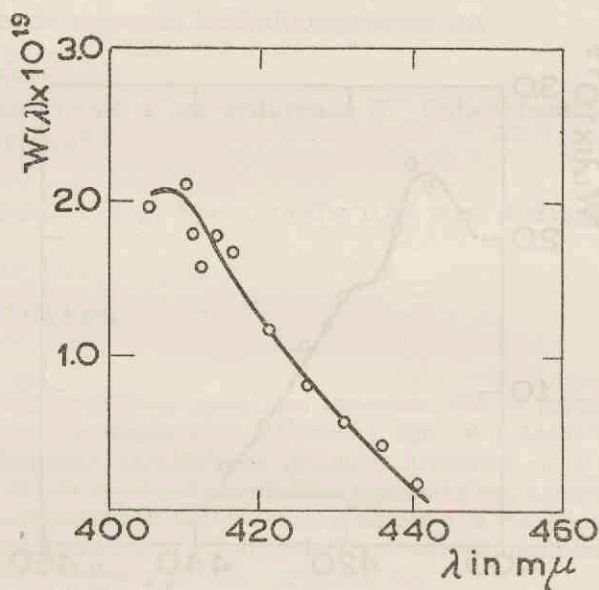


Fig. 32.

Het bij een bestralingsproef met *Ph. Fischeri* in het zichtbare spectraalgebied gevonden verband tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de golflengte van het ingestraalde licht.

Bespreking van de resultaten.

Voor *Ph. splendidum* vinden wij een maximum bij ca 410 m μ ; voor *Ph. Fischeri* waarschijnlijk ook, hoewel daarbij de spreiding der punten zoodanig is, dat de ombuiging der curve binnen de proeffout valt.

Wat de ligging van het werkingsmaximum in het zichtbare spectraalgebied betreft, schijnen dus de inactiveringsspectra van *Ph. splendidum* en met eenige waarschijnlijkheid ook van *Ph. Fischeri*, met dat van *Ph. phosphoreum* nagenoeg overeen te stemmen. Een duidelijk kwalitatief verschil echter tusschen *Ph. phosphoreum* éénerzijds en *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* anderzijds is, dat het spectrum bij de laatstgenoemde soorten zich minder ver uitstrekt in het zichtbare spectraalgebied. Voor *Ph. phosphoreum* vonden wij, dat het inactiveringsspectrum eindigde bij ca. 470 m μ ; de inactiveringsspectra van *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* eindigen daarentegen reeds tusschen 440 en 450 m μ .

Vergelijken wij de absolute hoogte der maxima bij ca 410 m μ in de inactiveringsspectra van *Ph. phosphoreum*, *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* dan vinden wij resp. 0.85×10^{-18} , 2.40×10^{-19} en 2.10×10^{-19} .

Voor *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* vinden wij dus vrijwel overeenstemmende waarden, doch deze zijn een factor ruim vier lager dan voor *Ph. phosphoreum*.

Een gevolg van de verschillende laagdikten der bacteriën kan dit nauwelijks zijn.

Bij de proeven met *Ph. phosphoreum* bedroeg de gemiddelde laagdikte 16 μ , terwijl bij de zoojuist beschreven bestralingsproeven voor *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* resp. 55 μ en 28 μ werd gevonden.

Zou de laagdikte een invloed van beteekenis hebben op de absolute hoogte van het photochemische inactiveringsspectrum, dan zouden wij zeker voor *Ph. splendidum* en *Ph. Fischeri* geen nagenoeg overeenstemmende waarden hebben gevonden.

De verklaring voor het verschil in absolute hoogte moet waarschijnlijk worden gezocht in verschillen in lichtbrekend vermogen tusschen de cellen der diverse bacteriesoorten, waardoor de hoeveelheid licht, welke in de cel komt, van soort tot soort sterk kan varieren.

Het mislukken van de pogingen van andere onderzoekers (Harvey, Giese), om de voor het eerst door Harvey aan *Cypridina*-extracten waargenomen invloed van uitwendige bestraling ook bij lichtbacteriën aan te toonen, kan door deze omstandigheid zijn veroorzaakt.

Het is dan ook niet onmogelijk, dat wij door zuiver toevallige omstandigheden juist dat organisme voor ons onderzoek hebben gebruikt, dat op vrijwel ideale wijze aan alle eischen, welke dit onderzoek stelde, voldeed.

HOOFDSTUK XIII.

EENIGE OPMERKINGEN OVER DE MOLECULAIRE ABSORPTIE-COEFFICIENT VAN DE PHOTO-GEVOELIGE STOF EN OVER HET QUANTENRENDEMENT VAN DE PHOTOCHEMISCHE REACTIE BIJ BESTRALING VAN *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

In hoofdstuk VII leidden wij de volgende betrekking af tusschen de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ en de moleculaire absorptie-coëfficiënt β_λ van de receptor:

$$W(\lambda) = \beta_\lambda \varphi' \gamma \quad (10)$$

$$\text{of } \beta_\lambda = \frac{W(\lambda)}{\varphi' \gamma},$$

$$\text{waarin } \varphi' = \varphi \frac{I_{q0}}{I_q} \text{ (zie blz. 52),} \quad (7)$$

$$\text{zoodat } \beta_\lambda = \frac{W(\lambda)}{\varphi \gamma} \times \frac{I_q}{I_{q0}} \quad (11)$$

Hierin is φ het rendement van de photochemische reactie,

$\frac{I_q}{I_{q0}}$ de verhouding van de intensiteiten van het ingestraalde licht buiten de bacteriecellen en in de bacteriecellen ter plaatse van het absorbeerend systeem,

γ een constante, welke onder aanvaarding van zekere praemissen kan worden bepaald en dan, zooals hieronder blijkt, de waarde bezit van $\frac{10^3}{N_0}$ (N_0 is het aantal moleculen per grammolecule, 6.06×10^{23}).

Wij nemen aan, dat de photogene, lichtgevoelige stof M homogeen verdeeld aanwezig is in een lichtbundel van de intensiteit J en met de golflengte λ . Wij veronderstellen voorts, dat de absorptie gering is, zoodat de procentueele verzwakking van de ingestraalde lichtbundel in de absorbeerende laag eveneens klein is.

Dan geldt volgens de definitie van de moleculaire absorptie-coëfficiënt voor de verzwakking van de lichtbundel van de intensiteit J

$$-dJ = \beta_\lambda c J dx, \quad (a)$$

waarin c de concentratie van de stof M in molen per liter voorstelt.

In deze vergelijking is nu voorts $-dJ$ het aantal per cm^2 geabsorbeerde quanten over de laagdikte dx cm, waarvoor wij overeenkomstig vergelijking (3) van bladzijde 51 ook kunnen schrijven.

$$A = \gamma \beta_\lambda J m. \quad (b)$$

m is hierin het aantal moleculen van de stof M, voorkomende in de laag met een oppervlak van 1 cm^2 en met een laagdikte dx cm, dus

$$m = \frac{c}{10^3} N_o dx. \quad (c)$$

Door substitutie van deze waarde voor m in vergelijking (b) krijgen wij

$$A = \gamma \beta_\lambda I \frac{c}{10^3} N_o dx. \quad (d)$$

Uit de vergelijkingen (a) en (d) vinden wij zodoende door gelijkstelling der rechterleden

$$\beta_\lambda c J dx = \gamma \beta_\lambda J \frac{c}{10^3} N_o dx.$$

$$\text{of} \quad \gamma = \frac{10^3}{N_o}. \quad (e)$$

Substitutie van deze voor γ berekende waarde in vergelijking (11) geeft:

$$\beta_\lambda = \frac{10^{-3}}{\varphi} \cdot N_o \cdot \frac{I_q}{I_{qo}} \cdot W(\lambda) = \frac{6.06 \times 10^{20}}{\varphi} \cdot \frac{I_q}{I_{qo}} \cdot W(\lambda). \quad (12)$$

Vergelijking (12) bevat nu nog twee onbepaalde grootheden, namelijk φ en de verhouding $\frac{I_q}{I_{qo}}$.

Een nadere berekening van β_λ is dus zonder verdere veronderstellingen, welke op genoemde grootheden betrekking hebben, niet uitvoerbaar.

In § 3 van hoofdstuk XIV zullen wij echter zien, dat op grond van de bouw van het vastgestelde inactiveringsspectrum zekere veronderstellingen zijn te maken omtrent de aard van het photochemisch omgezette molecule. Indien wij ons hierop baseeren, zijn wij in staat met eenige waarschijnlijkheid de orde van grootte van β_λ voor het meest langgolvlige maximum in het inactiveringsspectrum (ca 410 m μ) aan te geven en komen dan tot een waarde van ca 2.2×10^3 .

Hiervan uitgaande is het mogelijk nog een en ander over het quantenrendement φ op te merken.

Substitutie van de waarde $\beta_{410} = 2.2 \times 10^3$ en van de voor $W(410)$ gevonden waarde (0.85×10^{-18}) in vergelijking (12) geeft

$$2.2 \times 10^3 = \frac{6.06 \times 10^{20}}{\varphi} \cdot \frac{I_q}{I_{qo}} \times 0.85 \times 10^{-18}$$

$$\text{of} \quad \varphi = 0.23 \times \frac{I_q}{I_{qo}} \quad (13)$$

Veronderstellen wij nu eens, dat I_{qo} gelijk is aan I_q , dan volgt uit vergelijking (13) voor φ de waarde 0.23, een quantenrendement dat reeds vrij hoog is te noemen. In werkelijkheid zal nu evenwel I_{qo} zeker aanzienlijk veel kleiner zijn dan I_q .

Dit blijkt uit een in hoofdstuk VI § 1 beschreven proef van van Schouwenburg en van der Burg (107). Deze onderzoekers bepaalden de invloed van bestraling op de remming van de ademhaling van een gistsuspensie en een suspensie

van *Ph. phosphoreum* door koolmonoxyde. Bij de lichtbacteriën was de bestralings-effectiviteit hierbij veel geringer dan bij gist. Als aannemelijke verklaring hiervoor nemen zij aan, dat het licht gemakkelijker in de gistcellen dan in de veel kleinere, sterk lichtbrekende bacteriecellen binnendringt.

Indien nu $I_{q_0} < I_q$, dan zal onder de gestelde voorwaarden de voor φ berekende waarde een minimumwaarde zijn en zal dus de werkelijke waarde ervan niet onaanzienlijk hoger liggen. De reeds vrij hoge minimumwaarde van φ in aanmerking nemende, wordt men er toe gebracht te veronderstellen, dat het quantenrendement in werkelijkheid de waarde 1 zal bezitten of althans zal benaderen.

HOOFDSTUK XIV.

NADERE INTERPRETATIE VAN DE VERKREGEN RESULTATEN.

Wij zijn bij de bestralingsproeven uitgegaan van de gedachte, dat het mogelijk zou zijn door bestraling van lichtbacteriën met licht van verschillende golflengte het photochemische inactiveringsspectrum en daarmee het absorptiespectrum van een der componenten van het lichtemitterend systeem te bepalen.

Dat inderdaad bij de bestraling uiteindelijk een der componenten van het lichtemitterend systeem wordt omgezet in een verbinding, welke niet meer geschikt is om deel te nemen aan de lichtgevende reactie, volgt onmiskenbaar uit de verkregen resultaten. Een geheel andere kwestie is echter, of deze uiteindelijk omgezette component ook zelf de voor deze omzetting noodige energie in de vorm van lichtquanten heeft geabsorbeerd.

In § 2 van hoofdstuk VI wezen wij reeds terloops op de mogelijkheid, dat het gevonden absorptiespectrum een *photo-sensibilisatorspectrum* zou kunnen zijn, met andere woorden, dat weliswaar een der componenten van het lichtgevend systeem tengevolge van de bestraling wordt omgezet tot een in de lichtreactie niet meer actief product, doch dat de eigenlijke lichtabsorptie — dat wil zeggen juist die fase van het inactiveringsproces, welke ons het inactiveringsspectrum levert — door een geheel ander molecule, een sensibilisator-molecule, zou geschieden. Dit sensibilisatormolecule zou dan door botsing zijn aanslagenergie aan een der in de lichtreactie werkzame moleculen kunnen doorgeven en aldus aanleiding geven tot een photochemische reactie van de tweede soort.

Het spreekt welhaast vanzelf, dat indien zou blijken, dat het door ons langs indirecte weg bepaalde absorptiespectrum inderdaad een photo-sensibilisatorspectrum voorstelt, de gevolgde methode ons niets zou leeren omtrent de aard van een direct bij de lichtemissie betrokken molecule.

Wij zullen dus in de eerste plaats moeten trachten uit te maken, of er bij de bestudeerde verschijnselen een *directe* photo-inactivering van een molecule, werkzaam in de lichtreactie, plaats vindt, dan wel dat hier een sensibilisatorwerking in het spel is.

§ 1. Is het bestralingseffect aan een sensibilisatorwerking toe te schrijven?

Wanneer wij thans de hierboven geformuleerde vraag aan de orde stellen, is het verleidelijk in de eerste plaats ook aandacht te schenken aan de ervaringen, welke andere onderzoekers in zake de bestraling van bioluminescente systemen hebben opgedaan.

Wij herinneren er dan allereerst aan, dat H a r v e y (50) reeds in 1925 vaststelde, dat bij bestraling van een lichtend extract van *Cypridina hilgendorffii* met een voldoende sterke lichtbron de intensiteit van het door het extract uitgezonden licht afnam. Het bleek H a r v e y, dat dit photochemische effect optrad bij bestraling met golflengten in het gebied van ca 380—ca 460 m μ , doch door toevoeging van bepaalde kleurstoffen kon het systeem ook voor licht van langere golflengten worden gesensibiliseerd.

Een nadere analyse van het verschijnsel leerde, dat niet de luciferase—doch wel de luciferine-component van het luminescente systeem photo-gevoelig was en voorts, dat de photo-inactivering slechts optrad, indien gelijktijdig moleculaire zuurstof aanwezig was.

Op het eerste gezicht spreken deze uitkomsten zeer tengunste van de zienswijze, dat het bewuste effect van de bestraling moet worden toegeschreven aan een rechtstreeksche photo-oxydatie van het luciferine.

Door een recent onderzoek van C h a s e en G i e s e (17) is deze interpretatie echter weer in hoge mate onzeker geworden. Deze onderzoekers stelden namelijk vast, dat een volgens A n d e r s o n (4) gezuiverd luciferine-preparaat voor licht met een golflengte groter dan 300 m μ weinig gevoelig is. Daarentegen bleek een bestraling met de golflengten 230—280 m μ luciferine snel te inactiveren, doch dit zou, gezien de sterk destructieve werking van deze korte ultra-violetten stralen op zeer uiteenlopende organische verbindingen, een volkomen aspecifiek effect kunnen zijn. Belangrijk is intussen, dat C h a s e en G i e s e vonden, dat door toevoeging van bepaalde kleurstoffen — onderzocht werden eosine, fluoresceïne en lactoflavine — de gezuiverde luciferine-oplossing ook voor golflengten groter dan 300 m μ werd gesensibiliseerd. Voor deze photo-inactivering werd nu weer — in tegenstelling tot wat bleek te gelden voor de hierboven genoemde ontleding in het verre ultra-violet — vastgesteld, dat zij afhankelijk was van de aanwezigheid van moleculaire zuurstof. Het is begrijpelijk, dat C h a s e en G i e s e in deze laatste waarnemingen de verklaring meenen te vinden voor het door H a r v e y aan de onzuivere luciferine-oplossing vastgestelde bestralingseffect. Het door dezen gebruikte extract zou dus een sensibilisator hebben bevat, welke werkzaam is bij de photo-oxydatie van het luciferine en C h a s e (16) wijst terecht op de mogelijkheid, dat dit lactoflavine zou kunnen zijn geweest.

Wanneer wij het voorafgaande overzien, dan krijgt de hypothese, dat wij bij het door ons bestudeerde bestralingseffect eveneens met een sensibilisatorwerking te doen hebben, een zekere mate van waarschijnlijkheid.

De vraag is dan evenwel, welke stof in de levende bacteriecel als sensibilisator heeft gefungeerd.

Aangezien uit quantitatieve bepalingen van R o t t i e r (102) is gebleken, dat *Ph. phosphoreum* relatief veel lactoflavine bevat, zou men zich, in aanmerking nemende de door C h a s e en G i e s e geconstateerde sensibiliserende invloed van lactoflavine op de photo-inactivering van *Cypridina*-luciferine, zeer goed kunnen voorstellen, dat lactoflavine ook in *Ph. phosphoreum* de photo-inactivering van het bacterie-luciferine sensibiliseert. In dit geval

evenwel zou het gevonden inactiveringsspectrum identiek moeten zijn met het absorptiespectrum van lactoflavine. Een vergelijking echter van het inactiveringsspectrum met het op pag. 40 weergegeven absorptiespectrum van lactoflavine-tetraacetaat (dat gelijk is aan dat van lactoflavine) leert intuschen, dat hier van identiteit geen sprake is. Men bedenke slechts, dat het meest langgolvige absorptiemaximum van lactoflavine bij $447\text{ m}\mu$ ligt, terwijl bij deze golflengte de photochemische werking op *Ph. phosphoreum* nog slechts gering is. Bovendien vinden wij een werkingsmaximum bij ca $410\text{ m}\mu$, waar het lactoflavinespectrum juist een minimum bezit. Deze afwijkingen zijn niet toe te schrijven aan een verschuiving van het absorptiespectrum van lactoflavine, zooals deze bijv. optreedt bij binding van dit molecuul aan een eiwit, daar in dergelijke gevallen steeds een verschuiving naar grotere golflengten plaats vindt. Geheel afgezien van deze overweging moet voorts worden geconstateerd, dat de algemeene bouw van het inactiveringsspectrum zeer merkbaar van die van het lactoflavinespectrum afwijkt.

In tweede instantie komt men er toe de mogelijkheid in beschouwing te nemen, dat een vertegenwoordiger van een geheel andere groep van stoffen, waarvoor sensibilisatorwerking *in vivo* reeds eenige malen is geconstateerd, ook voor het bij de lichtbacteriën waargenomen effect verantwoordelijk zou kunnen zijn. In hoofdstuk VI maakten wij er reeds melding van, dat B ü n n i n g (13) aantoonde, dat de phototropische gevoeligheidscurve van de sporangiëndragers van *Pilobolus* identiek was met de absorptiekromme van een in deze sporangiëndragers voorkomend carotinoïde, een resultaat, dat onmiskenbaar wijst op een sensibilisatorwerking van dit carotinoïde.

Het lijkt dus loonend de vraag onder de oogen te zien, of ook bij het bestralingseffect op de lichtbacteriën niet één carotinoïde als sensibilisator werkzaam zou kunnen zijn. In dit verband is nu het volgende op te merken.

Van de carotinoïden met 40 C-atomen absorbeert het flavoxanthine ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_3$) het meest kortgolvig; in aethanolische oplossing bezit het absorptiemaxima bij 448 en $421\text{ m}\mu$ (K u h n en B r o c k m a n n (79)). Deze maxima liggen nog aanmerkelijk meer naar de zijde van de lange golflengten dan het in het zichtbare spectraalgebied gelegen maximum in het werkingsspectrum van *Ph. phosphoreum* (ca $410\text{ m}\mu$).

Van de carotinoïden met minder C-atomen bezitten — afgezien van het vitamine A, dat tengevolge van de geringe lengte van het chromophore systeem eerst bij $328\text{ m}\mu$ een absorptiemaximum vertoont — crocetine en azafrine, ieder met zeven geconjugeerde dubbele bindingen, het eenvoudigste chromophore systeem. De absorptiemaxima van crocetine en azafrine zijn bepaald door K u h n, W i n t e r s t e i n en R o t h (87). Zij vonden voor crocetine ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$) absorptiemaxima bij 463 en $435.5\text{ m}\mu$ en voor azafrine ($\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$) bij 458 en $428\text{ m}\mu$. Crocetine en azafrine absorbeeren dus eveneens te langgolvig om als sensibilisator verantwoordelijk te kunnen worden gesteld voor het in het zichtbare spectraalgebied gelegen maximum in het photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum*. Aangezien dus geen der thans bekende carotinoïden een absorptiespectrum bezit, dat met het wer-

kingsspectrum overeenstemt, zou men gedwongen zijn als sensibilisator een carotinoïde, eenvoudiger van bouw dan de tot dusverre bekende, te postuleeren, indien men de hypothese, dat bij de bestudeerde photo-inactivering een carotinoïde als sensibilisator medewerkt, zou willen handhaven. Voor de aanwezigheid van een dergelijk carotinoïde in *Ph. phosphoreum* ontbreekt intusschen iedere aanwijzing.

Bovendien is te bedenken, dat ook de algemeene bouw van de bekende carotinoïdenspectra zeer merkbaar afwijkt van die van het inactiverings-spectrum; de eerstgenoemde stoffen toch missen alle de zoo geprononceerde absorptie in het golflengtegebied $< 300 \text{ m}\mu$.

Dit alles in aanmerking nemende, mogen wij concludeeren, dat ook de medewerking van een carotinoïde als sensibilisator bij de photo-inactivering van het lichtgevend systeem in *Ph. phosphoreum* uitermate onwaarschijnlijk is.

Hoewel dus uit het voorafgaande volgt, dat een eventueel bij het bestralingseffect werkzame photo-sensibilisator niet behoort tot de tot dusver in de physiologie als zoodanig aangetroffen klassen van verbindingen, blijft uiteraard de mogelijkheid bestaan, dat hier een verbinding van geheel andere aard sensibilisatorwerking uitoefent.

De vraag is dus, of er overwegingen van algemeene aard zijn, welke tegen deze zienswijze pleiten. Het komt ons nu voor, dat dit inderdaad het geval is.

In hoofdstuk VII definieerden wij de photochemische werking als

$$W = \ln \frac{Y_0}{Y},$$

waarin Y_0 en Y de intensiteiten van het door de bacteriën uitgezonden licht, resp. vóór en na de bestraling, voorstellen. Deze formule was gebaseerd op de veronderstelling, dat de genoemde lichtintensiteiten evenredig zouden zijn met de hoeveelheden m_0 en m van een stof M , welke nauw betrokken is bij de licht-emissie en welke door de bestraling photochemisch wordt ontleed.

Wij leidden nu voorts af, dat in dit geval de als boven gedefinieerde photochemische werking evenredig moest zijn met de quantenintensiteit van het ingestraalde licht en met de bestralingstijd (wet van Bunsen-Roscoe).

Het feit, dat wij blijkens het in hoofdstuk X § 2 medegedeelde de betrekking:

$$W = \alpha I_a \times t$$

inderdaad — zij het ook binnen zekere grenzen — experimenteel bevestigd hebben gevonden, mag als een sterke steun worden beschouwd voor de juistheid van de koppeling van $\frac{Y_0}{Y}$ aan $\frac{m_0}{m}$.

Maar tevens spreekt dit resultaat tengunste van de opvatting, dat slechts één bepaalde stof, welke bij het lichtgevend proces der lichtbacteriën is betrokken, door de bestraling rechtstreeks photochemisch wordt ontleed. Indien toch bij het bestralingseffect een sensibilisatorwerking in het spel zou zijn, zou de vastgestelde evenredigheid geenszins altijd behoeven op te treden. Het zal namelijk duidelijk zijn, dat in dit geval de bedoelde betrekking alleen van

kracht zal kunnen zijn, indien aan zekere voorwaarden betreffende de wijze van voorkomen en de concentraties van sensibilisator en van de bij de licht-emissie betrokken photo-gevoelige stof is voldaan. Wanneer men hierbij dan nog beseft, dat het waargenomen effect zich afspeelt in de intacte bacteriecel, d.w.z. in een geprononceerd micro-heterogeen systeem, dan lijkt de waarschijnlijkheid hiervan niet groot. Dit klemmt temeer, omdat men aan de uitdooving van de lichtemissie der lichtbacteriën bezwaarlijk een physiologische beteekenis kan toekennen, zooals bijv. wel geldt voor de phototropische reactie van de sporangiëndragers van *Pilobolus*, waarbij het alleszins aanvaardbaar is, dat in de betreffende cellen een speciaal perceptie-apparaat is ontwikkeld. Indien men in het geval van de lichtbacteriën tot een sensibilisator-werking zou willen besluiten, dan ligt het veel meer voor de hand het waargenomen effect als een toevalseffect te beschouwen. Tegen deze voorstelling pleit dan intusschen weer de overweging, dat wij het bestralingseffect niet alleen bij *Ph. phosphoreum*, maar ook bij *Ph. Fischeri* en *Ph. splendidum* hebben vastgesteld. Juist de groote overeenstemming in de werkingsspectra bij deze drie tot zeer uiteenlopende natuurlijke groepen behorende soorten maakt het in hooge mate onwaarschijnlijk, dat men in al deze gevallen met een „toevals”-sensibilisator te maken zou hebben.

Begrijpelijk wordt daarentegen het algemeene voorkomen van het bestralingseffect bij alle bioluminescente systemen, wanneer men één der rechtstreeks bij de lichtemissie betrokken verbindingen als photochemisch gevoelige stof aanvaardt en in de volgende paragraaf zullen wij dan ook nog eenige verdere argumenten aanvoeren, welke tengunste van deze zienswijze spreken.

§ 2. Discussie, leidende tot een nadere karakteriseering van het photo-gevoelige gevoelige molecule.

Tentijde dat wij de in de vorige paragraaf behandelde vraag overwogen, deed zich nu juist een nieuw moment gelden, dat voor onze uiteindelijke instelling ten opzichte daarvan van veel belang is geweest. Door zorgvuldige onderzoekingen van Mej. A. van der Burg, welke binnenkort uitvoerig elders zullen worden gepubliceerd, is komen vast te staan, dat, in afwijking van de oudere waarnemingen van Eymers en van Schouwenburg (28), er een weliswaar gering, doch anderzijds onmiskenbaar verschil bestaat tusschen de spectra van het respectievelijk door *Ph. phosphoreum* en door *Ph. splendidum* geëmitteerde licht. Het is namelijk gebleken, dat het emissiespectrum van eerstgenoemde bacteriesoort naar de zijde van de korte golflengten veel steiler afloopt en zich dus minder ver uitstrekt in het violette spectraalgebied. Nu hebben wij in hoofdstuk XII er op gewezen, dat voor de inactiveringspectra van beide genoemde bacteriesoorten juist geldt, dat het spectrum van *Ph. phosphoreum* zich verder uitstrekt naar de zijde van het rood. Zonder hier verder in te gaan op de theoretische samenhang van emissie- en absorptiespectrum van eenzelfde molecule — hierop zal door Mej. van der Burg later nog worden teruggekomen — moet worden geconstateerd, dat in de inactiveringsspectra van *Ph. phosphoreum* en *Ph. splendidum* analoge verschillen

optreden als in de respectievelijke emissiespectra. Dit nu is alleen denkbaar, indien de stof, waarvoor wij langs indirecte weg het absorptiespectrum hebben bepaald, hetzij identiek is met, hetzij nauw verwant is aan de verbinding, welke voor de lichtemissie in de bacteriën verantwoordelijk is.

Nu hebben wij in hoofdstuk III § 3 argumenten gegeven, welke ons deden besluiten, dat het licht door het complex $A.L_1^*$, wordt geëmitteerd, met dien verstande, dat het molecule L_1 — het volgens *Anderson* in de lichtreactie irreversibel geoxydeerde luciferine — de aard van het geëmitteerde spectrum in eerste instantie bepaalt.

Tegen de gelijkstelling van het bij de bestralingsinactivering photo-gevoelige molecule en L_1 pleit nu evenwel het door *Anderson* aangetoonde feit, dat het product der irreversibele, lichtgevende oxydatie van het luciferine voor de verdere lichtreactie verloren is, een gezichtspunt, dat door de eveneens reeds geciteerde recente onderzoeken van *Chakravorty* en *Ballentine* wel buiten twijfel is gesteld. Dit geldt niet alleen voor het vrijgekomen L_1 , maar uiteraard ook reeds voor het L_1 , zooals dit primair in zijn complexe verbinding met *A* optreedt, aangezien toch de irreversibele oxydatie, welke de energie levert voor het ontstaan van de aangeslagen toestand, ook hier al heeft plaats gevonden.

Het voorafgaande in aanmerking nemende, moeten wij wel besluiten, dat de als bestralingseffect optredende photo-inactivering aangrijpt bij een verbinding, welke aan de vorming van L_1 voorafgaat en nochtans met deze verbinding wat betreft de chemische bouw in belangrijke mate overeenstemt.

In dit opzicht bestaat er dus aanleiding om aandacht te schenken zoowel aan het luciferine LH_2 als aan de moederstof daarvan, het dehydro-luciferine *L*.

Men zou nu geneigd kunnen zijn op grond van de in § 1 genoemde ervaringen van *Harvey* (50) aangaande de photochemische gevoeligheid van het *Cypridina*-luciferine te besluiten, dat ook bij onze bestralingsproeven het in de bacteriën aanwezige luciferine de photo-gevoelige component van het lichtemitterend systeem is.

Wij zagen evenwel reeds in de voorafgaande paragraaf, dat de recente onderzoeken van *Chase* en *Giese* (17) het zeer onwaarschijnlijk maken, dat het *Cypridina*-luciferine in het zichtbare deel van het spectrum rechtstreeks photo-gevoelig zou zijn. De ook bij afwezigheid van moleculaire zuurstof verlopende destructie in het korte ultra-violet kan toch in het beschouwde verband buiten beschouwing blijven, terwijl de wel aan de aanwezigheid van zuurstof gebonden ontleding door bestraling met golflengten langer dan $300 m\mu$ alleen optreedt bij aanwezigheid van een sensibilisator.

Hiernaast pleiten ook overwegingen van gansch andere aard tegen de aanwijzing van bacterie-luciferine als het photochemisch gevoelige molecule.

In hoofdstuk III § 2 vermeldde wij, dat uit proefnemingen van *Johnson* moet worden besloten, dat in lichtbacteriën in aerobe toestand naast luciferine LH_2 ook dehydro-luciferine *L* voorkomt. *Johnson*, van *Schouwenburg* en van der *Burg* (68) bewezen door middel van „flash” proeven, dat de nalevering van LH_2 uit *L* door het hydrogeneerend

systeem der bacteriën zeer snel geschiedt, door aan te toonen, dat een anaerobiose van enkele tientallen seconden voldoende is om het luciferase-oppervlak volledig met LH_2 te bezetten. Anderzijds toonden wij in hoofdstuk XI § 1 aan, dat na afloop der bestraling eerst na verloop van enkele uren de lichtintensiteiten van de bestraalde en de onbestraalde bacteriën weer aan elkaar gelijk zijn geworden. Zouden wij nu als gevolg van de bestraling evenals bij de bestraling van *Cypridina*-extracten photochemische oxydatie van het LH_2 aannemen, dan stuiten wij op de moeilijk te beantwoorden vraag, waarom in beide genoemde gevallen de nalevering van het LH_2 met zoo sterk uiteenlopende snelheden geschiedt.

Op grond van deze overwegingen komen wij er dus veeleer toe de photochemische omzetting van het dehydro-luciferine voor het optreden van het bestralingseffect verantwoordelijk te stellen.

Hoewel wij eerst in de volgende paragraaf nader op de kwestie van de mogelijke chemische structuur van luciferine en dehydro-luciferine zullen ingaan, willen wij er reeds hier de aandacht op vestigen, dat op grond van het reeds eerder genoemde onderzoek van Chakravorty en Ballentine (14) voor het *Cypridina*-dehydro-luciferine een chinon-structuur zeer waarschijnlijk moet worden geacht (zie § 2 van hoofdstuk II). Een belangrijke steun voor de juistheid van de gemaakte keuze inzake het photo-gevoelige molecule is nu, dat alle chinonen in meerdere of mindere mate photo-gevoelig zijn.

Het bovenstaande doet ons dus onder zeker voorbehoud besluiten, *dat bij de bestraling van lichtbacteriën het dehydro-luciferine L photochemisch wordt omgezet en dat dientengevolge het absorptiespectrum, dat wij langs indirecte weg hebben bepaald, het absorptiespectrum voorstelt van het in Ph. phosphoreum aanwezige dehydro-luciferine.*

Wij willen hier thans nog even terugkomen op de kwestie van het verloop der herstelreactie, waarvoor wij in hoofdstuk XI § 2 twee mogelijkheden hadden opgeworpen. In de hierboven ontwikkelde gedachtengang zouden wij dus moeten kiezen tusschen:

- 1e nalevering van het door de photochemische omzetting verbruikte dehydro-luciferine door synthetische werkzaamheid van de bacteriecel,
- 2e terugvorming van het dehydro-luciferine uit het photochemisch omzettingsproduct.

Johnson (67) toonde aan (zie hoofdstuk III § 2), dat in een suspensie van lichtbacteriën in een slechts koolhydraten bevattend medium geen groei van beteekenis plaats heeft. Een dergelijke suspensie bevat volgens hem een beperkte hoeveelheid luciferine en dehydro-luciferine, die in de lichtreactie langzaam irreversibel wordt verbruikt. In hoofdstuk IX § 2 bewezen wij, dat na verloop van een incubatietijd van circa 18 uren de dikte van de bacterie-laag van de gelatinecultures, welke voor de bestralingsproeven werden gebruikt, niet meer toeneemt en dat dus ook hier geen verdere groei der bacteriën meer plaats vindt. Aangezien wij de bacteriën nimmer gebruikten vóór het intreden van de groeistilstand, moeten wij aannemen, dat ook in het door

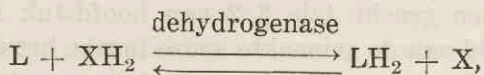
ons gebruikte bacteriemateriaal een beperkte hoeveelheid luciferine en dehydro-luciferine aanwezig is, welke niet meer door synthese wordt aangevuld.

Dit in aanmerking nemende, zou de herstelreactie moeten worden gezien als de langzame, uiteraard mono-moleculaire, terugvorming van dehydro-luciferine uit zijn photochemisch omzettingsproduct.

Samenvattend zou het bestudeerde bestralingseffect op *Ph. phosphoreum* dus neerkomen op een reversibele photochemische omzetting van het daarin aanwezige dehydro-luciferine.

Tenslotte willen wij nog even stil staan bij de vraag, hoe de door ons in hoofdstuk XI § 4 aangetoonde onmisbaarheid van moleculaire zuurstof voor de totstandkoming van het bestralingseffect is te verklaren. Wij moesten daar ter plaatse in het midden laten, of de photo-inactivering op een photo-oxydatie zou berusten, dan wel dat de aanwezigheid van zuurstof slechts onmisbaar was voor de vorming van het photo-gevoelige molecule.

Wij herinneren er dan in de eerste plaats aan, dat Johnson, van Schouwenburg en van der Burg voor de vorming van het bacterie-luciferine de reactievergelijking



waarin XH_2 een waterstofdonator voorstelt, opstelden.

Van Schouwenburg besloot voorts uit zijn proefnemingen, dat slechts een gering gedeelte van het op ieder moment in lichtbacteriën aanwezige luciferine in de eigenlijke lichtreactie wordt verbruikt en dat het grootste deel van het luciferine reversibel door moleculaire zuurstof „donker” wordt ge-oxydeerd. Het is duidelijk, dat bij deze reversibele oxydatie de door Johnson met L aangeduide stof, het dehydro-luciferine, wordt teruggevormd. Wij moeten aannemen, dat in aerobe toestand in lichtbacteriën luciferine en dehydro-luciferine beide aanwezig zijn. In anaerobe toestand daarentegen geraakt de geheele bacteriecel in sterk gereduceerde toestand en zal het bovenstaande evenwicht dus vrijwel volledig naar rechts zijn verschoven. In anaerobe toestand treffen wij dus slechts luciferine in de bacteriecel aan, in aerobe toestand bovendien nog dehydro-luciferine.

In de gedachtengang, dat dehydro-luciferine het bij de bestraling van lichtbacteriën photochemisch omgezette molecule is, ligt het dus voor de hand te besluiten, dat de aanwezigheid van moleculaire zuurstof noodzakelijk is voor het optreden van de photo-inactivering, omdat alleen dan het photo-gevoelige dehydro-luciferine in belangrijke hoeveelheid in de cel voorkomt.

§ 3. Hypothese aangaande de chemische structuur van dehydro-luciferine en van luciferine.

Nadat wij ons hebben uitgesproken voor de zienswijze, dat bij bestraling van *Ph. phosphoreum* het daarin aanwezige dehydro-luciferine photochemisch wordt omgezet en dat het gevonden photochemische inactiveringsspectrum

dus tevens het absorptiespectrum voorstelt van dit dehydro-luciferine, is het verleidelijk thans na te gaan, in hoeverre hieraan gevolgtrekkingen zijn te verbinden aangaande de chemische structuur van dehydro-luciferine en van luciferine.

Deze gevolgtrekkingen zullen noodzakelijkerwijze een speculatief karakter dragen, aangezien ons huidige inzicht in het verband tusschen absorptiespectrum en chemische constitutie nog zeer gebrekkig is.

Men geeft zich reeds geruime tijd veel moeite wetmatigheden te vinden in het verband tusschen absorptiespectrum en chemische constitutie en ofschoon de beschikbare hoeveelheid feitenmateriaal overstelpend groot mag worden genoemd, is men nog zeer ver verwijderd van de mogelijkheid, uit een gegeven absorptiespectrum deductief tot de chemische structuur van het daarbij behorende molecule te besluiten, of omgekeerd, het bij een bepaalde structuurformule behorende absorptiespectrum aan te geven¹⁾.

Het meeste succes hebben nog die onderzoekingen gehad, welke zich bezig hielden met de ligging van de meest langgolvige absorptieband (de zoogenaamde eindabsorptie), in afhankelijkheid van de uitgebreidheid van het chromophore systeem.

Welhaast klassiek in dit opzicht zijn de onderzoekingen van Kuhn en zijn medewerkers (60) over de lichtabsorptie van de ω , ω' -diphenylpolyenen, waarbij onder meer bleek, dat met toenemende lengte van het systeem van geconjugeerde dubbele bindingen een volkomen regelmatige verschuiving van de eindabsorptie naar de zijde van het rood plaats vindt.

Is men over het geheel genomen nog niet in staat de chemische structuur uit het absorptiespectrum af te leiden, wel bezit men reeds geruime tijd het inzicht, dat het absorptiespectrum in hooge mate kenmerkend is voor de moleculaire structuur, of juister gezegd, voor de structuur van het in het absorbeerend molecule aanwezige chromophore systeem. In het algemeen mag men aannemen, dat in bouw overeenstemmende absorptiespectra wijzen op de aanwezigheid van overeenkomstige chromophore systemen in de absorbeerende moleculen en voorts, dat de door substituties veroorzaakte verschuivingen volkomen wetmatig zijn. In de erkenning hiervan ligt nu de mogelijkheid van het min of meer empirisch gebruik, dat men met zooveel succes in het organisch-chemisch structuuronderzoek van de absorptiespectra heeft gemaakt. Wij behoeven slechts te herinneren aan het uiterst moeizame onderzoek naar de structuur van vitamine B₁ door Williams en zijn medewerkers (119), waarbij de structuur van één der splitsingsproducten mede kon worden opgehelderd door een vergelijkend spectraalonderzoek van verschillend gesubstitueerde pyrimidine-derivaten.

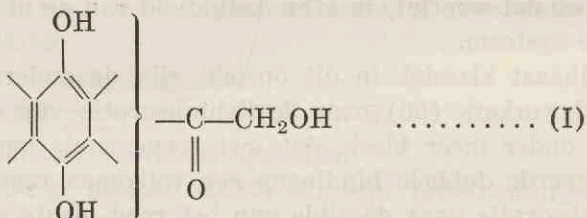
Dat wij ondanks de onzekerheid, welke thans nog aan de interpretatie van

1) In een recent overzicht vat Dimroth (18) de ervaringen betreffende het verband tusschen absorptiespectrum en chemische constitutie samen, waarbij hij zich evenwel beperkt tot verbindingen, welke slechts koolstof en waterstof of koolstof, waterstof en zuurstof bevatten.

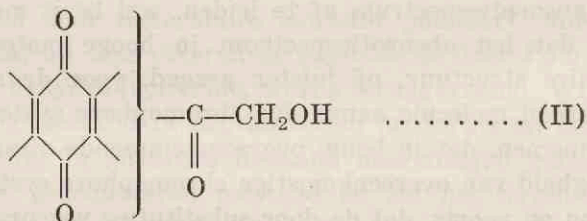
een absorptiespectrum kleeft, een poging hebben gedaan uit het photochemische inactiveringsspectrum een mogelijk structuurbeeld voor het bacterie-dehydro-luciferine af te leiden, vindt zijn redenen in de volgende overwegingen:

- 1e door het onderzoek van Anderson (5) en van Chakravorly en Ballentine (14) heeft men een goed gefundeerd inzicht verkregen in de structuur van enkele functionele groepen, welke in het molecule van *Cypridina*-luciferine voorkomen (zie § 2 van hoofdstuk II);
- 2e in de litteratuur vonden wij spectra beschreven, die, zij het ook allerm minst in detail, dan toch in algemeene bouw overeenkomst vertoonen met het photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum*¹⁾.

In hoofdstuk II § 2 is uiteengezet, hoe op grond van het tot dusverre verrichte onderzoek de volgende partieele en schematische structuurformule voor *Cypridina*-luciferine (I) door Harvey en zijn medewerkers kon worden opgesteld:



Voor het dehydro-luciferine volgt hieruit de partieele structuurformule (II):



Wij moeten hierbij echter opmerken, dat de door Chakravorly en Ballentine aangegeven parastand der OH-groepen in hun schematische formule voor *Cypridina*-luciferine niet berust op eenige experimenteele aanwijzing. Anderson, die het voorkomen van een polyphenolstructuur in het luciferine-molecule waarschijnlijk maakte, schreef slechts²⁾: „It is scarcely necessary to mention explicitly that the luciferin system has an oxidation-reduction potential but slightly below the range of naturally occurring polyhydroxy benzene derivatives. In view of some other characteristics the possi-

1) Wellicht ten overvloede wijzen wij er op, dat wij zeker met het bestaan van geringe verschillen tusschen *Cypridina*- en bacterie-luciferine rekening moeten houden, doch dat wij ons voorstellen, dat beide verbindingen tot één en dezelfde groep van stoffen behooren.

2) l.c. blz. 274.

„bility of this grouping being present as a part of the luciferin molecule must be kept in mind". Over de stand der OH-groepen wordt hier dus niets opgemerkt.

Bij beschouwing van het photochemische inactiveringspectrum van *Ph. phosphoreum* trof het ons, dat de algemeene bouw hiervan overeenkomst vertoont met de door Radulescu en zijn medewerkers (97, 98) vastgestelde absorptiespectra van naphthaline, anthraceen en naphthaceen. Een vergelijking tusschen de genoemde spectra enerzijds en het inactiveringspectrum anderzijds leert, dat beide aan de zijde der langere golflengten een breed maximum bezitten en een hoger, smal maximum meer naar de zijde van het ultra-violet. Een dergelijk steil verlopend maximum in het ultra-violet is veelal karakteristiek voor een systeem van gecondenseerde aromatische ringen (vgl. ook Dimroth (18)).

Weliswaar bezitten, in tegenstelling met die van het werkingsspectrum, de langgolvige absorptiebanden van naphthaline, anthraceen en naphthaceen een uitgesproken fijnstructuur, doch het is bekend, dat de fijnstructuur, die kenmerkend is voor eenvoudige, symmetrisch gebouwde moleculen, verloren gaat bij invoering van substituenten, welke een verandering van het chromophore systeem veroorzaken.

Uitbreiding van het chromophore systeem leidt, behalve tot een „versmering" van de fijnstructuur, ook tot een verschuiving van het geheele spectrum naar de zijde van de langere golflengten. De grootte van deze verschuiving behoeft echter voor de afzonderlijke absorptiebanden niet even groot te zijn.

Het werkingsspectrum vertoont dus een algemeene bouw, welke kenmerkend mag worden genoemd voor een systeem van eenige gecondenseerde aromatische ringen.

Echter moet, zooals wij zagen, op grond van de ervaringen van Chakravorty en Ballentine, het voorkomen van een chinon-structuur in het dehydro-luciferine molecule eveneens worden aangenomen. Het is nu ongetwijfeld hoogst belangrijk, dat aan de hand van absorptiespectra van verschillend gesubstitueerde 1,4-naphtochinonen blijkt, dat bij overgang van naphthaline naar derivaten van 1,4-naphtochinon het algemeene karakter van het absorptiespectrum, afgezien van een aanzienlijke verschuiving naar de zijde van de langere golflengten, grootendeels behouden blijft.

Als voorbeeld toonen wij in figuur 33 het door Fieser, Campbell en Fry (30) bepaalde absorptiespectrum van 6,7-dimethyl-2,3-diallyl-1,4-naphtochinon. De bouw van dit spectrum komt nu in wezen overeen met die van het door ons bepaalde photo-inactiveringspectrum van *Ph. phosphoreum*. In figuur 34 is dit inactiveringspectrum eveneens weergegeven, waarbij wij er op wijzen, dat, in tegenstelling met in figuur 28 (zie blz. 109) de specifieke photochemische werking $W(\lambda)$ thans logaritmisch is uitgezet, teneinde een directe vergelijking met het in figuur 33 geteekende absorptiespectrum van 6,7-dimethyl-2,3-diallyl-1,4-naphtochinon mogelijk te maken.

In aansluiting hierop merken wij op, dat de absorptiespectra der overeenkomstige 1,2-naphtochinonen in bouw van die der 1,4-naphtochinonen aanzien-

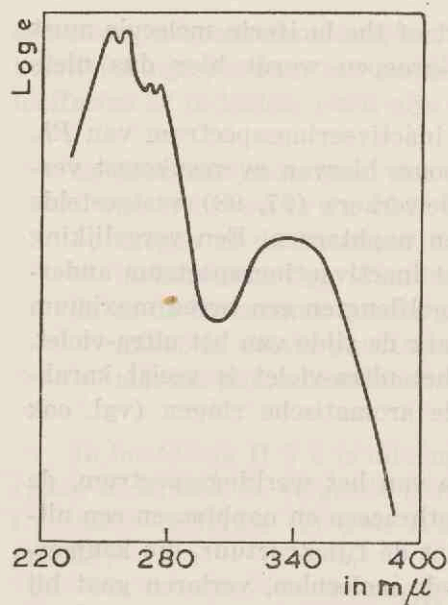


Fig. 33.

Absorptiespectrum van 6,7-dimethyl-2,3-diallyl-1,4-naphtochinon in hexaan (volgens Fieser et al. (30)).

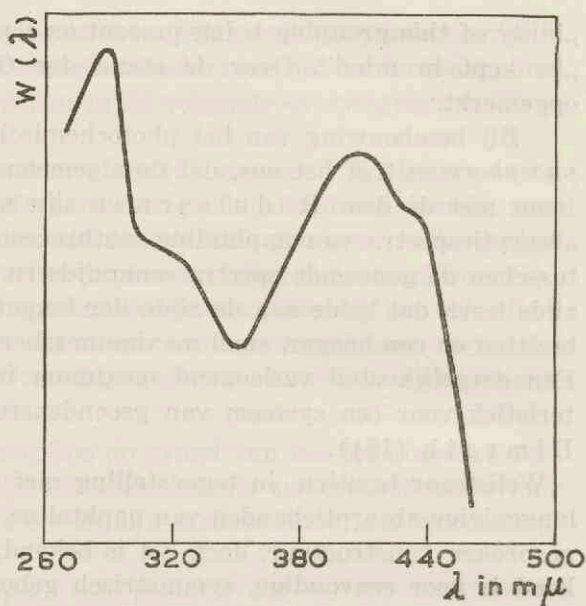
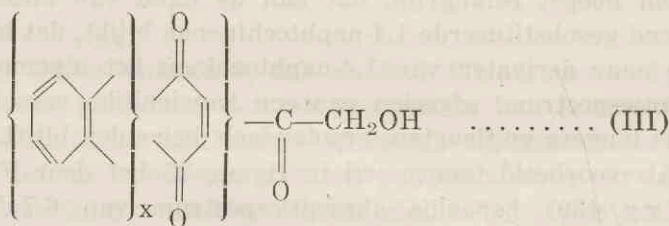


Fig. 34.

Het logarithmisch uitgezette photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum*.

lijk afwijken en geen overeenstemming vertoonen met het inactiveringsspectrum.

Op grond van deze overwegingen lijkt het waarschijnlijk, dat ook in dehydro-luciferine de CO-groepen in de chinonring in 1,4-positie zijn geplaatst. Het bovenstaande leidt ons tot de volgende uitbreiding (III) van de schematische formule van Chakravorly en Ballentine:



Hierin is x één, of hoogstens twee; het geval, dat x de waarde drie of hoger heeft, kunnen wij uitsluiten op grond van het feit, dat het absorptiespectrum van de koolwaterstof naphthaceen, met vier gecondenseerde benzolringen, reeds verder naar de zijde van het rood is gelegen dan het werkingspectrum (97); eerst recht zal dit dus het geval zijn bij het daarvan afgeleide 1,4-naphthaceenchinon.

Ongetwijfeld zouden wij direct tusschen de mogelijkheden: gesubstitueerd 1,4-naphtochinon of gesubstitueerd 1,4-antrachinon kunnen beslissen, indien wij

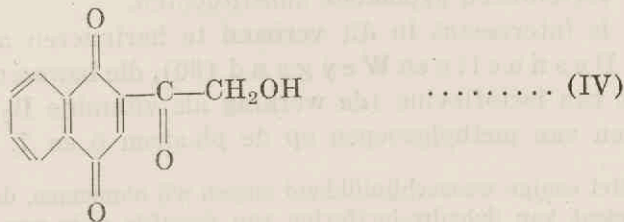
de beschikking hadden over de vergelijkingsspectra van de ongesubstitueerde of slechts door verzadigde groepen gesubstitueerde verbindingen. Van het 1,4-anthrachinon zijn zulke spectra echter niet bekend. Toch kunnen wij met behulp van de volgende indirecte redeneering met eenige waarschijnlijkheid een beslissing treffen.

De eindabsorpties van naphthaline en anthraceen bedragen respectievelijk 287 en 379 $m\mu$ (98). De eindabsorptie van 2,3-dimethyl-1,4-naphthochinon is gelegen bij 330 $m\mu$ (30), dus circa 43 $m\mu$ langgolviiger dan die van naphthaline. Nemen wij nu aan, dat bij de overgang van anthraceen in 1,4-anthrachinon een verschuiving naar het rood van ongeveer dezelfde grootte plaats vindt — een veronderstelling, die gezien de zeer groote overeenkomst in chemische eigenschappen tusschen 1,4-naphthochinonen en 1,4-anthrachinonen (29) zeker toelaatbaar is — dan komen wij voor het 1,4-anthrachinon op een eindabsorptie bij ca 422 $m\mu$. Dit zou dan de eindabsorptie zijn van de ongesubstitueerde, of slechts door verzadigde resten gesubstitueerde verbinding. Bij invoering van de groep $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ zou de eindabsorptie ongetwijfeld nog meer naar de zijde van het rood verschuiven. Volgens deze redeneering zou de meest langgolvige absorptieband van het beschouwde 1,4-anthrachinonderivaat aanmerkelijk verder naar het rood zijn gelegen dan het overeenkomstige maximum in het werkingsspectrum, hetgeen de 1,4-anthrachinonstructuur in hooge mate onwaarschijnlijk maakt.

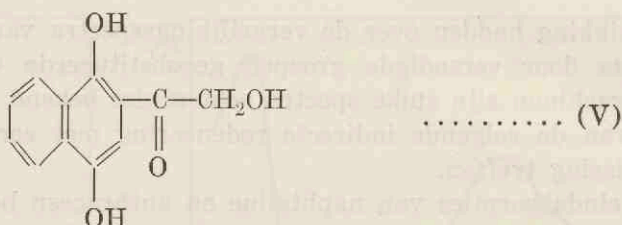
Op grond van bovenstaande uiteenzetting meenen wij dus een 1,4-naphthochinonstructuur voor het dehydro-luciferine als de meest waarschijnlijke te mogen beschouwen.

Om de betrekkelijk langgolvige absorptie te kunnen verklaren — 1,4-naphthochinonen met verzadigde zijketens of met dubbele bindingen in β,γ -positie aan de chinonring hebben een eindabsorptie tusschen 330 en 340 $m\mu$ (30) — zouden wij tevens moeten aannemen, dat de groep $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ in de chinonring is gesubstitueerd. Uit onderzoekingen van Hooker (63) is namelijk bekend, dat, in tegenstelling tot de invoering van een dubbele binding in de β,γ -positie, invoering van een α,β -standige dubbele binding in de chinonring van de 1,4-naphthochinonen een aanzienlijke kleurverdieping bewerkt. Hetzelfde mogen wij *mutatis mutandis* aannemen voor de carbonylgroep.

Dit alles in aanmerking genomen, zouden wij dus het volgende structuurbeeld voor het bacterie-dehydro-luciferine willen poneeren (IV):



en voor het bacterie-luciferine (V):



Het is duidelijk, dat wij, door dehydro-luciferine op te vatten als een derivaat van 1,4-naphtochinon, het plaatsen in de klasse der physiologisch belangrijke vitamine K-derivaten, waarvan bekend is, dat zij door de meest uiteenlopende organismen kunnen worden gesynthetiseerd ¹⁾.

De opvatting van dehydro-luciferine als een stof, welke verwant zou zijn met de vitaminen K, maakt eveneens, afgezien van de overige overwegingen, plaatsing van de $\text{—CO—CH}_2\text{OH}$ -groep in de chinonring waarschijnlijker dan die in de benzolring.

Er moge nog op worden gewezen, dat de formules (IV) en (V) goed schijnen overeen te stemmen met de tot dusverre bekende eigenschappen van dehydro-luciferine. Dat luciferine gemakkelijk reversibel oxydeerbaar en zelfs autoxydabel is, is voor een 1,4-naphtohydrochinon-derivaat alleszins begrijpelijk. De door Chase en Giese (17) geconstateerde ongevoeligheid van gezuiverd *Cypridina*-luciferine voor straling met golflengten grooter dan 300 m μ , kunnen wij verklaren door te beseffen, dat luciferine als 1,4-naphtohydrochinon-derivaat slechts weinig langgolfiger dan naphtaline zal absorbeeren en hoogstwaarschijnlijk boven 300 m μ geen absorptiebanden bezit. Verder is, zooals in § 2 van dit hoofdstuk reeds werd opgemerkt, de lichtgevoeligheid van het dehydro-luciferine volkomen in overeenstemming met de ervaring, dat de chinonen en met name ook de vitamine K-derivaten photo-gevoelig zijn (zie bijv. Almqvist (1)).

Wij willen er evenwel dadelijk met nadruk op wijzen, dat de aanwezigheid van nog andere groepen in dehydro-luciferine en in luciferine geenszins uitgesloten mag worden geacht. In dit opzicht zijn de formules (IV) en (V) nog zuiver schematisch. Het is dan ook geenszins te verwachten, dat een synthetisch „luciferine”, dat de in formule (V) aangegeven constitutie bezit, met een luciferase-preparaat van willekeurige herkomst licht zal geven; men moet veeleer aannemen, dat de specificiteitsverschillen tusschen luciferinen van verschillende herkomst hun oorzaak vinden in de aanwezigheid van verschillende en verschillend geplaatste substituenten.

Het is interessant in dit verband te herinneren aan het onderzoek van Kuhn, Desnuelle en Weygand (80), die bewezen, dat de physiologische activiteit van lactoflavine (de werking als vitamine B₂) is gebonden aan het voorkomen van methylgroepen op de plaatsen 6 en 7, terwijl anderzijds het

1) Met eenige waarschijnlijkheid mogen wij aannemen, dat de moleculaire absorptie-coëfficiënt van dehydro-luciferine van dezelfde orde van grootte zal zijn als die van de overige 1,4-naphtochinonen, namelijk 2.2×10^3 (zie: Fieser en zijn medewerkers (30)). Hiervan hebben wij in hoofdstuk XIII reeds gebruik gemaakt.

voor de flavinen karakteristieke absorptiespectrum wel qua ligging, doch niet qua vorm van de aan- of afwezigheid of de plaats der methylgroepen afhankelijk is.

Wij moeten de hierboven ontwikkelde formules dan ook voorloopig slechts zien als een aanknoopingspunt voor synthetisch werk. Hierbij zal dan in de eerste plaats de juistheid van de in dit hoofdstuk gegeven deducties moeten worden getoetst door na te gaan, of inderdaad de stof met de structuurformule (IV) een absorptiespectrum vertoont, dat in wezen overeenstemt met het photochemische inactiveringsspectrum van *Ph. phosphoreum*.

In tweede instantie zal men zich dan moeten afvragen, door welke substituties men tot physiologisch actieve preparaten zou kunnen komen. Hoewel het zeker verleidelijk zou zijn in deze richting eenige suggesties te doen, komt het ons niettemin voor, dat wij hiermede in dit stadium van het onderzoek slechts hypothesen van de tweede orde zouden opwerpen.

Liever dan ons hieraan te wagen, zullen wij dit dan ook aan het toekomstig onderzoek overlaten.

SUMMARY.

Chapter I. A short survey has been given of the distribution of bioluminescence in nature. Among the animals luminous forms appear in all lower classes including the fishes; in the vegetable kingdom such forms are only found amongst bacteria and fungi.

In contrast to what holds for bacteria and fungi, some animal organisms are characterized by the property that the luminous substance is excreted.

Chapter II. The investigations made so far prove that in all probability bioluminescence is in all cases due to the oxidation by molecular oxygen of a thermostable compound of low molecular weight: *luciferin*, through the intermediary of an enzyme: *luciferase*.

In those cases in which one has succeeded in separating luciferin and luciferase from different living organisms, the two compounds proved to be rather specifically adapted to each other (§ 1).

The chemical investigations of the said compounds made until now are far from being complete, it even can be said that up to now luciferase has scarcely been investigated at all.

For luciferin it has been made acceptable that its molecular structure includes two oxidation possibilities: the reversible „dark” oxidation with oxygen or other inorganic oxidizers to dehydro-luciferin is probably based on the presence of a polyphenol-grouping (A n d e r s o n), whereas in the irreversible „luminescent” oxidation with oxygen and luciferase a $\text{—CO—CH}_2\text{OH}$ -group is oxidized to a —COOH -group (C h a k r a v o r l y and B a l l e n t i n e) (§ 2).

Chapter III. The schemes for the mechanism of bioluminescence drawn up so far have been briefly discussed. The theory put forward by H a r v e y and his collaborators that luciferase should be the light emitting molecule was rejected. Arguments were given in favour of the view that on oxidation of the luciferase-luciferin complex the complex of luciferase and irreversibly oxidized luciferin primarily appears in an excited state and that it is this excited complex which is responsible for the light emission (§§ 1 and 3).

Moreover attention was drawn to the fact that many considerations support the opinion that the nature of the process of bioluminescence is the same in all luminous organisms, and that more specifically the various luciferins will all be closely related substances.

Chapter IV. As a direct chemical investigation of the phenomenon of bioluminescence depends on the possibility of studying this process *in vitro*,

we decided — notwithstanding the negative experiences of earlier investigators — to make some fresh efforts to separate the luminous system from the bacterial cell.

Action of liquid air on *Ph. phosphoreum* did produce in our experiments a cell disintegration, but no extra-cellular luminescence resulted (§ 2). Attempts to extract from strongly luminescent bacteria a substance which would be able to restore the luminous capacity of bacteria darkened by exhaustion also led to negative results (§ 3).

The possible causes for the failure of these and other attempts to obtain active preparations from luminous bacteria were discussed (§ 4).

Chapter V. The observation that light emission of luminous bacteria is bound up with a non HCN-sensitive part of the total respiration, together with some other observations bearing on the case, had made Eymers and van Schouwenburg suggest that, just as in the „dark”, non HCN-sensitive respiration processes, a flavin-enzyme might also co-operate in the light reaction.

This view was supported in some respects by the observations of Doudoroff who under special conditions succeeded in restoring the light intensity of some bacterial strains with weakened light emission by adding riboflavin to the culture medium. Doudoroff looked upon this result as an indication that riboflavin, or a derivative of it, would be directly involved in the luminescent process.

With a view to the fact that the riboflavin effect is only manifest, if a complete growth cycle is involved, and that, moreover, there exists no correlation between the luminescence of bacterial cultures and their riboflavin content, we were already inclined to reject the suggestions made by Eymers and van Schouwenburg and by Doudoroff (§ 1).

Moreover, in order to test the possibility that in bacterial luminescence some special derivative of riboflavin would take part, we isolated from *Ph. phosphoreum* a flavin in the form of its tetraacetate. As to its melting point and its absorption spectrum this compound proved to be fully identical with synthetical riboflavin-tetraacetate, a result which is also unfavourable for the riboflavin hypothesis (§ 2).

As further direct chemical investigation seemed to offer little prospect, we decided to pass to an indirect method for the identification of one of the components of the luminous system (§ 3).

Chapter VI. In the same way as Harvey had found for the luminescence of *Cypridina*-extracts van Schouwenburg and van der Burg could prove for luminous bacteria that the intensity of the emitted light is reversibly reduced by irradiation. Apparently a photochemical conversion of one of the components of the light emitting system occurs. This radiation effect proved to be clearly dependent on wave-length (§ 1).

A closer study of the radiation effect seemed, therefore, to open the possibility of determining an „inactivation spectrum” which at the same time would be the absorption spectrum of that component of the light emitting system which has absorbed the active radiation (§ 2).

Attention was drawn to a number of investigations described in literature in which absorption spectra determined according to this indirect principle proved to be identical with absorption spectra obtained by direct measurement (§ 3).

Chapter VII. The question was examined in which way the required absorption coefficient for a definite wave-length will depend on the experimentally determinable quantities, *viz.*, the intensities Y_0 and Y of the bacterial light before and after irradiation. Accepting certain premises it was found that the quantity $\ln \frac{Y_0}{Y}$ — designated by us as „photochemical effect” — will be definitive, with the restriction, however, that this quantity is proportional to the total number of quanta, that is to say to the product of the time of irradiation and the quantum intensity of the light on the spot of the absorbing system.

By calculating the photochemical action per incident quantum, we obtained a quantity, defined by us as „specific photochemical effect” which forms a direct measure for the required absorption coefficient. The curve representing the relation between the wave-length and the corresponding specific photochemical effect — the inactivation spectrum — will represent at the same time the absorption curve in a relative measure of the compound which has absorbed the photochemically active radiation.

Chapter VIII. In radiation experiments with bacterial suspensions we succeeded only for a few wave-lengths to estimate with sufficient accuracy the photochemical effect. Nevertheless these experiments were in so far of importance that they already offered us a first insight into the structure of the inactivation spectrum in the visible region.

As we did not succeed in isolating a greater number of wave-lengths with the required intensity, it proved, however, to be impossible to make a sufficient number of observations for the construction of a spectrum.

Chapter IX. In order to obtain measurements over a larger range of wave-lengths we modified our method substantially. In the first place we passed from bacterial suspensions to homogeneously grown plate cultures, whilst at the same time the irradiation by means of isolated mercury lines was replaced by irradiation with the light from a water-cooled super-high tension mercury lamp, which light on passing a spectrograph yielded a continuous spectrum. Using this method it proved possible to estimate the intensity of the bacterial light before and after irradiation for a great number of wave-lengths with the aid of the objective photographic method (§ 1).

In succession we have described: the method of cultivation of the bacteria

(§ 2), the apparatuses employed and the way in which the bacterial cultures were irradiated (§ 3), the photographic measurement of the intensity of the light emitted by the bacterial cultures before and after irradiation (§ 4), and the estimation of the spectral energy distribution in the spectrum used for the irradiation. An example was given to show how for the various wavelengths the specific photochemical effect was computed from the obtained data (§ 5).

Finally we showed in some special experiments that the scattering of the incident light by the bacterial cultures did not endanger the reliability of our results (§ 6).

Chapter X. In this chapter a description is given of the estimation of the photochemical inactivation spectrum of *Ph. phosphoreum*. For the ultra-violet region we employed a quartz spectrograph making successive experiments, in which either the irradiation intensity (§ 1) or the time of irradiation was varied (§ 2). For the visible range a glass spectrograph was used on account of its greater dispersive power (§ 3).

Within wide limits the photochemical action proved to be satisfactorily proportional to the time of radiation and to the radiation intensity, so that the Bunsen-Roscoe law appears to hold for the photochemical conversion under examination.

By summarizing and averaging all results the photochemical inactivation spectrum of *Ph. phosphoreum* was obtained (§ 4). This spectrum shows marked maxima at 405 to 410 $m\mu$ and 290 $m\mu$, a minimum at about 350 $m\mu$ and further indications for two additional maxima at about 430 and 320 $m\mu$ (see fig. 28).

Chapter XI. Hereupon the recovery of the light intensity after irradiation was studied. It appeared that those parts of the culture which were irradiated with wave-lengths from the region $< 300 m\mu$ showed a secondary effect, earlier described by Gerretsen: after an initial increase in light intensity to a value exceeding that of the adjacent non-irradiated parts of the culture, a complete extinction occurs, owing to the death of the bacteria (§ 1).

A quantitative study of the course of the recovery process showed, however, that up to about 30 minutes after the end of the irradiation this course is the same for the entire wave-length region examined, and that only after this period the above mentioned secondary effect becomes manifest.

We inferred from this that the decrease in light intensity owing to irradiation is primarily only due to the photochemical conversion of one and the same compound, and that consequently the inactivation spectrum indeed represents the absorption spectrum of one single compound. Although it was proved that the course of recovery had a monomolecular character, this result did not allow a decision regarding the nature of the recovery process (§ 2).

When deriving the formula for the photochemical action given in chapter VII we did not take into account the fact that recovery must already occur

during the irradiation period. However, a simple calculation showed that the said formula answers all practical requirements, owing to the low value of the velocity constant of the recovery process as compared with that of the photochemical conversion (§ 3).

Finally we made some experiments in order to investigate the significance of oxygen for the photochemical reaction. These experiments led to the conclusion that the presence of oxygen is essential for the occurrence of the radiation effect on the light emission of *Ph. phosphoreum*.

Chapter XII. Irradiation experiments on *Ph. splendidum* and *Ph. Fischeri* — made merely for the visible range of the spectrum — showed that the irradiation effect described for *Ph. phosphoreum* also occurs with these bacterial species. In general the inactivation spectra obtained mutually showed a great resemblance, although the spectra of the two first mentioned species extend somewhat less far into the red.

Chapter XIII. A brief consideration of the value of the quantum efficiency of the photochemical reaction occurring on the irradiation of *Ph. phosphoreum* showed that the possibility of a quantum efficiency of 1 is not to be excluded.

Chapter XIV. On discussing the question which molecule is photochemically converted when *Ph. phosphoreum* is irradiated, the possibility had first to be considered that the radiation could have been absorbed by another molecule than the finally inactivated one, or in other words that a photo-sensitizer could have been responsible for the photo-inactivation observed. It appeared that in this respect two obvious possibilities — *i.e.* the action of riboflavin or of a carotene as a photo-sensitizer — could be conclusively refuted; further considerations of a general nature made it less probable that a so far unknown sensitizer would be involved (§ 1).

Moreover, an additional argument could be brought forward in favour of the view that the observed radiation effect is due to a direct action on one of the components of the light emitting system. Various considerations led to the view that with great probability dehydro-luciferin has to be considered to be the photosensitive component.

On this basis the course of recovery and the indispensability of oxygen for the radiation effect was once more briefly discussed. Our conclusion was that oxygen will be essential for the photo-inactivation as only then a larger quantity of dehydro-luciferin is present in the cell (§ 2).

Finally we tried to answer the question whether the absorption spectrum determined by us might contribute to the development of a structural formula for dehydro-luciferin. Taking into account the results obtained by Anderson and by Chakravorty and Ballentine in their chemical studies

of *Cypridina* luciferin, and by comparing our spectrum with several apparently related spectra, we could give arguments in favour of the view that dehydro-luciferin might be a derivative of 1,4-naphthoquinone, in which the $\text{CO-CH}_2\text{OH}$ -group — accepted to be present by Chakravorty and Ballentine — is a direct substituent of the quinone nucleus.

For luciferin a corresponding naphthohydroquinone structure was deemed to be the most probable.

ZUSAMMENFASSUNG.

Abschnitt I. Es wurde eine kurze Übersicht über die Verbreitung der Biolumineszenzerscheinung gegeben. In der Tierwelt trifft man in sämtlichen niedrigeren Klassen, bis einschliesslich der Fische, leuchtende Formen an, in der Pflanzenwelt findet man sie nur unter den Bakterien und Pilzen.

Im Gegensatz zu den leuchtenden Bakterien und Pilzen scheiden einige Tierarten leuchtende Exkrete aus.

Abschnitt II. Die bisher vorgenommenen Untersuchungen haben ergeben, dass Biolumineszenz allem Anschein nach immer auf der Oxydation eines niedrigmolekularen, thermostabilen Stoffes (*Luciferin*) durch molekularen Sauerstoff unter Vermittlung eines Enzyms (*Luciferase*) beruht. In den Fällen, in denen Luciferin und Luciferase vom lebenden Organismus abzutrennen war, ergab sich, dass diese zwei Komponenten ziemlich spezifisch aufeinander eingestellt sind (§ 1).

Die chemische Untersuchung von *Cypridina*-Luciferin ist noch keineswegs abgeschlossen und mit der Untersuchung von Luciferase wurde sogar noch kaum begonnen.

Hinsichtlich des Luciferinmoleküls liess sich plausibel machen, dass seine Struktur zwei Oxydationswege gestattet. Die reversible „dunkle“ Oxydation zu Dehydroluciferin durch Sauerstoff oder Oxydationsmittel beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein einer Polyphenolgruppe (Anderson), während bei der irreversiblen „leuchtenden“ Oxydation durch Sauerstoff eine $\text{—CO—CH}_2\text{OH}$ -Gruppe unter dem Einfluss von Luciferase zu einer —COOH -Gruppe oxydiert wird (Chakravorty und Ballentine) (§ 2).

Abschnitt III. Es wurde eine Übersicht über die bisher aufgestellten Schemata für den Mechanismus der Leuchtreaktion gegeben (§§ 1 und 2). Die Ansicht, dass Luciferase das lichtemittierende Molekül sein soll, wie Harvey und Mitarbeiter annehmen, wurde abgelehnt. Es wurde die Auffassung begründet, dass bei Oxydation des Luciferase-Luciferinkomplexes der Komplex von Luciferase und irreversibel oxydiertem Luciferin primär in angeregtem Zustande entsteht und dass die Lichtemission auf Rechnung dieses Komplexes zu stellen ist (§§ 1 und 3).

Weiterhin liess sich die Auffassung stützen, dass die Art des Biolumineszenzprozesses in sämtlichen Leuchtorganismen die gleiche ist und dass besonders auch die verschiedenen Luciferine einander nahe verwandt sind.

Abschnitt IV. Da die direkte chemische Untersuchung der Biolu-

minescenzerscheinung abhängt von der Möglichkeit den betreffenden Prozess *in vitro* zu studieren, entschlossen wir uns — trotz der negativen Erfahrungen anderer Autoren — die Möglichkeit der Abtrennung des leuchtenden Systems von der Bakterienzelle neuerdings zu prüfen.

Einwirkung flüssiger Luft auf *Ph. phosphoreum* ergab bei unseren Versuchen zwar eine Zelldesintegration, führte jedoch nicht zu einer extrazellulären Lumineszenz (§ 2).

Weiterhin wurde vergeblich versucht aus gut leuchtenden Bakterien einen Extrakt zu gewinnen, der imstande wäre die Leuchtfähigkeit ausgeleuchteter Bakterien wiederherzustellen (§ 3).

Die etwaigen Ursachen des Scheiterns dieser und anderer Versuche zur Gewinnung aktiver Präparate aus Leuchtbakterien wurden kurz erörtert (§ 4).

Abschnitt V. Die Beobachtung, dass die Lichtemission der Leuchtbakterien mit einem nicht HCN-empfindlichen Teil der Gesamtatmung zusammenhängt, sowie einige weitere diesbezügliche Beobachtungen, hatten Eymers und van Schouwenburg zu der Hypothese geführt, dass wie bei den „dunklen“ nicht HCN-empfindlichen Atmungsprozessen die Mitwirkung eines Flavinenzyms auch bei der Lichtreaktion in Frage komme.

Diese Auffassung wurde einigermaßen gestützt durch die Beobachtungen Doudoroffs, wonach es unter bestimmten Umständen gelang, durch Zufügung von Lactoflavin zum Kulturmedium von Bakterienstämmen, deren Leuchtkraft abgenommen hatte, die Lichtintensität wieder zu steigern.

Doudoroff betrachtete dieses Ergebnis gleichfalls als Stütze für die Auffassung, dass Lactoflavin oder ein Derivat dieses Stoffes unmittelbar bei der Lichtemission mitwirkte.

Auf Grund der Tatsache, dass der mit Lactoflavin erzielte Effekt nur über einen vollständigen Wachstumszyklus zustande kommt, sowie auf Grund der Erwägung, dass im allgemeinen zwischen der Leuchtfähigkeit von Bakterienkulturen und ihrem Lactoflavingehalt kein Zusammenhang besteht, glaubten wir die von Eymers und van Schouwenburg und von Doudoroff ausgesprochene Vermutung ablehnen zu müssen (§ 1).

Zwecks Feststellung ob etwa ein zu Lactoflavin nahe verwandtes Umwandlungsprodukt in den Leuchtbakterien vorhanden war, isolierten wir aus *Ph. phosphoreum* ein Flavin in Form seines Tetraacetats; dieses war jedoch nach Schmelzpunkt und Absorptionsspektrum identisch mit synthetischem Lactoflavin-Tetraacetat. Auch diese Untersuchung führte mithin nicht zu einer Bestätigung der Auffassung Doudoroffs (§ 2).

Da eine Fortsetzung der direkten chemischen Untersuchung des Biolumineszenzprozesses in Leuchtbakterien geringe Aussicht auf Erfolg versprach, versuchten wir eine der Komponenten des lichtemittierenden Systems mit Hilfe einer indirekten Methode zu charakterisieren (§ 3).

Abschnitt VI. Ebenso wie Harvey für die Lumineszenz von

Cypridina-Extrakten gefunden hatte, konnten van Schouwenburg und van der Burg auch für Leuchtbakterien nachweisen, dass die Intensität des ausgesandten Lichtes durch äussere Bestrahlung reversibel abnimmt und dass mithin anscheinend einer der Bestandteile des lichtemittierenden Systems durch die Bestrahlung photochemisch umgesetzt wird. Es ergab sich, dass der Bestrahlungseffekt stark von der Wellenlänge abhängig war (§ 1).

Ein Studium des genannten Bestrahlungseffektes schien nunmehr die Möglichkeit zu bieten das Inaktivierungsspektrum und damit auf indirektem Wege das Absorptionsspektrum jenes Bestandteiles des lichtemittierenden Systems zu bestimmen, der die wirksame Strahlung absorbiert hat (§ 2).

In diesem Zusammenhang wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Untersuchungen besprochen, in denen nach obigem Prinzip bestimmte Absorptionsspektren sich als identisch erwiesen mit den durch direkte Messung erhaltenen Absorptionsspektren (§ 3).

Abschnitt VII. Eine Betrachtung der Frage, in welcher Weise der gesuchte Absorptionskoeffizient für eine bestimmte Wellenlänge mit den experimentell zu bestimmenden Grössen — und zwar den Intensitäten Y_0 und Y des Bakterienlichtes vor und nach der Bestrahlung — zusammenhängen würde, lehrte, dass unter Annahme gewisser Voraussetzungen die als „photochemische Wirkung“ definierte Grösse $\ln \frac{Y_0}{Y}$ hierfür massgebend sein wird. Dies gilt in dem Sinne, dass diese Grösse der Gesamtzahl der während des Versuches eingestrahlteten Quanten (Produkt der Bestrahlungszeit und der Quantenintensität des Lichtes an der Stelle des absorbierenden Systems) proportional ist.

Durch Berechnung der photochemischen Wirkung pro eingestrahltetes Quant erhielten wir nun eine als „spezifische photochemische Wirkung“ bezeichnete Grösse, welche ein direktes Mass für den zu bestimmenden Absorptionskoeffizienten bildet.

Die Kurve, die den Zusammenhang zwischen der Wellenlänge und der dazu gehörigen spezifischen photochemischen Wirkung wiedergibt — das Inaktivierungsspektrum — stellt nunmehr gleichzeitig die Absorptionskurve der Verbindung, die die photochemisch wirksame Strahlung absorbiert hat, in relativem Masse dar.

Abschnitt VIII. Bei Bestrahlungsversuchen mit homogenen Bakteriensuspensionen ergab sich nur für einige Wellenlängen die Möglichkeit, die photochemische Wirkung mit befriedigender Genauigkeit zu bestimmen. Trotzdem war das Ergebnis dieser Versuche insofern sehr hoffnungsvoll, als es uns bereits einen ersten Einblick in den Bau des Inaktivierungsspektrums im sichtbaren Spektralgebiet gewährte (§ 1—3).

Es stellte sich bei der angewandten Methode jedoch als unmöglich heraus, die Beobachtungen auf eine grössere Anzahl Wellenlängen auszudehnen, da es

nicht gelang, die gewünschten Wellenlängen mit hinreichender Intensität zu isolieren (§ 4).

Abschnitt IX. Indem von homogenen Bakteriensuspensionen zu homogen gewachsenen Plattenkulturen übergegangen wurde und gleichzeitig statt der Bestrahlung mittels isolierter Quecksilberlinien eine Bestrahlung mit dem durch einen Spektrographen entworfenen Quecksilberspektrum zur Anwendung kam, ergab sich die Möglichkeit, die Messungen auf ein grösseres Wellenlängengebiet auszudehnen. Hierbei wurde die Intensität des Bakterienlichtes vor und nach der Bestrahlung auf objektivem photographischem Wege bestimmt (§ 1).

Weiterhin wurde die Züchtung der erforderlichen Bakterienkulturen (§ 2), die benutzte Versuchsanordnung und die Bestrahlung der Bakterienkulturen (§ 3), die photographische Intensitätsmessung des Bakterienlichtes vor und nach der Bestrahlung (§ 4) und die Bestimmung der spektralen Intensitätsverteilung in dem eingestrahlten Spektrum beschrieben (§ 5). An Hand eines näher erläuterten Beispiels wurde gezeigt, wie aus den erhaltenen Angaben die spezifische photochemische Wirkung für jede der untersuchten Wellenlängen bestimmt werden kann (§ 5).

Schliesslich wurde noch experimentell nachgewiesen, dass die lichtzerstreuende Wirkung der benutzten Bakterienkulturen die Zuverlässigkeit der Ergebnisse nicht beeinträchtigt (§ 6).

Abschnitt X. Nach Ausarbeitung der Methodik wurde das photochemische Inaktivierungsspektrum von *Ph. phosphoreum* bestimmt. Für das ultraviolette Spektralgebiet erfolgte dies mittels eines Quarzspektrographen, wobei erst Aufnahmen unter Variation der Bestrahlungsintensität (§ 1) und dann solche unter Variation der Bestrahlungszeit (§ 2) gemacht wurden. Für das sichtbare Spektralgebiet wurde mit Rücksicht auf die grössere Dispersion ein Glasspektrograph benützt (§ 3).

Es stellte sich heraus, dass die photochemische Wirkung der Bestrahlungszeit und der Bestrahlungsintensität innerhalb weiter Grenzen proportional war, sodass das Gesetz von *Bunsen-Roscoe* für die untersuchte photochemische Umsetzung gilt.

Aus den Mittelwerten der erhaltenen Ergebnisse liess sich das photochemische Inaktivierungsspektrum von *Ph. phosphoreum* ableiten (§ 4). Dieses Spektrum enthält ausgesprochene Maxima bei 405 à 410 m μ und bei 290 m μ , ein Minimum bei ca 350 m μ und weiter Andeutungen zweier Nebenmaxima bei ca 430 und 320 m μ (siehe Fig. 28).

Abschnitt XI. Hinsichtlich der Erholung der Lichtintensität nach Ablauf der Bestrahlung ergab sich, dass an den Stellen, welche mit den Wellenlängengebiet < 300 m μ bestrahlt waren, ein sekundärer Effekt eintritt, der bereits früher von *Gerretsen* beschrieben worden war; dieser besteht

hieraus, dass nach einer anfänglichen Zunahme der Lichtintensität — die jene der unbestrahlten Kulturoberfläche übertrifft — eine vollständige Löschung des Lichtes infolge Absterbens der Bakterien eintritt (§ 1).

Der quantitative Verlauf der Erholungsreaktion lehrte jedoch, dass diese bis zu etwa 30 Minuten nach der Bestrahlung für das ganze untersuchte Wellenlängengebiet gleich verläuft und dass erst nachher bei den Bakterien, welche im genannten Wellenlängengebiet bestrahlt wurden, der genannte sekundäre Effekt eintritt.

Wir folgerten hieraus, dass der unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung eingetretene Rückgang in der Lichtintensität durch die photochemische Umsetzung nur eines bestimmten Stoffes beherrscht wird und dass infolgedessen das Inaktivierungsspektrum das Absorptionsspektrum eines einzelnen Stoffes darstellt. Obgleich sich ergab, dass der Verlauf der Erholungsreaktion einen monomolekularen Charakter hatte, liess sich hieraus vorläufig über die Art des bei der Erholungsreaktion eintretenden Vorganges noch kein Schluss ziehen (§ 2).

Bei der Ableitung der im Abschnitt VII gegebenen Formulierung für die photochemische Wirkung war die Tatsache, dass die Erholungsreaktion auch während der Bestrahlung eintritt, nicht berücksichtigt worden. Eine einfache Berechnung zeigte jedoch, dass die gegebene Ableitung — infolge des geringen Wertes der Geschwindigkeitskonstante der Erholungsreaktion im Vergleich zu jener der photochemischen Reaktion — praktisch richtig bleibt (§ 3).

Schliesslich wurde noch kurz die Bedeutung von Sauerstoff für die photochemische Reaktion geprüft. Die Versuche führten zu der Folgerung, dass das Vorhandensein von Sauerstoff für das Auftreten des Bestrahlungseffektes bei *Ph. phosphoreum* erforderlich ist (§ 4).

A b s c h n i t t XII. Die nur im sichtbaren Spektralgebiet durchgeführten Bestrahlungsversuche mit *Ph. splendidum* und *Ph. Fischeri* zeigten, dass auch bei diesen Bakterienarten der für *Ph. phosphoreum* beschriebene Bestrahlungseffekt eintritt und dass die gefundenen Inaktivierungsspektren im allgemeinen sehr ähnlich sind, obgleich die Inaktivierungsspektren der zwei erst genannten Bakterienarten eine etwas geringere Ausdehnung nach der langwelligen Seite des Spektrums zeigen.

A b s c h n i t t XIII. Die Grösse der Quantenausbeute der photochemischen Reaktion bei Bestrahlung von *Ph. phosphoreum* zeigte, dass eine Quantenausbeute von 1 unter Annahme gewisser Voraussetzungen hierfür nicht als ausgeschlossen zu erachten ist.

A b s c h n i t t XIV. Bevor die Frage, welches Molekül bei der Bestrahlung von *Ph. phosphoreum* photochemisch umgesetzt wird, näher behandelt wurde, war die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass ein anderes Molekül als das schliesslich inaktivierte die Strahlung absorbiert habe, m.a.W. dass bei

der untersuchten Photoinaktivierung ein Photosensibilisator im Spiel gewesen sei. Es zeigte sich, dass in dieser Hinsicht zwei naheliegende Möglichkeiten — und zwar, dass entweder Lactoflavin oder ein Carotin als Photosensibilisator fungiert haben würde — endgültig ausgeschlossen werden können; Erwägungen allgemeiner Art machen auch die Mitwirkung eines noch unbekannten Sensibilisators wenig wahrscheinlich (§ 1).

Verschiedene Erwägungen führten zu der Einsicht, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit nicht Luciferin selbst, sondern Dehydroluciferin als der lichtempfindliche Bestandteil zu betrachten ist.

In Zusammenhang hiermit wurde der Verlauf der Erholungsreaktion und die Notwendigkeit von Sauerstoff zum Auftreten des Bestrahlungseffektes nochmals kurz betrachtet.

Die beobachteten Erscheinungen lassen sich am besten mit folgender Vorstellung in Einklang bringen. Das gefundene Inaktivierungsspektrum von *Ph. phosphoreum* stellt das Absorptionsspektrum des in der Zelle vorhandenen Dehydroluciferins dar, das bei der Bestrahlung reversibel photochemisch umgesetzt wird. Sauerstoff wäre dann für das Auftreten der Photoinaktivierung deshalb erforderlich, weil Dehydroluciferin nur im anaeroben System in grösserer Menge auftritt (§ 2).

Zum Schluss wurde versucht an Hand des bestimmten Absorptionsspektrums ein mögliches Strukturbild für das Dehydroluciferin zu entwickeln, wobei von den von Anderson und von Chakravorly und Ballentine auf rein chemischem Wege bei *Cypridina*-Luciferin erhaltenen Ergebnissen ausgegangen wurde.

Auf Grund verschiedener Erwägungen und einiger Vergleichsspektren aus der Literatur befürworteten wir die Arbeitshypothese, dass das Dehydroluciferin als ein Derivat von 1,4-Naphtochinon aufzufassen ist, wobei dann die von Chakravorly und Ballentine nachgewiesene $\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe am Chinonring haften würde; Luciferin wäre dann das entsprechende Naphtohydrochinon.

LITTERATUROPGAVE.

ALGEMEENE LITTERATUUR

Enkele titels zijn eveneens onder de speciale litteratuur vermeld.

- Dahlgren, U., The Production of Light by Animals. J. Frankl. Inst. 1915—'17.
 Dubois, R., La Vie et la Lumière. Paris, 1914.
 Harvey, E. N., The Nature of Animal Light. Philadelphia, 1920.
 Harvey, E. N., Recent Advances in Bioluminescence. Physiol. Reviews 4, 639 (1924).
 Harvey, E. N., et al., Chemiluminescence, Bull. Nr. 59, Nat. Research Council. Washington (D.C.), 1927.
 Harvey, E. N., Luciferase, the Enzyme concerned in Luminescence of Living Organisms. Erg. Enz. Forsch. 4, 365 (1935).
 Harvey, E. N., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 3, 261 (1935).
 Harvey, E. N., Living Light. Philadelphia, 1941.
 Harvey, E. N., Annual Review of Biochemistry 1941.
 Molisch, H., Leuchtende Pflanzen. Jena, 1904; 2te Aufl. 1912.
 Pratz, A., Das Leuchten der Organismen. Eine Übersicht über die neuere Literatur. Erg. d. Physiol. 21, 166 (1923).
 Schouwenburg, K. L. van, On Respiration and Light Emission in Luminous Bacteria. Diss. Delft, 1938.

SPECIALE LITTERATUUR

1. Almquist, H. J., Purification of the Antihemorrhagic Vitamin. J. Biol. Chem. 114, 241 (1936).
2. Ammon, R. en W. Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander. Leipzig 1938.
3. Anderson, R. S., The Chemistry of Bioluminescence. I Quantitative Determination of Luciferin. J. Cell. and Comp. Physiol. 3, 45 (1933).
4. Anderson, R. S., Studies on Bioluminescence. II The partial Purification of *Cypridina* Luciferin. J. Gen. Physiol. 19, 301 (1935).
5. Anderson, R. S., Studies on Bioluminescence. III The Reversible Reaction of *Cypridina* Luciferin with Oxidizing Agents and its Relations to the Luminescent Reaction. J. Cell. and Comp. Physiol. 8, 261 (1936).
6. Ball, E. G., The Rôle of Flavoproteins in Biological Oxidations. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 7, 100 (1939).
7. Ball, E. G. and Tung-Tou Chen, Epinephrines and Related Compounds. J. Biol. Chem. 102, 691 (1933).
8. Beijerinck, M. W., Sur l'aliment photogène et l'aliment plastique des bactéries lumineuses. Arch. Néerl. d. Sc. Exactes et Naturelles 24, 369 (1891); Verz. Geschriften 2, 239.
9. Beijerinck, M. W., Die Mutation bei Mikroben. Folia Mikrobiol. 1, 4 (1912).

10. Beijerinck, M. W., Die Leuchtakterien der Nordsee im August und September. *Folia Mikrobiol.* 4, 15 (1916); *Verz. Geschriften* 5, 199.
11. Bersin, Th., Kurzes Lehrbuch der Enzymologie Leipzig 1939.
12. Boyle, R., *Phil. Trans. Roy. Soc. Abridged* 5th Ed. 2, 206 (1722) en *ibid.* 3, 646 (1749), gecit. naar Harvey, The Nature of Animal Light; l.c. blz. 85.
13. Bünning, E., Phototropismus und Carotinoide. I *Planta* 26, 719 (1937), II *ibid.* 27, 148 (1937).
14. Chakravorly, P. N. and R. Ballentine, On the Luminescent Oxydation of Luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 2030 (1941).
15. Chance, B., E. N. Harvey, F. H. Johnson and G. Millikan, The Kinetics of Bioluminescent Flashes. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 15, 195 (1940).
16. Chase, A. M., Riboflavin and the Photochemical Oxydation of *Cypridina* Luciferin. *Am. J. Physiol.* 129, 332 (1940).
17. Chase, A. M. and A. C. Giese, Effects of Ultraviolet Radiation on *Cypridina* Luciferin and Luciferase. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 16, 323 (1940).
18. Dimroth, K., Beziehungen zwischen den Absorptionsspektren im Ultraviolet und der Konstitution organischer Verbindungen. *Z. angew. Chemie* 52, 545 (1939).
19. Doudoroff, M., Lactoflavin and Bacterial Luminescence. *Enzymol.* 5, 239 (1938).
20. Dubois, R., Fonction photogénique des Pyrophores. *C. R. Soc. Biol.* 37, 559 (1885).
21. Dubois, R., De la fonction photogénique chez le *Pholas dactylus*. *C. R. Ac. Sc.* 105, 690 (1887).
22. Dubois, R., Note sur la fonction photogénique chez les Pholades. *C. R. Soc. Biol.* 4, Ser. 8, 564 (1887).
23. Duggar, B. M., Biological Effects of Radiation. New York and London 1936.
24. Duggar, B. M. and A. Hollaender, Irradiation of Plant Viruses and of Micro-Organisms with Monochromatic Light. I *J. Bact.* 27, 219 (1934); II *ibid.* 27, 241 (1934).
25. Ellinger, Ph. und W. Koschara, Über eine neue Gruppe tierischer Farbstoffe (Lyochrome). I—III. *Ber.* 66, 315, 808, 1411 (1933).
26. Eymers, J. G. and K. L. van Schouwenburg, On the Luminescence of Bacteria. I A Quantitative Study of the Spectra of the Light emitted by *Photobacterium phosphoreum* and by some Chemiluminescent Reactions. *Enzymol.* 1/2, 107 (1936).
27. Eymers, J. G. and K. L. van Schouwenburg, On the Luminescence of Bacteria. II Determination of the Oxygen consumed in the Light emitting Process of *Photobacterium phosphoreum*. *Enzymol.* 1, 328 (1937).
28. Eymers, J. G. and K. L. van Schouwenburg, On the Luminescence of Bacteria. III Further Quantitative Data regarding Spectra connected with Bioluminescence. *Enzymol.* 3, 235 (1937).
29. Fieser, L. F., 2-Hydroxy-1,4-Anthraquinone. *J. Am. Chem. Soc.* 50, 465 (1928).
30. Fieser, L. F., W. P. Campbell and E. M. Fry, Synthesis of Quinones related to Vitamins K₁ and K₂. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2206 (1939).
31. Foulke, D. G. and F. Schneider, The Microtechnic of Organic Qualitative Analysis. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 10, 104 (1938).
32. Gates, F. L., The Absorption of Ultra-Violet Light by Bacteria. *J. Gen. Physiol.* 14, 31 (1930).
33. Gates, F. L., The Absorption of Ultra-Violet Radiation by Crystalline Pepsin. *J. Gen. Physiol.* 18, 265 (1935).
34. Gates, F. L., The Temperature Coefficient of Inactivation of Crystalline Pepsin by Ultra-Violet Radiation. *J. Gen. Physiol.* 18, 279 (1935).

35. Gerretsen, F. C., Über die Ursachen des Leuchtens der Leuchtbakterien. Centralbl. f. Bakt. II **52**, 353 (1920).
36. Giese, A., Werking van ultra-violette straling op de luminescentie en de ademhaling van *Achromobacter Fischeri*. J. Cell. and Comp. Physiol. **17**, 203 (1941); gecit. naar Chem. Zentr. 1941II, 2093.
37. Giese, A. C. and A. M. Chase, The Effect of Cyanide on *Cypridina* Luciferin. J. Cell. and Comp. Physiol. **16**, 237 (1940).
38. Green, R. D. and A. Black, The Preparation of Pure d-Riboflavin from Natural Sources. J. Am. Chem. Soc. **59**, 1820 (1937).
39. Haldane, J. S. and J. L. Smith, The Oxygen Tension of Arterial Blood. J. Physiol. **20**, 497 (1896).
40. Harvey, E. N., The Mechanism of Light Production in Animals. Science N.S. **44**, 208 (1916).
41. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. II On the Presence of Luciferin in Luminous Bacteria. Am. J. Physiol. **41**, 449 (1916).
42. Harvey, E. N., What Substance is the Source of the Light in the Firefly? Science N. S. **46**, 241 (1917).
43. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. IV The Chemistry of Light Production in a Japanese Ostracod Crustacean *Cypridina hilgendorfi*, Muller. Am. J. Physiol. **42**, 318 (1917).
44. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. VII Reversibility of the Photogenic Reaction in *Cypridina*. J. Gen. Physiol. **1**, 133 (1919).
45. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. IX Chemical Nature of *Cypridina* Luciferin and *Cypridina* Luciferase. J. Gen. Physiol. **1**, 269 (1919).
46. Harvey, E. N., The Nature of Animal Light. Philadelphia 1920.
47. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. XIV The Specificity of Luciferin and Luciferase. J. Gen. Physiol. **4**, 285 (1922).
48. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence. XV Electroreduction of Oxyluciferin. J. Gen. Physiol. **5**, 275 (1923).
49. Harvey, E. N., Bioluminescence. XVI What determines the Color of the Light of Luminous Animals? Am. J. Physiol. **70**, 619 (1924).
50. Harvey, E. N., The Inhibition of *Cypridina* Luminescence by Light. J. Gen. Physiol. **7**, 679 (1925).
51. Harvey, E. N., The Effects of Light on Luminous Bacteria. J. Gen. Physiol. **7**, 687 (1925) en ibid. **10**, 103 (1927).
52. Harvey, E. N., Oxygen and Luminescence with a Description of Methods for Removing Oxygen from Cells and Fluids. Biol. Bull. **51**, 89 (1926).
53. Harvey, E. N., The Specificity of Luciferin and Luciferase together with a General Survey of the Reaction. Am. J. Physiol. **77**, 548 (1926).
54. Harvey, E. N., The Oxydation-Reduction Potential of the Luciferin-Oxyluciferin System. J. Gen. Physiol. **10**, 385 (1926).
55. Harvey, E. N., Further Studies on the Inhibition of *Cypridina* Luminescence by Light, with some Observations on Methylene Blue. J. Gen. Physiol. **10**, 103 (1926).
56. Harvey, E. N., The Evolution of Bioluminescence and its Relation to Cell Respiration. Proc. Am. Phil. Soc. **71**, 135 (1932).
57. Harvey, E. N., Luciferase, the Enzyme concerned in Luminescence of Living Organisms. Erg. d. Enz. Forsch. **4**, 365 (1935).
58. Harvey, E. N. and G. I. Lavin, Reduction of Oxyluciferin by Atomic Hydrogen. Science **74**, 150 (1931).
59. Harvey, E. N., and A. L. Loomis, The Destruction of Luminous Bacteria by High Frequency Sound Waves. J. Bact. **17**, 373 (1929).

60. Hausser, K. W., R. Kuhn, A. Smakula en anderen, Zeitschr. f. Phys. Chem. B **29**, 363 (1935).
61. Hickling, C. F., A New Type of Luminescence in Fishes. J. Biol. Assoc. Unit. Kingdom **13**, 914 (1925).
62. Hollaender, A. and B. M. Duggar, Irradiation of Plant Viruses and of Microörganisms with Monochromatic Light. III Resistance of the Virus of Typical Tobacco Mosaic and *Escherichia coli* to Radiation from λ 3000 to λ 2250 Å. Proc. Nat. Acad. of Sc. **22**, 19 (1936).
63. Hooker, S. C., Condensation of Aldehydes with β -Hydroxy--Naphthoquinone. Synthesis of Hydrolapachol. J. Am. Chem. Soc. **58**, 1163 (1936).
64. Johnson, F. H., The Aerobic Oxydation of Carbohydrates by Luminous Bacteria and the Inhibition of Oxydation by certain Sugars. J. Cell. and Comp. Physiol. **9**, 439 (1936).
65. Johnson, F. H., Hexose Oxydation by Luminous Bacteria. I The Effect of some Natural and Synthetic Glycosides and Related Substances. J. Cell. and Comp. Physiol. **9**, 199 (1937).
66. Johnson, F. H., Hexose Oxydation by Luminous Bacteria. III The Escape of Respiration and Luminescence from Inhibition by alpha Methylglucoside, with a Note on Urethanes. J. Cell. and Comp. Physiol. **12**, 281 (1938).
67. Johnson, F. H., Total Luminescence of Bacterial Suspensions in Relation to the Reactions concerned in Luminescence. Enzymol. **7**, 72 (1939).
68. Johnson, F. H., K. L. van Schouwenburg and A. van der Burg, The Flash of Luminescence following Anaerobiosis of Luminous Bacteria. Enzymol. **7**, 195 (1939).
69. Kanda, S., Physico-Chemical Studies on Bioluminescence. IV The Physical and Chemical Nature of the Luciferase of *Cypridina hilgendorffii*. Am. J. Physiol. **55**, 1 (1921).
70. Kanda, S., Physico-Chemical Studies on Bioluminescence. VII The Solubility of *Cypridina* Luciferin in Organic Solvents. Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo) **10**, 91 (1929). Gecit. naar Chem. Abstr. **23**, 2617 (1929).
71. Kanda, S., Crystalline Luciferin. Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo) Suppl. **18**, 1 (1932). Gecit. naar Chem. Abstr. **26**, 4351 (1932).
72. Karrer, P., H. Salomon und K. Schöpp, Isolierung des Hepaflavins. Helv. Chim. Acta **17**, 419 (1934).
73. Karrer, P. und K. Schöpp, Isolierung des Lyochroms aus Eigelb (Ovo-flavin g). Helv. Chim. Acta **17**, 735 (1934).
74. Karrer, P. und K. Schöpp, Isolierung eines pflanzlichen Flavins¹⁾. Helv. Chim. Acta **17**, 771 (1934).
75. Karrer, P. und K. Schöpp, Isolierung des Flavins aus Malz. Helv. Chim. Acta **17**, 1013 (1934).
76. Katz, E. and E. C. Wassink, Infrared Absorption Spectra of Chlorophyllous Pigments in Living Cells and in Extra-Cellular States. Enzymol. **7**, 97 (1939).
77. Korr, I. M., The Relation between Cell Integrity and Bacterial Luminescence. Biol. Bull. **68**, 347 (1935).
78. Kubowitz, F., und E. Haas, Über das Zerstörungsspektrum der Urease. Biochem. Z. **257**, 337 (1933).
79. Kuhn, R. und H. Brockmann, Flavoxanthin. Z. Physiol. Chem. **213**, 192 (1932).
80. Kuhn, R., P. Desnuelle und F. Weygand, Zur Spezifität des Lactoflavins; die Bedeutung der Stellung der Methylgruppen. Ber. **70**, 1293 (1937).

¹⁾ Uit *Taraxacum officinale* (de paardebloem).

81. Kuhn, R., P. György und Th. Wagner-Jauregg, Über Ovoflavin, den Farbstoff des Eiklars. Ber. 66, 576 (1933).
82. Kuhn, R., P. György und Th. Wagner-Jauregg, Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. Ber. 66, 1034 (1933).
83. Kuhn, R. und H. Kaltschmitt, Isolierung von Lactoflavin (Vitamin B₂) aus Heu. Ber. 68, 128 (1935).
84. Kuhn, R. und Th. Wagner-Jauregg, Über die aus Eiklar und Milch isolierten Flavine. Ber. 66, 1577 (1933).
85. Kuhn, R. und Th. Wagner-Jauregg, Über Lactoflavin (Vitamin B₂). Ber. 66, 1950 (1933).
86. Kuhn, R. und Th. Wagner-Jauregg, Lactoflavin (Vitamin B₂) aus Leber. Ber. 67, 1770 (1934).
87. Kuhn, R., A. Winterstein und H. Roth, Über den Polyenfarbstoff der Azafranillowurzeln. Ber. 64, 333 (1931).
88. Lasareff, P., Ueber das Ausbleichen von Farbstoffen im sichtbaren Spektrum. Ann. Physik IV Folge 24, 661 (1907).
89. Lavin, G. J. and W. M. Stanley, The Ultraviolet Absorption Spectrum of Crystalline Tobacco Mosaic Virus Protein. J. Biol. Chem. 118, 269 (1937).
90. Lynen, F., Über den Stoffwechsel der Hefe nach dem Einfrieren in flüssige Luft. Ann. 539, 1 (1939).
91. Macfadyan, A., On the Influence of the Prolonged Action of Liquid Air on Micro-Organisms and the Effect of Mechanical Trituration at the Temperature of Liquid Air on Photogenic Bacteria. Proc. Roy. Soc. London 71, 76 (1902).
92. Measure, M. P., The Effects of Ultraviolet Radiation on Growth and Respiration of Pea Seeds. Botan. Gaz. 93, 21 (1932).
93. Meyer, K. P., Nachweis und Messung geringer Konzentrationen an freiem Sauerstoff (bis $1 : 10^{10}$) mittels Leucht Bakterien. Helv. Physica Acta 15, 3 (1942).
94. Molisch, H., Leuchtende Pflanzen. Jena 1904.
95. Oppenheimer, C. and K. G. Stern, Biological Oxydation. Den Haag 1939.
96. Ornstein, L. S., J. W. Moll und H. C. Burger, Objektive Spektralphotometrie. Sammlung Vieweg, Berlin 1932.
97. Rădulescu, D. und F. Bărbulescu, Beiträge zur Bestimmung der Struktur der Absorptions-Resonatoren der organischen Chromophore. IX: Extinktions-Kurven einiger ω, ω' -Diphenyl-polyene. Ber. 64, 2225 (1931).
98. Rădulescu, D. und G. Ostrogoŭitch, Beiträge zur Bestimmung der Struktur der Absorptions-Resonatoren der organischen Chromophore. XI: Die Struktur der Gemeinschaftsresonatoren im Anthracen, Acridin, Phenazin, Phenanthren und Pyren. Ber. 64, 2233 (1931).
99. Raffy, A. et A. Mirimanoff, Extraction et cristallisation de la flavine d'une ascomycète: *Eremothecium Ashbyi*. Bull. Soc. Chim. Biol. 20, 1166 (1938).
100. Réaumur, R.A.F. de, Mém. Acad. Paris, 198, 204, 287 (1723). Gecit. naar E. N. Harvey, Erg. Enz. Forsch. 4, 365 (1935), l.c. blz. 366.
101. Root, C. W., The Relation between Respiration and Light Intensity of Luminous Bacteria, with Special Reference to Temperature. I. Temperature and Light Intensity. J. Cell. and Comp. Physiol. 1, 195 (1932). II Temperature and Oxygen Consumption. Ibid. 5, 219 (1934).
102. Rottier, P. B., Fluorometrische en spectrophotometrische bepaling van lactoflavine in micro-organismen. Diss. Delft, 1942.

103. Sachs, J., Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen. Leipzig 1865.
 104. Schoepfle, G. M., Kinetics of Luminescent Flashes in the Bacterium, *Achromobacter Fischeri*, at different Temperatures. J. Cell. and Comp. Physiol. **16**, 341 (1940).
 105. Schoepfle, G. M., Kinetics of Bacterial Luminescent Flashes: Effects of Veronal, Dinitrophenol, and Osmotic Pressure. J. Cell. and Comp. Physiol. **17**, 109 (1941).
 106. Schouwenburg, K. L. van, On Respiration and Light Emission in Luminous Bacteria. Diss. Delft, 1938.
 107. Schouwenburg, K. L. van and A. van der Burg, On the Influence of Carbon Monoxide on Respiration and Light Emission of Luminous Bacteria. Enzymol. **9**, 34 (1940).
 108. Shoup, C. S., Luminescence and Respiration of Bacteria in Carbon Monoxide. Biol. Bull. (Abstr.) **65**, 370 (1933).
 109. Spallanzani, L., Memoria sopra le Meduse fosforiche. Mem. Soc. Ital. Verona **7**, 271 (1794). Gecit. naar Harvey, The Nature of Animal Light; l.c. blz. 85.
 110. Stevens, K. P., Studies on the Amount of Light emitted by Mixtures of *Cypridina* Luciferin and Luciferase. J. Gen. Physiol. **10**, 859 (1927).
 111. Stuart J., E. R. Orent and E. V. McCollum, A Simplified Method for Preparing Lactoflavin and a Study of its Growth Effect. J. Biol. Chem. **108**, 579 (1935).
 112. Taylor, G. W., The Effect of Hormones and certain other Substances on Cell (Luminous Bacteria) Respiration. J. Cell. and Comp. Physiol. **1**, 297 (1932).
 113. Vermeulen, D., E. C. Wassink and G. H. Reman, On the Fluorescence of Photosynthesizing Cells. Enzymol. **4**, 254 (1937).
 114. Warburg, O., Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin, 1928, l.c. blz. 1.
 115. Warburg, O. und E. Negelein, Über den Einfluss der Wellenlänge auf die Verteilung des Atmungsferments (Absorptionsspektrum des Atmungsferments). Biochem. Z. **193**, 339 (1928).
 116. Warburg, O. und E. Negelein, Über die photochemische Dissoziation von Eisencarbonylverbindungen (Kohlenoxyd-Hämochromogen, Kohlenoxyd-Ferrocystein) und das photochemische Equivalentgesetz. Biochem. Z. **200**, 414 (1928).
 117. Warburg, O. und E. Negelein, Über die photochemische Dissoziation bei intermittierender Belichtung und das absolute Absorptionsspektrum des Atmungsferments. Biochem. Z. **202**, 202 (1928).
 118. Warburg, O. und E. Negelein, Über das Absorptionsspektrum des Atmungsferments. Biochem. Z. **214**, 64 (1929).
 119. Williams, R. J., E. R. Buchman and A. E. Ruehle, Studies of Crystalline Vitamin B₁. VIII Sulfite Cleavage. II Chemistry of the Acidic Product. J. Am. Chem. Soc. **57**, 1093 (1935).
 120. Yamasaki, I., Über Flavine, die bei der Gärung von Aceton-Butylalkoholbakterien gebildet werden (Gärungsflavine). I Über Gärungsflavin aus Reis. Biochem. Z. **300**, 160 (1939).
-

Am. 1293

STELLINGEN.

I.

De luciferinen mogen volgens de ter beschikking staande gegevens worden opgevat als derivaten van 1,4-napthohydrochinon.

Proefschrift: hoofdstuk XIV, § 3.

II.

Lactoflavine is niet direct bij de bioluminescentie der lichtbacteriën betrokken.

Proefschrift: hoofdstuk V.

III.

De permeabiliteit van celmembranen wordt zoowel door electrische factoren als door London-van der Waals'sche krachten bepaald.

IV.

Physostigmine versterkt de werking van acetylcholine niet slechts door een remming van de choline-esterase, doch tevens door een direct synergistisch effect.

J. Freud en I. E. Uyldeert, Arch. Int. de Pharmacodynamie et de Thérapie 52, 238 (1936).

V.

Antagonisme van physiologisch actieve stoffen zal veelal zoo zijn te verklaren, dat deze stoffen in de cellen wél elkanders plaats, doch niet elkanders functie overnemen.

VI.

De proeven van Eichhoff en van Kopp pleiten vooralsnog tegen het algemeen aanvaarden van de meening, dat acht à twaalf quanten voor de assimilatie van een molecule koolzuur bij belichting van *Chlorella* in de stationnaire toestand noodig zijn.

H. T. Eichhoff, Biochem. Z. 303, 112 (1939).

J. Franck en H. Gaffron, Adv. in Enzymol. I, 199 (1941).

C. h. Kopp, Biochem. Z. 310, 191 (1941).

VII.

De carboxylase-modellen van Langenbeck moeten als onvolledige modellen worden beschouwd.

VIII.

De proeven van Windaus en zijn medewerkers spreken niet overtuigend tegen de door Roffo aangegeven vorming van carcinogene phenanthreen-derivaten bij de photo-oxydatie van cholesterine.

A. H. Roffo, Z. f. Krebsforsch. **47**, 473 (1938).

A. Windaus, K. Bursian en U. Riemann, Z. Physiol. Chem. **271**, 177 (1941).

IX.

De door Georg voorgestelde structuur van isosaccharose lijkt aannemelijker dan de door Schlubach en Middelhoff gegeven formuleering.

H. H. Schlubach en B. Middelhoff, Ann. **550**, 134 (1942).

A. Georg, Ann. **551**, 272 (1942).

X.

Het verdient overweging de wetenschappelijke opleiding van den leeraar met een candidaatsexamen te doen eindigen.

De leeraarsbevoegdheid zou dan echter pas moeten worden toegekend na een hierop volgende, bijzonder op het doel gerichte, opleiding.

