



Over roode en andere bacteriën van gezouten visch

<https://hdl.handle.net/1874/309212>

H. F. M. Petter
Diss. Utrecht 1932 H.F.M. Petter.

OVER ROODE EN
ANDERE BACTERIËN
VANGEZOUTEN VISCH

DOOR

H. F. M. PETTER

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

OVER ROODE EN ANDERE BACTERIËN VAN
GEZOUTEN VISCH

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



1780 8613

49w 192 432

OVER ROODE EN ANDERE BACTERIËN VAN GEZOUTEN VISCH

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR. L. S. ORNSTEIN, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER
UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 23 MEI 1932
DES NAMIDDAGS TE VIER UUR

DOOR

HELENA FRANCISKA MARIA PETTER
GEBOREN TE ALKEMADE

1932

UITGEVERIJ C. A. MEES, SANTPOORT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS

Nu ik mijn studietijd afsluit met dit proefschrift, dat noodzakelijkerwijs een weerspiegeling is van mijn wetenschappelijke vorming, is het mij een behoefte dank te brengen aan allen, die hieraan hebben medegewerkt.

Hooggeleerde WENT, Hooggeachte Promotor, ik beschouw het als een groot voorrecht, dat ik zal behoorren tot degenen, die bij U hun dissertatie hebben bewerkt. Voor de vrijheid, die Gij mij gelaten hebt bij de keuze van het onderwerp van mijn dissertatie, ben ik U zeer dankbaar. Dat Gij bij Uw veelomvattende arbeid voor ieder onzer zulk een groote belangstelling toont, heeft mij steeds getroffen. Uw leerrijke kritiek is voor mijn wetenschappelijke ontwikkeling van groot belang geweest. Voor de mij betoonde gastvrijheid ten Uwen huize, ben ik Mevrouw WENT en U zeer dankbaar.

Hooggeleerde WESTERDIJK, JORDAN, PULLE, NIERSTRASZ en KRUYT, al heb ik mij ook niet in de door U gedoeerde vakken verder ontwikkeld, toch zijn Uw colleges en practica voor mij van groote waarde geweest. Ik heb het dikwijls betreurd, dat ik mij in Uw vakken niet verder heb kunnen verdiepen. U, Hooggeleerde JORDAN, dank ik in het bijzonder voor hetgeen Gij aan mijn algemeene geestelijke ontwikkeling hebt bijgedragen.

Hooggeleerde BAAS-BECKING, het feit, dat Gij de aanleiding gaaft tot dit onderzoek, bewijst voldoende, welk een invloed Gij op mijn wetenschappelijke vorming hebt gehad. Uw enthousiaste belangstelling en inzicht in de biologische problemen hebben mij over vele moeilijkheden heen geholpen.

Hooggeleerde KLUYVER, de korte tijd, dat ik onder Uw leiding in Uw laboratorium heb mogen werken, is voor mij van zeer groote beteekenis geweest. Zonder Uw hulp had ik dit onderzoek niet kunnen verrichten. Ook Uw assistenten, in het bijzonder, U zeer geleerde ELEMA ben ik zeer verplicht.

Een gedeelte van het hier beschreven onderzoek heb ik uitgevoerd in het Physisch Laboratorium te Utrecht. Voor de raad en hulp aldaar ontvangen zeg ik U, Hooggeleerde ORNSTEIN en de assistenten van dit laboratorium, in het bijzonder U, Zeergeleerde JANSSEN dank.

Zeergeleerde SCHOUTEN, HAAGEN SMIT en VONK, geachte Heer DE JONG, zeer veel heb ik gehad aan Uw raadgevingen op microbiologisch of chemisch gebied.

Geachte Heer LIEBERT, ik dank U zeer voor de inlichtingen, die Gij mij verstrekt hebt omtrent het onderwerp van mijn dissertatie.

Voor hun hulpvaardigheid ben ik de leden van het personeel van het Botanische Laboratorium zeer erkentelijk.

INHOUD

	blz.
HOOFDSTUK I. INLEIDING	12
HOOFDSTUK II. LITERATUUROVERZICHT, BETREFFENDE DE MICRO-ORGANISMEN, DIE HET ROOD WORDEN VAN GEZOUTEN VISCH VEROORZAKEN	15
HOOFDSTUK III. EIGEN ISOLATIES EN WIJZE VAN KWEEKEN	19
HOOFDSTUK IV. BESCHRIJVING VAN DE GEKWEEKTE ROODE EN ORANJE BACTERIEN EN VERGELIJKING VAN DEZE MET BAC- TERIEN DOOR VROEGERE ONDERZOEKERS BESCHREVEN	22
§ 1. De staafvormige roode bacterie van klipvisch, haring en gezouten kabeljauw	22
A. Onderscheiding in verschillende stammen . . .	22
B. Enkele morphologische en physiologische ge- gegevens	25
1. Microscopisch onderzoek	25
2. Enkele physiologische gegevens	25
C. Vormveranderingen onder invloed van wisselende uitwendige omstandigheden	27
1. Literatuur	27
2. Eigen waarnemingen	35
D. Vergelijking met verschillende bacteriën door vroegere onderzoekers beschreven.	36
§ 2. De roode Sarcina van gezouten haring	38
§ 3. De staafvormige oranje bacterie van Trapani-zout .	40

HOOFDSTUK V. GASVACUOLEN, ALS OORZAAK VAN HET VERSCHIL IN DOORZICHTIGHEID TUSSEN DE CULTUREN VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACTERIUM HALOBIIUM . . .		43
§ 1.	Inleiding	43
§ 2.	Literatuuroverzicht	49
§ 3.	Eigen proeven en bespreking der resultaten in verband met de gegevens uit de literatuur	56
A.	Gedrag ten opzichte van druk en vacuum	56
B.	De invloed van verschillende reagentia	61
C.	De invloed van hooge temperatuur	63
D.	De aard van het gas	63
E.	Enkele conclusies	64

HOOFDSTUK VI. DE KLEURSTOF VAN DE DRIE GEKLEURDE BACTERIEN		65
§ 1.	Literatuuroverzicht	65
§ 2.	Eigen onderzoek	66
A.	De kleurstof van Bacterium halobium	66
1.	Oplosbaarheid	66
2.	Vergelijking met bacterio-purpurine	66
3.	Toepassing van de micro-kristallisatiemethode van Molisch	67
4.	Toepassing van de capillairanalyse van Gopelsroeder	67
5.	Wijze van isolatie	68
6.	Zuivering van de kleurstof	69
7.	Toepassing van de chromatographische analyse van Tswett	71
8.	Enkele eigenschappen van bacterio-ruberine α en β	76
9.	Berust het verschil in kleur tusschen de verschillende stammen op een verschil in kleurstof?	85
B.	De kleurstof van de beide overige gekleurde bacteriën	89

HOOFDSTUK VII. ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKHEID VAN	
VERANDERING VAN HET MILIEU VAN DE BACTERIEN	90
§ 1. Inleiding	90
§ 2. Vroegere onderzoeken	90
§ 3. Eigen proeven	95
A. <i>Bacterium halobium</i>	95
B. <i>Sarcina morrhuae</i> en <i>Bacterium trapanicum</i> . .	103
HOOFDSTUK VIII. DE KLEURLOOZE SARCINA VAN GE-	
ZOUTEN HARING	105
SAMENVATTING	109
LITERATUUR	112

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Het feit, dat er nog levende wezens worden aangetroffen in pekels van zeer hoge concentratie, is reeds lang bekend. Het zout is immers een zeer gebruikelijk conserveeringsmiddel. Dat er dan toch in gezouten levensmiddelen bederf kan optreden, heeft aanleiding gegeven tot een reeks onderzoekingen ter bestrijding hiervan. Deze onderzoekingen gelden dus pekels, waarvan keukenzout het hoofdbestanddeel uitmaakt, calcium, magnesium en sulfaat nooit geheel afwezig zijn en de reactie ongeveer neutraal of iets zuur is. Soortgelijke pekels komen tot stand in de zouttuinen, waar zout gewonnen wordt uit zeewater. Maar ook in de natuur, in woestijn- en bergstreken komen pekels voor; de zoutmeren in het Westen van Noord-Amerika, in Egypte en in Hongarije zijn hier voorbeelden van. In deze natuurlijke pekels en in de zouttuinen komen eveneens organismen voor. Waar de natuurlijke pekels het gevolg zijn van indamping van rivierwater, kan het voorkomen, dat, zooals in het Groote Zoutmeer van Utah, de samenstelling van de pekels niet veel verschilt van die der pekels, die ontstaan bij indamping van zeewater. In de natuur komen echter ook pekels voor van geheel andere samenstelling, zoo kan b.v. een groot percentage van het zout uit carbonaten bestaan, waardoor ook de pH hooger is, dan van de eerstgenoemde pekels. Zoo heeft het Searles-meer, behoorende tot het Haiweebassin (in het Westen van N.-Amerika) een pH van 9,5. Ook komen in dit meer sulfiden voor.

Nu is het een opvallend feit, dat een deel van de flora van alle genoemde pekels bestaat uit roode bacteriën: BAAS-BECKING (1931) schrijft in „Historical notes on salt and saltmanufacture”, dat ver-

schillende pekeleren een roode kleur hebben, tengevolge van het voorkomen van bacteriën. Ook haalt deze auteur zeer oude literatuur aan, waaruit blijkt, dat reeds lang de roode kleur van natuurlijke zouten bekend was (Plinius zegt, dat een van de kenmerken van het echt zijn van „nitrum” uit Lydia, de roode kleur is). Verder heeten verschillende woestijnmeren „roode meren”. Wat de pekels, die ontstaan bij het indampen van zeewater in zouttuinen betreft, hierover zegt TRESSLER (1923), dat, als de pekels bijna verzadigd is, de oplossing steeds roze wordt, zoodat deze kleur gebruikt wordt als indicator, dat de pekels geschikt is om overgebracht te worden naar de pannen, waar, na indamping van deze pekels en afvoeren van de moederloog, het ruwe zout gewonnen kan worden. Ook deze kleur is het gevolg van roode bacteriën (PEIRCE (1914)) en dat ook deze roode verkleuring reeds lang bekend is, blijkt uit hetgeen BAAS-BECKING (1931(b)) vindt in zeer oude Chineesche manuscripten, waar vermeld staat, dat het zeewater ingedampt wordt, totdat de kleur rood wordt.

De derde pekels, waarvan sprake was, is de pekels, die ontstaat bij het zouten van levensmiddelen. Dat ook hier een deel van de flora uit roode bacteriën bestaat, blijkt uit het feit, dat het rood worden van gezouten visch een veel voorkomende „bacteriënziekte” is. De vraag rijst nu, of dit rood worden van pekels het gevolg is van het optreden van dezelfde bacteriën of tenminste van dezelfde groep van bacteriën. VAN NIEL (1931) gelukte het uit de pekels van het Searlesmeer een zwavel-purperbacterie te isoleeren. BAAS-BECKING (1928) had deze bacterie reeds als oorzaak van de roode kleur van het zout en de pekels uit dit meer beschreven en er de naam van *Rhodospirillum halophilum* aan gegeven. Uit de onderzoekingen van VAN NIEL (1931) blijkt, dat de volgende condities noodig zijn voor de ontwikkeling van zwavel-purperbacteriën: volledig anaërobe omstandigheden, licht en oxydeerbare zwavel of zwavelverbindingen, als H_2S (welke stof reeds de aanwezigheid van zuurstof uitsluit) sulfiet of thiosulfaat, terwijl zij zich bij afwezigheid van dergelijke oxydeerbare anorganische verbindingen, anaëroob in het licht, ook met organische stoffen kunnen ontwikkelen. Waar nu niet te verwachten is, dat deze condities vervuld zijn in de pekels, die ontstaan, wanneer visch gezouten

wordt of in zouttuinen, is het niet waarschijnlijk, dat zwavel-purperbacteriën hierin voorkomen. Toch blijft het zeer goed mogelijk, dat men in deze pekels met de heterotrophe *Athiorhodaceae*, dus toch met purperbacteriën te maken heeft, die zuurstof kunnen verdragen, deze zelfs nodig hebben in het donker. KLEBAHN (1919) onderzocht het pigment van een roode bacterie van klipvisch d.i. gezouten en gedroogde kabeljauw. Het absorptie-spectrum, dat hij ontwierp van een alcoholische oplossing van deze kleurstof komt nu echter niet overeen met dat van de kleurstof van de purperbacteriën, de bacteriopurpurine. Hieruit zou dus volgen, dat er een fundamenteel verschil bestaat tusschen de purperbacteriën en de roode bacteriën, die voorkomen in pekelvisch. Dit nader na te gaan is het doel van dit onderzoek. Hieraan knoopt zich een onderzoek vast, ten einde iets meer te weten te komen van de morphologie en van het potentieele milieu van de bacteriën uit de pekel. Onder potentieel milieu wordt hier verstaan het complex van omstandigheden, waarbij deze organismen kunnen voorkomen (BAAS-BECKING (1931 (c))).

HOOFDSTUK II

LITERATUUROVERZICHT, BETREFFENDE DE MICRO-ORGANISMEN, DIE HET ROOD WORDEN VAN GEZOUTEN VISCH VEROORZAKEN

Er heerscht een groote verwarring aangaande het aantal en de nomenclatuur van de bacterien en andere organismen, die het rood worden van gezouten visch veroorzaken. Voor een uitvoerige bespreking van de literatuur vóór 1919, verwijs ik naar het literatuuroverzicht van KLEBAHN (1919). KLEBAHN zelf onderscheidde drie verschillende soorten aëroob te kweken bacteriën, door hem van klipvisch geïsoleerd, die hij de volgende namen gaf: *Sarcina morrhuae* FARLOW (cellen: $1,5-2,2\ \mu$ in diameter, gram-negatief, kleurstof blijft in de cel), *Micrococcus* (*Diplococcus*) *morrhuae* n. sp. (cellen: $1-1,5\ \mu$ in diameter, gram-negatief, kleurstof in de cel), *Bacillus halobius ruber* n. sp. (geen sporen, gram-negatief, kleurstof in de cel). Hij laat in het midden of *Sarcina rosacea* J.-OLSEN, waarvan de cellen slechts $0,3-0,5\ \mu$ groot zijn (JOHAN-OLSEN (1887)), *Micrococcus littoralis* (POULSEN) Kellerm., die gram-positief is (KELLERMAN (1914)), *Diplococcus gadidarum* BECKW., die gram-positief is en $0,5\ \mu$ per cel groot is (BECKWITH (1911)), *Bacillus Danteci* KRAUSE, die sporen vormt (LE DANTEC (1891)), de *Bacillus* van PEIRCE (1914), waarvan de kleurstof in de agar diffundeert en de „*Coccus du rouge de morue*” van LE DANTEC (1891), waarvan de cellen $3-5\ \mu$ groot zijn, tot deze bacterien behooren of andere soorten vertegenwoordigen.

Wat *Clathrocystis roseo-persicina* betreft, welke verschillende onderzoekers (o.a. FARLOW (1880) en PATOUILLARD (1885)) van klipvisch isoleerden, KLEBAHN (1919) meent, dat deze niet als eigenlijke veroorzaker van het rood worden mag worden opgevat.

Na KLEBAHN (1919) hebben eerst MARTEL en GERMAIN in 1921, als veroorzaker van het rood worden van gezouten visch een bacterie geïsoleerd, die zij *Micrococcus rubro-viscosus* noemden, HARRISON en KENNEDY in 1922 een bacterie, die zij *Pseudomonas salinaria* noemden, daarna CLOAKE in 1923 een *Sarcina*, een *Coccus*, een *Staphylococcus* en een staafvormige bacterie, LIEBERT en DEERNS in 1930 een *Sarcina*, een *Micrococcus* en een *Bacillus* met sporen, terwijl HANZAWA en TAKEDA in 1930 behalve kleurlooze bacteriën slechts een roode spruitende schimmel van rood gekleurde klipvisch konden isoleren, die zij *Torula Wehmeri* noemden, daar WEHMER (1897) reeds een roode gist van gezouten haring isoleerde. In 1927 geeft TATTEVIN een samenvatting, hoewel blijkt, dat hij de onderzoeken van KLEBAHN (1919), CLOAKE (1923) en PEIRCE (1914) niet kent, waarin hij de organismen, door de verschillende onderzoekers geïsoleerd, met elkaar vergelijkt. Hij concludeert, dat de roode kleur veroorzaakt wordt door de volgende organismen:

1. *Micrococcus littoralis* POULSEN (Volgens TATTEVIN = *Micrococcus rubro-viscosus* MARTEL et GERMAIN (1921) = *Coccus „du rouge de morue”* LE DANTEC (1891)).
2. *Micrococcus gadidarum* BECKWITH (1911).
3. *Sarcina littoralis* POULSEN (1879/80) (Volgens TATTEVIN = *Sarcina morrhuae* FARLOW (1880)).
4. *Bacillus rubescens* EDINGTON (1887). (Volgens TATTEVIN = *la bactérie chromogène* GAYON et CARLES (1885) = *le bacille érythrogène* of „*du rouge de morue*” LE DANTEC (1906)).
5. *Bacille rouge de Terre-Neuve* LE DANTEC (1891) = *Bacillus Danteci* KRAUSE (1896).
6. *Clathrocystis roseo-persicina* COHN (1875).

Daar KLEBAHN (1919) van meening is, dat *le bacille érythrogène* van LE DANTEC dezelfde is als *Bacillus halobius ruber* KLEBAHN, wordt bij dit lijstje door KLEBAHN alleen *Micrococcus (Diplococcus) morrhuae* toegevoegd, of deze moet dezelfde zijn als *Micrococcus littoralis* POULSEN, die echter volgens KELLERMAN (1914) grampositief is. Daar TATTEVIN niet het onderzoek van MAURIAC (1886/89) vermeldt, die een *Bacillus* en een *Micrococcus* isoleerde van klip-

visch, die volgens hem alleen, als zij te zamen voorkomen, de roode kleurstof produceeren, is het mogelijk, dat ook deze twee organismen aan het lijstje moeten worden toegevoegd. Van meer belang is *Pseudomonas salinaria* HARRISON et KENNEDY. Deze bacterie werd van klipvisch geïsoleerd en komt geheel overeen met *Bacillus halobius ruber* KL. Daar HARRISON en KENNEDY (1922) het onderzoek van KLEBAHN (1919) niet kenden, kwamen zij ertoe, deze bacterie een nieuwe naam te geven. Nog verwarrender maakt BERGEY (1930) het, als hij de bacterie omdoopt in *Serratia salinaria*, dus een verwantschap met *Serratia marcescens* BIZIO (liever gezegd *Bacillus prodigiosus*) aanneemt. Wat de bacteriën van CLOAKE (1923) en LIEBERT en DEERNS (1930) betreft, het blijkt, dat deze zeer goed overeenkomen met reeds beschreven en in het lijstje van TATTEVIN (1927) vermelde bacteriën. CLOAKE (1923) vermeldt n.l., dat de door hem geïsoleerde *Sarcina*, *Coccus* en *Staphylococcus* waarschijnlijk één en dezelfde soort zijn, deze kan dus dezelfde zijn, als *Sarcina morrhuae* FARLOW, hoewel volgens CLOAKE de bacterie gram-positief is. De beschrijving van CLOAKE (1923) van de staafvormige bacterie, door hem van gezouten visch geïsoleerd, komt volkomen overeen met die van KLEBAHN's *Bacillus halobius ruber*. LIEBERT en DEERNS (1930) die haring, gezouten *Cardium edule* en zeezout onderzochten, isoleerden drie verschillende bacteriën, waarvan de *Sarcina* en de *Coccus* zeer sterk geleken op KLEBAHN's *Sarcina* en *Micrococcus*. Wat hun sporenvormende bacterie betreft, deze kan gelijk zijn aan *Bacillus Danteci* KRAUSE. Er blijft dus nog over de „*Bacillus*” van PEIRCE (1914). Deze bacterie, die PEIRCE niet van gezouten visch, maar uit zeezout van de zouttuinen bij Redwood City (California) isoleerde, waarmee hij echter ook klipvisch kon infecteeren, doet in afmetingen (3,2 bij 3,5 μ) meer aan een *Coccus* denken. Daar de afmetingen te groot zijn voor een van de *Cocci* van het lijstje en Peirce vermeldt, dat de kleurstof in de agar diffundeert, wil ik voorloopig deze bacterie aan het lijstje toevoegen.

Het lijstje micro-organismen, die als de oorzaak beschreven zijn van „roode” gezouten visch, wordt dus:

1. *Micrococcus littoralis* POULSEN.
2. *Micrococcus gadidarum* BECKWITH.

3. *Micrococcus (Diplococcus) morrhuae* KLEBAHN.
4. *Sarcina morrhuae* FARLOW.
5. *Bacillus halobius ruber* KLEBAHN.
6. *Bacillus Danteci* KRAUSE.
7. *Bacillus* van MAURIAC.
8. *Micrococcus* van MAURIAC.
9. *Bacillus* van PEIRCE.
10. *Clathrocystis roseo-persicina* COHN?
11. *Torula Wehmeri* HANZAWA et TAKEDA.

Het blijft echter hoogstwaarschijnlijk, dat vele van deze bacteriën identiek zijn. Later zal hierop nader worden ingegaan.

HOOFDSTUK III

EIGEN ISOLATIES EN WIJZE VAN KWEEKEN

Van een reederij ontving ik eenige z.g. roode haringen in een tonnetje met pekel. Van buiten was aan deze haringen weinig waar te nemen, maar het bleek dat hom en kuit geheel rood waren gekleurd. Stukken van deze organen werden in steriele petrischalen gelegd op een laag van vochtig keukenzout, dat eveneens van te voren gesteriliseerd was. Ook werden gedeelten van hom en kuit in schalen op een vaste voedingsbodem uitgelegd, die uit 30 % NaCl ¹⁾, 1 % pepton „Poulenc” en 2½ % agar bestond en een neutrale of eenigszins alkalische reactie vertoonde. Deze reactie is noodzakelijk voor het verkrijgen van de noodige vastheid van de voedingsbodem.

Verder werd in twee petrischalen over een vaste bodem van dezelfde samenstelling, een entnaald uitgestreken, die bij de eerste schaal gedoopt was in een verzadigde oplossing van NaCl, die met stukjes hom of kuit geschud was en bij de tweede in de pekel, waarin de haringen zich bevonden. Daar in de literatuur over de roode vischbacteriën meermalen vermeld wordt, dat deze „ziekte” slechts optreedt, als de visch aan tamelijk hoge temperatuur wordt blootgesteld, in de zomer of bij verzenden naar Zuidelijke landen (BECKWITH (1911), CLOAKE (1923), HANZAWA en TAKEDA (1930) e.a.) en ook de optimum temperatuur zoowel voor *Sarcina's* als bacillen bij $\pm 37^\circ$ gevonden wordt (CLOAKE (1923), KLEBAHN (1919)), werden alle petrischalen met entmateriaal in een thermostaat bij een temperatuur van 37° geplaatst. Zoowel op het steriele zout als op de voedingsbodem was na ongeveer een week een cultuur van roode bac-

¹⁾ Hieronder wordt in dit onderzoek steeds verstaan 30 gram Na Cl (=23 gww%) opgelost in 100 cc water.

teriën ontstaan. De platen, waarop entmateriaal was uitgestreken, bevatten na ongeveer dezelfde tijd vele roode ronde kolonies. Volgens werden stukken klipvisch, die mij door tussenkomst van Professor H. KLEBAHN als geïnfecteerd zijnde met roode bacteriën uit Bergen (Noorwegen) waren toegezonden, op dezelfde manier behandeld. In tegenstelling met de haring was aan deze stukken met het bloote oog weinig of niets waar te nemen.

Toch ontstonden ook hier culturen van roode bacteriën op de voedingsbodems.

Evenzoo verkreeg ik op dezelfde gemakkelijke wijze een cultuur van roode bacteriën uit Trapani-zout, dat geheel rood gekleurd was en dat eveneens van vischzouterijen in Bergen afkomstig was. Het bleek, dat al deze bacteriën staafvormig waren en dat degene van de haring en de klipvisch in grootte en kleur zeer veel op elkaar geleken, terwijl de bacteriën uit Trapani-zout geïsoleerd meer oranje van kleur waren en kleiner van afmeting. Het gelukte dus de bacteriën op een bodem, waarin als organische stof slechts pepton aanwezig was, te kweken. De vroegere onderzoekers hebben allen vischbouillon of vischbouillonagar gebruikt, waaraan zij keukenzout toevoegden, terwijl KLEBAHN (1919) de bacteriën ook zeer goed op paardenserum met 1 % pepton of met 1 % pepton en 1 % druiven-suiker kon kweken. Hij had geen resultaat met albumine. Waarschijnlijk geven de bacteriën de voorkeur aan pepton boven eiwit. Ook LIEBERT en DEERNS (1930) merken op, dat als men bij de gebruikelijke vischbouillon trypsine voegt, de roode bacteriën er zich beter in ontwikkelen.

LIEBERT (1924) wijst er op, dat ook het eiwit van de pekelharing gedeeltelijk is omgezet door het enzym uit de *Appendices pylorici*, die bij het kaken niet worden verwijderd. Hij neemt waar, dat de werking van het enzym door het zout niet wordt beïnvloed.

Het gelukte niet een roode *Sarcina* uit het zout of van de visch te isoleren. Culturen van *Sarcina morrhuae* FARLOW ontving ik echter van Professor A. J. KLUYVER en Ir. F. LIEBERT. Deze waren door den laatsten geïsoleerd. Eveneens verkreeg ik een cultuur van een staafvormige roode bacterie van Professor A. J. KLUYVER, die zeer veel overeenstemming vertoonde met de roode staafvormige

bacterie van haring en klipvisch. Deze was door Dr. L. E. DEN DOOREN DE JONG van gezouten kabeljauw geïsoleerd. Wel ontwikkelden zich nog op de agarbodem (30 % NaCl, 1 % pepton) uit de haring een kleurloze *Sarcina* (welke in het laatste hoofdstuk behandeld zal worden) en een schimmel, die tot *Torula epizoa* CORDA bleek te behooren. Ook werd in de pekel, waarin de haringen zich bevonden, bij microscopisch onderzoek een gistachtig spruitende schimmel waargenomen.

Prof. Dr. H. KLEBAHN, Prof. Dr. A. J. KLUYVER, Ir. F. LIEBERT en Dr. L. E. DEN DOOREN DE JONG dank ik op deze plaats ten zeerste voor het mij doen toekomen van geïnfecteerd materiaal of culturen.

HOOFDSTUK IV

BESCHRIJVING VAN DE GEKWEekte ROODE EN ORANJE BACTERIËN EN VERGELIJKING VAN DEZE MET DE BACTERIËN DOOR VROEGERE ONDER- ZOEKERS BESCHREVEN

§ 1. *De staafvormige roode bacterie van klipvisch, haring en gezouten kabeljauw.*

A. *Onderscheiding in verschillende stammen.*

De laag bacteriën, die op de voedingsbodem, waarop stukjes hom en kuit van haring gebracht waren, was ontstaan, was aanvankelijk geheel doorzichtig rood gekleurd. Na eenige weken trad hierin echter verandering op: een gedeelte van de cultuur werd troebel en rose van kleur. Een soortgelijke verandering was in de kolonies, die door uitstrijken van entmateriaal uit roode haring verkregen waren, opgetreden. Twee groepen van kolonies kwamen voor: de 1ste groep bestond uit doorzichtige, de 2e groep uit ondoorzichtige kolonies. Deze ondoorzichtigheid is het gevolg van het optreden van een of meer lichaampjes in de bacterie-cel. Deze lichaampjes zullen in het volgende hoofdstuk behandeld worden. De doorzichtige kolonies kan men onderverdeelen in oranjeroode, roode en paarsroode; de ondoorzichtige in kolonies, die roze, lila (in een meer roode en een meer blauwe tint) en bijna wit van kleur zijn (men moet hierbij wel onderscheid maken tusschen wit en kleurloos). Het bleek, dat men hier van verschillende stammen kan spreken, die in alle eigenschappen overeenkomen, behalve in de kleur en in het al of niet voorkomen van de genoemde lichaampjes in de cel. De eigenschappen van de stammen bleken bij verder kweken constant te zijn, ook wanneer een suspensie van de bacteriën van een der stammen opnieuw werd

uitgestreken over een vaste voedingsbodem: er ontstonden dan slechts kolonies van de kleur der moederkolonie. Wel was weer hetzelfde verschijnsel op te merken als bij de oorspronkelijke isolaties: de ondoorzichtigheid bij de stammen uit groep II trad pas op, als de cultuur zich reeds geheel of bijna geheel ontwikkeld had. Een uitzondering maakte hierop de bijna witte stam, waarbij de totale ondoorzichtigheid n.l. het „witte” uiterlijk reeds zeer vroeg in de ontwikkeling optrad. Volgens de uitstrijkmethode werden van alle stammen reinculturen verkregen. Er werden zeven verschillende stammen uit haring geïsoleerd. Ik wil deze met een nummer aanduiden, ontleend aan de Code des couleurs van KLINCKSIECK en VALETTE (1908).

Op vaste bodem:

Stam 1) Steeds doorzichtig roodoranje (77 of 81).

Stam 2) Steeds doorzichtig roodoranje (52)

Stam 3) Steeds doorzichtig paarsrood (583).

Stam 4) Oorspronkelijk doorzichtig roodoranje, later ondoorzichtig rose (56,61 of 66 al naar mate van ondoorzichtigheid).

Stam 5) Oorspronkelijk doorzichtig paars, later ondoorzichtig lila (596).

Stam 6) Oorspronkelijk doorzichtig kleurloos, daarna doorzichtig bruin (28), later ondoorzichtig lila (541 of 546 naar mate van ondoorzichtigheid).

Stam 7) Oorspronkelijk eenigszins doorzichtig kleurloos, daarna ondoorzichtig wit, later ondoorzichtig rose of lila (578 A of B, 553 A of B, 528 A of B, 503 A of B, 478 A of B naar meer of mindere mate van witheid).

In vloeibare voedingsoplossing, waarin de bacterie zich goed ontwikkelde, is de verschillende kleur van de stammen binnen een groep even goed, het verschil in doorzichtigheid tusschen de twee groepen echter moeilijker dan op vaste bodem waar te nemen.

Dit is het gevolg van het feit, dat elke bacterie-cultuur in een vloeistof deze een zekere troebelheid verleent. Alleen stam 7) valt op door het melkachtig witte uiterlijk van de cultuur.

Nu moet men niet denken, dat binnen een stam nooit verschillen in kleurnuance optreden; bij overenten waren deze echter nooit constant. Zoo kwam het voor, dat oude culturen bijna geheel de

kleur verloren, ook kwamen meer paars en meer rood getinte culturen van één stam voor. Ook bleek (toen de bacteriën in groote hoeveelheid in petrischalen werden gekweekt), dat onder gelijke omstandigheden en dezelfde ouderdom de bacteriën van $\pm$ één op de 20 platen de kleurstof geheel konden verliezen of dat de kleur geheel afweek (b.v. bijna blauw was). Ook deze afwijkingen waren niet constant bij overenting. Bij het vergelijken van de kleur van de culturen van 2 petrischalen moet men er wel op letten met een zelfde dikte van de laag bacteriën te doen te hebben. Het verschijnsel, dat EYKMAN (1904) waarnam, n.l. dat de groei van bacteriën sterk afhankelijk is van de dikte van de laag voedingsbodem, kwam bij deze wijze van kweken, waarbij de plaat geheel bedekt is met de cultuur, sterk tot uiting. Waarschijnlijk wordt dus ook door deze bacterie een stof afgescheiden, die in de agar diffundeert en die de ontwikkeling van de eigen soort remt, zooals EYKMAN (1904) bij verschillende bacteriën, b.v. *Bacterium coli* aantoonde. Bij stam 4) trad nu echter een verandering van kleur op, die constant scheen: in een cultuurbuis met vaste bodem waren gedeelten van de cultuur, die rechtlijnig afgegrensd waren, bruin van tint en bleven helder, doorzichtig.

Het bleek, dat de lichaampjes bij de bacteriën in deze helder bruine gedeelten niet aanwezig waren. Bij overenten uit deze gedeelten, bleef de kleur van de cultuur eenige tijd constant, totdat een cultuur regelmatig langs de geheele rand weer ondoorzichtig begon te worden, tengevolge van opnieuw vorming van de genoemde lichaampjes.

Uit klipvisch gelukte het mij slechts één stam te isoleeren en ook de bacterie-cultuur van gezouten kabeljauw bleek een reincultuur te zijn van één stam. De eerstgenoemde was dezelfde als stam 5) uit haring, de laatste had een kleur, die tusschen stam 4) en 5) uit haring in staat. Deze stam 8) is oorspronkelijk doorzichtig roodoranje later ondoorzichtig rood (staaltje 41 of 46 van de Code, naar mate van ondoorzichtigheid).

Het feit, dat de kleur van de bacterie in de loop van de ontwikkeling kan veranderen, geeft misschien de mogelijkheid na te gaan hoe de kleurstof in de bacterie gevormd wordt. Ik spreek hier alleen

van de overgang van kleurloos over bruin naar lila bij stam 6), daar bij deze stam, in tegenstelling tot de andere uit groep II, de kleurverandering niet alleen het gevolg is van het troebel worden, tengevolge van het optreden van de bepaalde lichaampjes in de cel.

B. Enkele morphologische en physiologische gegevens.

1. Microscopisch onderzoek.

De bacteriën werden waargenomen in een verzadigde NaCl oplossing. Zij zijn staafvormig en vormen geen sporen. De afmetingen van bacteriën uit jonge culturen bedragen: $0,6-0,9 \mu$ bij $2-6 \mu$ op vaste voedingsbodem, terwijl in vloeibaar milieu ook langere voorkomen ($0,6-0,9 \mu$ bij $2-27 \mu$). KLEBAHN (1919) vond voor *Bacillus halobius ruber* $0,5-0,8 \mu$ (op vaste) en $0,5-0,8 \mu$ bij $2-45 \mu$ (in vloeibare voedingsbodem). De bacterie voert een voorwaartsche schommelende beweging uit. Ook KLEBAHN (1919) dacht eigenbeweging bij *Bacillus halobius ruber* waar te nemen. Daar het hem echter niet gelukte trilharen te kleuren, nam hij aan, dat de beweging toch slechts op moleculaire beweging berustte.

HARRISON en KENNEDY (1922) gelukte het daarentegen trilharen bij „*Pseudomonas salinaria*” door kleuring aan te toonen. Het bleek, dat deze bacterie lophotrich was. Evenals KLEBAHN (1919) bij *Bacillus halobius ruber* en HARRISON en KENNEDY (1922) bij „*Pseudomonas salinaria*” waarnamen, gedragen de bacteriën zich tegenover gram-kleuring negatief. Deze werd volgens het voorschrift uit de „Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria (Society of American Bacteriologists)” uitgevoerd. Op hetzelfde preparaat werden gram-positieve staphylococci zeer goed gekleurd. De fixatie geschiedde in de vlam, terwijl de bacteriën van te voren in een verzadigde oplossing van NaCl over het dekglas waren uitgestreken. Tegenkleuring met saffranine verleende de bacterie een roode kleur. Ook werden gekleurde preparaten verkregen met ijzeraluin en HEIDENHAIN's haematoxyline.

2. Enkele physiologische gegevens.

Zooals in het vorige hoofdstuk reeds besproken is, werd de bacterie

geïsoleerd op een voedingsbodem, die zeer veel NaCl bevatte. Evenmin als het KLEBAHN (1919) en HARRISON en KENNEDY (1922) gelukte met de door hen geïsoleerde bacteriën, gelukte het mij de bacterie op gewone voedingsbodems te kweken.

KLEBAHN (1919) trachtte *Bacillus halobius ruber* aan bodems, die een geringer percentage NaCl bevatten, te gewinnen, door trapsgewijze de concentratie van het zout in de bodem te verlagen. Het gelukte hem niet de bacterie op een bodem met minder NaCl dan ongeveer 12 % te kweken. Ook ik kon op dezelfde wijze geen ontwikkeling van de staafvormige roode bacterie verkrijgen op een bodem met minder NaCl. In beide gevallen werd echter uitgegaan van bacteriën, die reeds eenige tijd in cultuur waren. Door de onderzoekingen van BAARS (1930) is echter gebleven, dat dezelfde bacterie een grooter aanpassingsvermogen kan vertoonen, wanneer deze in de natuur voorkomt, dan wanneer zij geruime tijd in een kunstmatig milieu is gekweekt. Het gelukte deze auteur n.l. aan te toonen, dat *Vibrio aestuarii* en *Vibrio thermodesulfuricans* slechts aanpassingsvormen zijn van *Vibrio desulfuricans*. Jonge culturen van de halophile *aestuarii* en de thermophile *thermodesulfuricans* konden trapsgewijze gewend worden respectievelijk aan een zoutvrij milieu en een temperatuur van 30°, zoodat zij niet meer onder de voor hen oorspronkelijk noodzakelijke omstandigheden konden groeien (respectievelijk bij 3 % NaCl en bij 55°) en dus in eigenschappen overeenkwamen met *Vibrio desulfuricans*. Omgekeerd kon *Vibrio desulfuricans* langzamerhand overgevoerd worden in *Vibrio aestuarii* of *thermodesulfuricans*. Waarom het hier gaat, is echter het feit, dat met bacteriën, die reeds eenige tijd in cultuur waren, deze proeven veel moeilijker waren uit te voeren. Met pas geïsoleerde vischbacteriën moet dus de proef van KLEBAHN (1919) herhaald worden.

In een vloeibaar milieu (30 % NaCl, 1 % pepton) ontwikkelt de bacterie zich eveneens zeer goed: de oplossing wordt troebel, terwijl zich aan de oppervlakte een huidje vormt. De temperatuur, waarbij optimale ontwikkeling van de bacterie plaats heeft, is 37° C. Gisting heeft niet plaats, als aan de 30 % NaCl en 1 % pepton 2 % saccharose, maltose of glucose wordt toegevoegd, hoewel de groei zeer goed is (in een oplossing met glucose wordt geen zuur

gevormd). De bacteriën vormen geen indol, wanneer tryptophaan aanwezig is. Daar een gelatineoplossing niet stijf wordt, wanneer een groot percentage NaCl aanwezig is, kon niet worden nagegaan of de bacterie gelatine doet vervloeien. Nitraten worden gereduceerd tot nitrieten. Wat het gedrag ten opzichte van zuurstof betreft: de bacterie groeit niet onder de oppervlakte van agar (zoomin in het licht, als in het donker) of in de gesloten arm van een gistingskolfje. Ook HARRISON en KENNEDY (1922) namen dit waar bij de „*Pseudomonas*”. Katalase is aanwezig.

C. *Vormveranderingen onder invloed van wisselende uitwendige omstandigheden.*

1. *Literatuur.*

Als eerste factor, welke vormverandering bij bacteriën te weeg brengt, moet verandering van de osmotische druk van het milieu genoemd worden. FISCHER (1900, 1903) ging de invloed van zoutoplossingen van verschillende concentratie na. Hij vond, dat bij verschillende bacteriën o.a. *Spirillum undula*, *Vibrio cholerae*, die in een zoutvrij milieu zijn gekweekt, plasmolyse optreedt bij overbrenging in een zoutoplossing: het protoplasma laat van de wand los en trekt zich samen. Omgekeerd nam hij bij overbrenging van een zouthoudend in een zoutvrij milieu een verschijnsel waar, dat hij plasmoptyse noemt: de bacteriën zijn geheel vervormd, bollen en knotsvormige bacteriën komen in de vloeistof voor. Deze zijn volgens FISCHER (1900, 1903) ontstaan, doordat een deel van het protoplasma, dat door osmose water heeft opgenomen, door barsten, die in de wand ontstaan zijn of op de plaatsen, waar de trilharen ontspringen, naar buiten komt. Wanneer dit protoplasma met de bacterie in verbinding blijft, treden knotsvormige bacteriën op; de bollen zijn volgens hem uitgetreden protoplasma-massa's, die zich van een wand hebben voorzien. Deze verklaring van de vervormde bacteriën is gebleken onjuist te zijn. Nooit zijn door latere onderzoekers meer dergelijke „Plasmoptyse-Kugeln” waargenomen (zie MEYER (1905), RAICHEL (1928)). Wel gelukte het RAICHEL (1928)

door overbrenging van *Spirillum undula* in gedistilleerd water of glycerine de membraan van deze bacterie te doen barsten, de grillige vormen van FISCHER (1900, 1903) ontstonden echter door opzwellling bij minder groote verhooging van de turgordruk van de spirillen. Ook BAARS (1930) nam waar, dat *Vibrio aestuarii*, die aangepast is aan een medium met 3 % NaCl, bij overbrenging in een milieu met 1 % NaCl sterk opzwelt.

Iets anders verkreeg MATZUSCHITA (1900), die bij vele zoetwaterbacteriën onderzocht, of ze op zoutbevattende media kunnen groeien. Hij vond, dat vele bacillen rond, knotsvormig of spirilvormig kunnen worden in milieu's met eenige percenten NaCl. De dikte is in het algemeen het grootst bij 4—6 %; bij 8—10 % neemt deze weer af. Cocci veranderen over het algemeen weinig van vorm onder invloed van zout in de voedingsbodem.

Enkele *Micrococci* (b.v. *rubefaciens*) vertoonen echter een opvallend verschijnsel: bij 0—1 % NaCl is de bacterie rond, terwijl op een bodem met 1,5—8,5 % NaCl naast enkele ronde bacteriën, rechte of gekromde staafjes voorkomen. Ook BARANIK-PIKOWSKY (1927) vond moeilijk te verklaren vormveranderingen bij bacteriën, die bij verschillende concentraties van zout kunnen groeien. Een van de door hem geïsoleerde soorten is in water en in een oplossing van Limanzout (tot 25 %) staafvormig. In 26 en 28 % echter gezwollen en ovaal. Ook andere geïsoleerde soorten nemen in dikte toe bij verhooging van de concentratie.

Van belang is, dat KLEBAHN (1919) een opzwellling tengevolge van verlaging van de osmotische druk van het milieu waarnam bij *Bacillus halobius ruber*. KLEBAHN (1919) vervolgde de veranderingen, die *Bacillus halobius ruber* ondergaat, wanneer hij bij een druppel geconcentreerde NaCl-oplossing met bacteriën onder het dekglas, voorzichtig water laat toetreden. In de grenslaag tusschen het water en de zoutbevattende oplossing kon hij aan een en dezelfde cel de op elkaar volgende stadia van opzwellling waarnemen. In de grenslaag kwamen voor: geheel vernietigde bacteriën, overgangsvormen en onveranderde bacteriën. Deze overgangsvormen vertoonen het beeld, zooals figuur 1 het weergeeft. KLEBAHN (1919) beschrijft het ontstaan van dergelijke ten deele of geheel opgezwollen staafvormige

bacteriën als volgt: „Beim Übergang in die Lösung von geringerem Salzgehalt beginnt an irgendeiner Stelle der Membran, die als ein Ort geringster Widerstandsfähigkeit angesprochen werden musz,

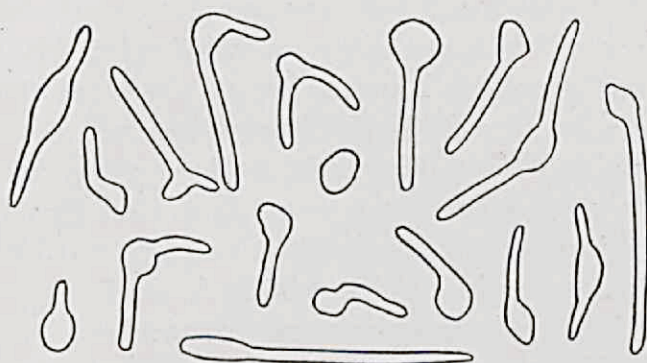


Fig. 1. (Naar Abb. 2 Klebahn (1919) blad. 37).

ein Aufquellen der Zelle" en verder: „Je nach dem von der Konzentration der umgebenden Flüssigkeit abhängigen Grade der Einwirkung, bleibt es bei diesen Veränderungen oder es werden die ganzen Zellen in Mitleidenschaft gezogen und zu mehr oder weniger rundlichen Kügelchen umgestaltet. Der letzte Schritt ist das völlige Verquellen und Auflösen der Kügelchen". KLEBAHN (1919) kon nooit uittreden van protoplasma waarnemen. Wanneer bollen in de preparaten voorkwamen, waren dit geheel opgezwollen staafjes. Ik moet hier vermelden, dat CLOAKE (1923) bij de staafvormige bacteriën, die hij van gezouten visch isoleerde, spreekt van groot polymorfisme. De afbeeldingen van CLOAKE (1923) komen zeer goed met de figuur van KLEBAHN overeen (zie figuur 1). Waarschijnlijk zullen ook hier deze vormen door het overbrengen in pekkel van geringere concentratie dan waarbij ze zich ontwikkeld hebben, zijn opgetreden. Er werd dan ook in hoofdstuk II reeds aangenomen, dat CLOAKE hier met *Bacillus halobius ruber* te doen had. KLEBAHN (1919) schrijft het opzwellen bij verlaging van de concentratie aan osmotische werking toe. Waar deze opzwellingen op bepaalde plaatsen sterker zijn dan op andere plaatsen, neemt hij aan, dat op deze plaatsen de

wand minder weerstand biedt. Het is echter de vraag of men de verschijnselen, die FISCHER (1900, 1903) en RAICHEL (1928) verkregen, mag vergelijken met de resultaten met deze bacterie. Het is een groot verschil of men te doen heeft met bacteriën, die achtereenvolgens de invloed ondervinden van oplossingen, die slechts in enkele percenten NaCl van elkaar verschillen, zooals dit met de bacteriën van FISCHER en RAICHEL het geval was, of dat bacteriën van een nagenoeg verzadigde NaCl oplossing overgebracht worden in oplossingen van een concentratie, die helft zoo groot.

BAAS-BECKING (1930) oppert de mogelijkheid bij *Dunaliella* (eveneens een organisme, dat in pekels wordt aangetroffen), dat het protoplasma een zoo groote imbibitiekracht heeft, dat het organisme hierdoor bestand is tegen de osmotische wateronttrekking van het milieu. Onder imbititiekracht moet worden verstaan, de kracht, waarmee het protoplasma imbibitiewater tracht op te nemen. BAAS-BECKING (1930) neemt dus aan, dat een vacuole niet voorkomt of tenminste niet verantwoordelijk is voor de turgor van de cel. Dus niet: de zuigkracht van de cel (zuigkracht van het celvocht—wanddruk) = de osmotische druk van het milieu, maar de imbibitiekracht—wanddruk = de osmotische druk van het milieu.

BAAS-BECKING (1930) haalt verschillende voorbeelden aan, ten bewijze, dat het zeer goed mogelijk is, dat een dergelijke hoge imbibitiekracht aanwezig is. Het is slechts noodig, dat het protoplasma sterk gedehydrateerd is. Zoo toonde Ludwig reeds in 1849 aan, dat een grondig gedroogde dierlijke membraan in staat is, water te onttrekken aan een verzadigde NaCl-oplossing. Verklaart men het bestand zijn van *Bacillus halobius ruber* tegen de hoge osmotische druk van het milieu, op dezelfde wijze als BAAS-BECKING (1930) dit deed voor *Dunaliella*, dan moet men dus aannemen, dat ook dit organisme slechts uit semi-permeabel protoplasma met een zeer hoge imbibitiekracht zonder vacuole bestaat. Dat het bij bacteriën niet nieuw is, slechts protoplasma zonder vacuole aan te nemen, volgt uit het onderzoek van HYLKEMA (1916), die aanneemt, dat dit bij alle niet plasmolyseerbare bacteriën het geval is. Deze auteur onderzocht of de meening van FISCHER (1903), dat bacteriën, die niet plasmolyseerbaar zijn, meer permeabel voor de osmotica zijn,

dan bacteriën, die wel plasmolyse kunnen vertoonen, juist is. Hij kwam tot het resultaat dat dit niet het geval is: plasmolyseerbare bacteriën kunnen evenveel of meer van een zout in de cel opnemen dan niet plasmolyseerbare bacteriën. Hij is er van overtuigd, dat het al of niet plasmolyseeren teruggevoerd moet worden op het al of niet aanwezig zijn van een vacuole.

Bacillus halobius ruber moet dus tot de niet plasmolyseerbare bacteriën behoren. Dit is zeer goed in overeenstemming met wat FISCHER (1903) vond, n.l. dat vele bacteriën, die in staat zijn op agar met 8—10 % NaCl te groeien, zooals *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* e.a. tot de niet plasmolyseerbare bacteriën behoren, terwijl bacteriën als *Vibrio cholerae* en vele andere, die niet groeien op een bodem met meer zout dan 5 % NaCl, tot de plasmolyseerbare bacteriën behoren. Hoewel KLEBAHN (1919) van osmose spreekt, stelt hij zich voor, dat bij *Bacillus halobius ruber* het protoplasma de geheele cel vult en dat het celvocht, als drager van de osmotische druk, zich in kleine druppeltjes in dit protoplasma bevindt of hierin slechts geïmbibeerd is. In het laatste geval mag hij zeker niet van zuivere osmose spreken. Kan *Bacillus halobius ruber* nu toch een opzwellling bij verlaging van de concentratie van het milieu verkrijgen, als deze niet plasmolyseerbaar is? Men moet hierbij echter weer niet vergeten, dat het al of niet plasmolyseeren van bacteriën werd nagegaan aan zoetwaterbacteriën, die in oplossingen van enkele percenten zout werden gebracht.

Wanneer buiten het nagenoeg semi-permeabele protoplasma van de niet plasmolyseerbare bacteriën van FISCHER (1903) een veel sterker geconcentreerde oplossing was gebracht, dan zouden ook deze bacteriën water hebben moeten afstaan. De osmotische wateronttrekking van de omgeving zou zoo groot zijn, dat het protoplasma als lyophiel kolloïd een gedeelte van het gebonden water niet meer zou hebben kunnen vasthouden. Omgekeerd zal het protoplasma meer imbibitiewater op kunnen nemen (waardoor de imbibitiekracht verlaagd wordt) en opzwellen, als het in een oplossing wordt gebracht, die een geringere osmotische druk heeft dan waarmee het protoplasma aanvankelijk in evenwicht was. Deze opzwellling nu is veel geringer (tengevolge van het lyophiele gedrag van het proto-

plasma!) dan degene, die door zuivere osmose zou moeten plaats hebben. Dit komt zeer goed overeen met de ervaringen aan *Bacillus halobius ruber* gedaan.

Bij deze redeneering was dus aangenomen, dat het protoplasma, tenminste de buitenste laag hiervan, semi-permeabel is. Is het echter doorlaatbaar voor NaCl, ook dan zal bij overbrenging uit een milieu met 30 % NaCl in een met 15 % een volume-toename van het protoplasma kunnen optreden, daar electrolyten (in de volgorde van de lyotrope reeks) invloed hebben op het watergehalte van lyophile kolloïden. Deze invloed is verschillend voor verschillende kolloïden. Zoo is een verzadigde oplossing van NaCl niet in staat albuminen, maar wel globulinen uit het bloedserum uit te zouten. Nu is echter de in laatste tijd door PLOWE (1931) e.a. zeer waarschijnlijk gemaakt, dat er, tenminste bij hogere planten, een membraan aan de buitenkant van het protoplasma voorkomt. Is dit bij deze bacteriën het geval, dan moet men bij doorlaatbaarheid van deze membraan voor NaCl, rekening houden met het evenwicht van DONNAN, wanneer n.l. NaCl aan de kolloidale deeltjes van het protoplasma wordt geadsorbeerd. Bestaat een dergelijk evenwicht, dan kan de concentratie van NaCl binnen en buiten verschillen, ondanks de doorlaatbaarheid voor NaCl.

Toch blijft het moeilijk uit te maken, wat bij *Bacillus halobius ruber* het geval zal zijn (vacuole of geen vacuole). Zuivere osmose d.w.z. een vacuole met een zuiver semi-permeabele wand, blijft uitgesloten: 1ste zou de osmotische druk van het celvocht, wil de bacterie in een verzadigde NaCl-oplossing zijn turgor behouden nog hoger moeten zijn dan die van een verzadigde NaCl-oplossing, 2de zou de cel een zoo groote hoeveelheid water moeten opnemen bij overbrenging van een oplossing van 30 % NaCl in een met 15 %, dat deze zou moeten barsten. Het is echter mogelijk, dat het protoplasma om de vacuole voor NaCl permeabel is, echter in mindere mate dan voor water, zoodat de eerste tijd toch een opzwellling in oplossingen met een geringere concentratie dan de oorspronkelijke plaats heeft.

Behalve verandering van de osmotische druk van het milieu kunnen ook andere wisselende uitwendige omstandigheden vormver-

andering bij bacteriën teweegbrengen. BAARS (1930) zag zeer afwijkende vormen optreden, wanneer hij *Vibrio desulfuricans* uit het gebruikelijke medium ($pH = 7,8$) overentte in media, waarin geen krijt aanwezig was. De omzetting door deze sulfaatreducerende bacterie uitgevoerd, maakte nu het milieu steeds zuurder. De bacteriën in deze zure voedingsmedia konden aan één eind tot een bol opgezwollen zijn, terwijl aan het andere einde de gewone afmeting behouden was gebleven. Eveneens kwamen bacteriën, die aan beide uiteinden tot een bol zijn opgezwollen, voor. Ook algeheele opzwellings werd waargenomen, welke sterk geleek op de veranderingen door hem aan de zelfde bacteriën in hypotonische oplossingen waargenomen. Men ziet dus, dat opzwellingen niet altijd tengevolge van osmotische werkingen optreden.

OESTERLE en STAHL (1929) gingen de invloed na van verschillende uitwendige omstandigheden op de vorm van *Bacillus mycoides*. Deze bodembacterie, waarvan de exemplaren in kettingen geordend voorkomen, vormt rhizoid vertakte kolonies op agar, is gram-positief en vormt sporen. In bodemextract of vloeistof, waarin rotting had plaats gehad (beide zeer nauwkeurig kiemvrij gemaakt door filtratie) ontstond een vorm, die gladde kolonies op agar vormt en waarvan de staafjes vrij liggen en bewegen. Op de gebruikelijke voedingsagar kon weer uit deze vorm de oorspronkelijke langzamerhand terug ontstaan. Onder invloed van zonlicht kon een gram-negatieve vorm optreden. Uit een sporenloze vorm, die spontaan in segmenten op agar ontstond, kon in zonlicht een oranje-roode vorm optreden, waarvan de enkele bacteriën de vorm van coccen hebben en die zelfs op aardappel *Sarcina's* kan vormen.

De eerstgenoemde vorm, die gladde kolonies op agar vormt, werd o.a. ook onder invloed van meer of minder geconcentreerde oplossingen van NaCl of soda verkregen. STAHL (1929) ging als volgt te werk: de bacterie werd in bouillon met verschillende concentratie van NaCl of soda (1—32 %) geënt. Hierin ontwikkelde zij zich op de bodem. Na eenige tijd werd uit de bouillon weer op gewone agar geënt, waarop zich dan een nieuwe vorm ontwikkelde, waaruit langzamerhand weer de oorspronkelijke typische *mycoides* ontstond. Na zes maanden in zoutbevattende bouillon verbleven te zijn, werd een

deel gefiltreerd door een bacteriefilter. Het filtraat werd op gewone agar geënt, wat ten gevolge had, dat de „gladde” vorm ontstond, waaruit zich na eenige tijd weer de typische *mycoides* terugvormde. De nieuwe vormen komen geheel overeen met *Bacillus effusus*, *olfactorius* en *nanus*.

VAN NIEL (1931) ging de invloed na van verschillende concentratie van Na_2S en van verschillende *pH* al of niet gecombineerd, op zeer zorgvuldig verkregen reinculturen van verschillende Zwavel-purper-bacteriën en vond, dat deze omstandigheden een zeer groote invloed hebben op de vorm, zoodat een stam, oorspronkelijk van het type van *Chromatium* sprekend kan gaan gelijken op *Thiospirillum*, *Rhabdochromatium*, *Lamprocystis* e.a. beschreven soorten bij verandering van milieu. VAN NIEL (1931) legt zeer sterk de nadruk op het feit, dat men hier steeds te maken heeft met een invloed van wisselende uitwendige omstandigheden op de vorm, niet met levenscycli, die LÖHNIS e.a. meenen te hebben aangetoond bij bacteriën.

VAN NIEL (1931) gaat zoover, dat hij veronderstelt, dat de roode soorten, die van geconcentreerde pekels zijn geïsoleerd, groei-vormen zijn van gewone bodembacteriën, dit grondende op de onderzoekingen van OESTERLE en STAHL (1929) die ten 1ste bij *Bacillus mycoides* een roode vorm verkregen onder invloed van veranderde omstandigheden (zonlicht) ten 2e vonden, dat deze bodembacterie onmiddellijk overgeënt kan worden van 0 op 32 % NaCl en weer terug. *Bacillus halobius ruber* KL. en *Sarcina morrhuae* FARLOW zouden dus dergelijke groei-vormen van gewone bodembacteriën moeten zijn. Het zou dus mogelijk moeten zijn, deze bacteriën onmiddellijk of in ieder geval gemakkelijk weer in een zoetwater-milieu over te brengen. Dat dit met *Bacillus halobius ruber* niet gemakkelijk gebeurt is op bladzijde 26 reeds besproken.

Voor de *Sarcina* is de mogelijkheid met een dergelijke groei-vorm te doen te hebben, veel grooter, hierover zal in de volgende § gesproken worden. Ook voor de bacteriën, waarmee GOLIKOWA (1930) werkte, is het niet onwaarschijnlijk. Deze sporenvormende, staafvormige, kleurloze bacteriën, die hij van gezouten visch isoleerde, kon hij n.l. kweken op een bodem, die op z'n minst 1,5 % NaCl bevatte, maar ook op een bodem, die met NaCl verzadigd was.

Ongeveer hetzelfde geldt voor de bacteriën van BARANIK-PIKOWSKY (1927).

2. Eigen waarnemingen.

Evenals KLEBAHN (1919) bij *Bacillus halobius ruber* waarnam, werd de staafvormige roode bacterie, waarvan in deze § sprake is, geheel vernietigd bij overbrenging uit de pekels in water; slechts korreltjes met een diameter van 0,6—1,5 μ bleven over. Werden de bacteriën echter overgebracht in een zoutoplossing, waarvan de concentratie geringer was dan van de pekels, waarin zij zich hadden ontwikkeld, dan konden dezelfde vervormde exemplaren waargenomen worden, als KLEBAHN (1919) bij *Bacillus halobius ruber* zag, (zie figuur 1) hoewel enkele staafjes geheel de normale vorm behielden. Deze laatste vielen op door de snelheid, waarmee zij zich voortbewogen. Er moet hier op gewezen worden, dat de bolvormige en ovale exemplaren, die in deze hypotonische oplossingen voorkwamen een veel grotere diameter vertoonden, dan de korreltjes in het water, n.l. gemiddeld 2,5 μ .

Dat de vervormde staafjes niet dood behoeven te zijn, blijkt hieruit, dat bij overenten van een bodem met 30 % NaCl groei plaats heeft, terwijl bijna niet anders dan sterk gezwollen vormen optreden. Bij terugenten op een bodem met 30 % ontstaan weer de normale vormen. Ook bij langer verblijf op een bodem met 18 % NaCl, worden de bacteriën weer normaal. In het literatuuroverzicht in deze § is besproken op welke wijzen de opzwellings van *Bacillus halobius ruber*, wanneer deze van oplossingen van hogere in die van lagere osmotische druk wordt overgebracht, kan verklaard worden. Om de invloed van andere osmotisch werkzame oplossingen dan die van NaCl na te gaan, werden de bacteriën overgebracht in een oplossing van 4,5 mol saccharose. Zooals besproken is, is het in geen geval mogelijk, dat het protoplasma om de vacuole (indien er een vacuole voorkomt) geheel impermeabel is voor NaCl. Het is echter wel te verwachten, dat dit voor saccharose practisch het geval is, daar dit bij vele planten o.a. een bacterie n.l. *Beggiatoa mirabilis* (RUHLAND en HOFFMANN (1925)) gevonden is. Een oplossing van 4,5

mol saccharose zou in dat geval osmotisch water aan de bacteriën moeten onttrekken, ook al bestaat het celvocht uit een oplossing van geconcentreerd keukenzout (5,25 mol), dat nog in ionen kan zijn gesplitst. Of deze wateronttrekking werkelijk plaats had, is moeilijk uit te maken, er ontstonden evenals in water korreltjes van $0,5-1,8 \mu$. De bacteriën sterven waarschijnlijk onmiddellijk af. Er kon ook in een voedingsoplossing, waaraan in plaats van NaCl 4,5 mol saccharose was toegevoegd, geen bacterie-cultuur worden verkregen. In 2 mol saccharose ontstonden eveneens bolletjes, deze waren iets groter n.l. tot $2,2 \mu$ in diameter, terwijl de bolletjes, die ontstonden in een oplossing van 1 mol saccharose hiervan niet verschilden. Deze bolletjes stel ik mij voor, als te zijn ontstaan door afronding gepaard met een geringe opzwellling van de bacteriën, de korreltjes als gedeelten van vernietigde bacteriën. Het was onverschillig, of ik met bacteriën werkte, die zich op een bodem, die 4,7—5,2 mol NaCl bevatte, of op een bodem met 3,2—3,6 mol NaCl hadden ontwikkeld. De bacteriën van de bodem met 3,2—3,6 mol NaCl waren reeds geruime tijd op deze bodem gekweekt en vertoonden het zelfde beeld, als die van de bodem met 4,7—5,2 mol NaCl.

Ten laatste moet worden vermeld, dat enkele waarnemingen een aanwijzing gaven, dat verandering van de chemische samenstelling van de cultuurvloei-stof ook het vermogen bezit vormverandering van de levende bacteriën te weeg te brengen. Er zullen hierover nadere proeven moeten worden verricht.

De vormveranderingen, die de bacteriën van de stammen uit groep II vertoonen, zullen hier niet besproken worden, daar deze door een inwendige oorzaak n.l. het ontstaan van bepaalde lichaampjes in de cel worden teweeggebracht. Om vergissingen te voorkomen werd er bij het onderzoek naar de vormverandering ten gevolge van wisselende uitwendige omstandigheden steeds gewerkt met een stam, die deze lichaampjes niet bevat.

D. *Vergelijking met verschillende bacteriën, door vroegere onderzoekers geïsoleerd.*

Zooals vele malen tot uiting is gekomen, stemmen de eigenschap-

pen van de staafvormige roode bacterie zeer goed overeen met die van *Bacillus halobius ruber* KL.. Zoowel KLEBAHN (1919) als HARRISON en KENNEDY (1922) hebben waarschijnlijk een stam van deze bacterie, die in cultuur helder, doorzichtig van uiterlijk is, in handen gehad. Daar de bacterie geen sporen vormt, stelde ik in 1931 voor de naam *Bacillus* te doen vervallen en de bacterie *Bacterium halobium* te noemen. Daar in hoofdstuk VI zal blijken, dat de roode kleurstof een geheel andere is dan prodigiosine, de kleurstof van *Bacillus prodigiosus*, is het niet aanbevelenswaardig de naam *Serratia* te gebruiken, zooals BERGEY (1930) doet.

Verder is het zeer waarschijnlijk, dat de *Bacillus* van PEIRCE (1914) ook tot *Bacterium halobium* behoort. De afmetingen, die hij opgeeft, komen zeer goed overeen met die van opgezwollen exemplaren van *Bacterium halobium* in hypotonische oplossingen. Daar hij niet vermeldt, dat hij de bacteriën bekeek in een even sterk geconcentreerde pekel, als waarin zij leven, is het zeer goed mogelijk, dat hij inderdaad opgezwollen exemplaren waarnam ten gevolge van verlaging van de zoutconcentratie. Ook het volgende maakt het waarschijnlijk, dat hij met *Bacterium halobium* te doen had: van de kolonies zegt hij, dat zij „ranging in shade from pink through clear red to crimson, according to the size of the colony” zijn. Het is mogelijk, dat hij hier dezelfde kleurverandering waarnam, als waarvan onder A in deze § sprake was bij de stammen met een uiteindelijk ondoorzichtig uiterlijk b.v. stam 4). Dat de kleurstof van de bacterie van PEIRCE (1914) in de agar diffundeert, blijft een verschilpunt. Hij gebruikte echter 1 % agar, geïmpregneerd met pekel. Het is zeer goed mogelijk, dat deze agar van een zeer zachte consistentie was en dat de bacteriën zich daardoor ook eenigszins in de agar ontwikkelden, wat de „shade of pink” in de agar tengevolge had. Het gelukte mij n.l. niet met minder dan 2½ % agar een pekel van 30 % NaCl een vaste consistentie te geven.

Ook BECKWITH (1911) neemt een kleurverandering waar bij de door hem geïsoleerde en als *Diplococcus* beschreven bacterie. Hij schrijft: „The colony after 20—25 repeated transfer showed some loss of color, changing its degree of chromogenesis from a salmon pink to a pinkish white”. De mogelijkheid bestaat, dat deze *Diplo-*

coccus dezelfde is als *Bacterium halobium*, gezien de groote vormveranderingen, die bacteriën kunnen ondergaan, ook omdat BECKWITH (1911) zegt, dat de coccen eenigszins ovaal kunnen zijn. Voor de *Bacillus* en de *Micrococcus* van MAURIAC (1886—'89) die volgens hem, slechts te zamen het „rood” veroorzaken, bestaat groote kans, dat beide tot een en dezelfde soort behooren en wel tot *Bacterium halobium*. Bij verlaging van de concentratie blijven immers bij deze bacterie ook intacte staafjes zeer lang bewaard. Het komt zeer veel voor, dat zoowel staafvormige als bolvormige (*Micrococcus*-achtige) bacteriën, bij verlaging van de concentratie naast elkaar optreden.

Wat *Bacillus Danteci* KRAUSE betreft, het is mogelijk, dat dit een sporenvormende stam is van *Bacterium halobium*, zooals ook LIEBERT en DEERNS (1930) veronderstelden. Het is dus mogelijk, dat vijf of zes van de elf op bladz. 17 en 18 beschreven bacteriën tot één en dezelfde bacterie behooren n.l. *Bacterium halobium*.

§ 2. De roode *Sarcina* van gezouten haring.

Een reïncultuur werd volgens de uitstrijkmethode verkregen. De kleur van de cultuur komt overeen met het staaltje no. 81 van de Code des Couleurs van KLINCKSIECK en VALETTE (1908). In een enkele cultuur kan de kleur eenigszins verbleekt zijn, dan komt deze overeen met no. 66. In tegenstelling met de twee andere gekleurde bacteriën is de groei van de *Sarcina* in vloeibaar milieu veel slechter dan op vaste bodem, terwijl de bacterie ook aan de vaste bodem de eisch stelt, dat deze een zekere stijfheid heeft. Men moet er dus voor zorgen, dat de voedingsoplossingen, waaraan agar wordt toegevoegd, een neutrale reactie hebben. (Vroeger werd reeds gesproken over het feit, dat agar een sterk geconcentreerde NaCl oplossing bij een eenigszins zure reactie niet de noodige stijfheid kan verleen). In vloeibaar milieu had een zeer geringe ontwikkeling op de bodem van het vat plaats, terwijl de oplossing helder bleef. Werd bij 40° een suspensie geschud met een agarbodem en deze daarna snel afgekoeld, zoodat de agar stijf werd, dan ontwikkelde de bacterie zich slechts aan de oppervlakte van de agar (zoowel in het licht als in het donker). Deze proef en de slechte ontwikkeling in vloeibare

voedingsbodem wijzen er op, dat de *Sarcina* streng aëroob is.

De afzonderlijke cellen zijn 0,9—2,7 μ in diameter groot. De bacterie is gram-negatief (nagegaan naast positieve staphylococcen) en katalase-positief. Indol wordt niet gevormd. Gelatine ($\pm 15\%$ NaCl) wordt vervloeid. De kolonies op agar zijn rond, ondoorzichtig. De optimum temperatuur is 37° C. Geen gisting heeft plaats met suikers. Nitraten worden gereduceerd tot nitrieten. Het bleek, dat in tegenstelling met *Bacterium halobium* het microscopische beeld van de *Sarcina* niet veranderde, als deze van een bodem, die een hoog percentage NaCl bevatte, overgebracht werd in water. Ook had deze belangrijke verlaging van de osmotische druk van het milieu blijkbaar niet de dood tengevolge. Bacteriën, die zich op een vaste bodem (20 % NaCl) hadden ontwikkeld, werden in water gebracht. Na een uur hierin te zijn verbleven, konden zij zich weer op een bodem met 20 % NaCl ontwikkelen. Voor de *Sarcina* is dus de mogelijkheid dat deze moet worden beschouwd als een groeivorm van een gewone bodembacterie, veel grooter dan voor *Bacterium halobium* (zie bladz. 34).

De bacterie vertoont een groote variabiliteit. In vloeibaar milieu zijn de cellen 1,5—2,7 μ groot, terwijl op vaste bodem ook afmetingen van 0,9—1,5 μ voorkomen. Ook zijn op vaste bodem de pakjes meest slecht ontwikkeld, terwijl coccen, diplococcen, streptococcen en staphylococcen voorkomen. In vloeibaar milieu treedt de kleur pas laat in de ontwikkeling op. Na ongeveer twee weken is de groei macroscopisch zichtbaar in een vloeibaar milieu, terwijl de roode kleur hierin pas na ongeveer zes weken optreedt; deze tijden zijn natuurlijk afhankelijk van de hoeveelheid entstof. Ent men uit de kleurloze cultuur op vaste bodem, dan treedt de roode kleur weer op, hoewel ik eens een plaat verkreeg met kleurloze kolonies, die pas na eenige dagen rood werden. Opvallend is, dat *Sarcina morrhuae* FARLOW volgens KLEBAHN (1919) dezelfde afmeting (1,5—2,2 μ) heeft als de groeivorm van deze *Sarcina* in vloeibaar milieu, terwijl *Micrococcus* (*Diplococcus*) *morrhuae* KL. dezelfde afmeting (1—1,5 μ) heeft als de groeivorm van de *Sarcina*, die op vaste bodem kan voorkomen. Het eenige verschil tusschen *Sarcina* en *Micrococcus* (*Diplococcus*) *morrhuae* is dit verschil in grootte van de cellen en het

feit, dat de *Micrococcus* de eigenschap mist, *Sarcina's* te vormen (KLEBAHN (1919)). Wel hangen de cellen van de *Micrococcus* met tweeën of vieren aan elkaar (KLEBAHN (1919)). Ook de groeivorm met kleine cellen van de *Sarcina* op vaste bodem vormde, zooals gezegd, weinig pakjes. Uit dit alles volgt dus met groote waarschijnlijkheid, dat *Sarcina morrhuae* FARLOW en *Micrococcus* (*Diplococcus*) *morrhuae* KL. één en de zelfde soort is, die het best *Sarcina morrhuae* KLEBAHN genoemd kan worden (PETTER (1931)).

Ook CLOAKE isoleerde uit klipvisch een *Sarcina*, een *Coccus* en een *Staphylococcus*, die volgens hem waarschijnlijk tot een en dezelfde soort behooren. In hoofdstuk II werd aangenomen, dat hij hier met *Sarcina morrhuae* KL. te doen had. Wat de andere *Micrococci* van het lijstje op bladz 17 en 18 betreft, het is zeer goed mogelijk, dat ook deze tot *Sarcina morrhuae* behooren, hoewel het ook mogelijk is, dat men hier vervormde exemplaren van *Bacterium halobium* voor *Cocci* heeft aangezien. Dit laatste is tenminste voor de *Micrococcus* van MAURIAC (1886—'89) zeer waarschijnlijk en misschien ook voor de *Diplococcus* van BECKWITH (1911) (zie vorige §). Dat het meer voorkomt, dat de *Sarcina*-vorm en de *Coccus*-vorm met elkaar afwisselen naar gelang de uitwendige omstandigheden wisselen, vermeldt reeds FALKENHEIM (1885). Deze auteur kweekte uit de maaginhoud van den mensch een bacterie, die in hooiextract *Sarcina's* vormde, op andere bodems echter slechts in de vorm van *Coccen*, *Diplococcen* en tetraden van *Coccen* voorkwam.

§ 3. De staafvormige oranje bacterie van Trapani-zout.

Zooals in hoofdstuk III beschreven is, gelukte het uit Trapani-zout op een bodem met 30 % NaCl, een oranje bacterie te isoleren. Het feit deed zich echter voor, dat, als een oplossing van het zout over een vaste bodem werd gestreken, de opgetreden kolonies kleurloos waren; slechts de plaatsen, waar de bacteriën in een grootere laag de voedingsbodem bedekten, waren oranje van kleur. Afgezien van de kleur, waren deze verschillende bacterie-culturen echter precies gelijk van uiterlijk en ook microscopisch bestond er geen verschil tusschen de bacteriën van de geheele plaat. Suspendeert men van de oranje cultuur in een verzadigde NaCl-oplossing en strijkt men

opnieuw hiervan op een vaste bodem uit, dan treedt weer hetzelfde beeld op, d.w.z. een oranje cultuur, waar veel is afgestreken, naast kleurloze kolonies. Men kan dit vele malen met hetzelfde resultaat herhalen. Het is dus uitgesloten, dat de kolonies een andere bacterie bevatten dan de culturen, ontstaan op de plaatsen, waar veel ent-materiaal is uitgestreken. Ook in het licht waren de kolonies steeds kleurloos en bij verder kweken van de bacteriën uit deze kolonies, trad de kleur niet weer op. Ook niet wanneer aan de voedingsbodem 0,2 % saccharose werd toegevoegd. De oranje kleur der bacterie is n.l. het gevolg van het voorkomen van een carotinoïde kleurstof (zie hoofdstuk VI) en verschillende onderzoekers o.a. LIPPMAN (1925) merkten op, dat de vorming van enkele carotinoïden bevordert wordt door suikervoeding. Ik heb aangenomen, dat de oranje cultuur op de eerste plaat, waarop Trapanizout werd uitgestreken, reeds een reïncultuur was. Hiervan werd verder gekweekt.

De bacteriën zijn staafvormig en vormen geen sporen. Zij zijn 0,6 bij 1,5—3,5 μ groot. Zij zijn gram-negatief en katalase-positief. De kolonies op agar (30 % NaCl) zijn klein, rond, doorzichtig. Ook in vloeibaar milieu heeft ontwikkeling plaats, dit wordt hierdoor troebel. De groei van de bacterie is op deze vaste en in deze vloeibare media slecht. Indol wordt niet gevormd. De optimum temperatuur is 37° C. Nitraten worden gereduceerd tot nitrieten. De bacterie groeit niet onder de oppervlakte van agar (zoomin in het licht, als in het donker). In de voorloopige mededeeling van dit onderzoek werd voorgesteld de bacterie *Bacterium trapanicum* te noemen (PETTER (1931)). Zij verschilt in kleur, in grootte, in wijze van ontwikkeling in vloeibaar milieu en zooals later zal blijken, in kleurstof en in voedingsvoorwaarden van *Bacterium halobium*.

Hoewel *Bacterium trapanicum* oranje van kleur is en niet van gezouten visch werd geïsoleerd, is het toch mogelijk, dat ook deze bacterie als een van de veroorzakers van het rood worden van gezouten visch is te beschouwen. Het is n.l. door verschillende auteurs aangetoond, dat het zout, waarmee de visch wordt gezouten, als de infectie-bron van het „rood” moet worden aangezien (FARLOW (1880), KLEBAHN (1919), CLOAKE (1923), LIEBERT en DEERNS (1930) e.a.).

In dit hoofdstuk kom ik dus tot de conclusie, dat de vele in de lite-

ratuur beschreven micro-organismen, die het rood worden van gezouten visch veroorzaken, hoogstwaarschijnlijk terug te brengen zijn tot *Sarcina morrhuae* KL., *Bacterium halobium* en *Torula Wehmeri* HANZ. et TAKEDA, terwijl het mogelijk is, dat *Bacillus Danteci* KRAUSE als een afzonderlijke soort met *Bacterium trapanicum* hieraan nog moeten worden toegevoegd.

HOOFDSTUK V

GASVACUOLEN ALS OORZAAK VAN HET VERSCHIL IN DOORZICHTIGHEID TUSSCHEN DE CULTUREN VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BAC- TERIUM HALOBIIUM

§ 1. *Inleiding.*

Zooals in het vorige hoofdstuk beschreven is, zijn de stammen van *Bacterium halobium* in twee groepen te verdeelen. De stammen uit de eerste groep vormen een heldere, doorzichtige, de stammen uit de tweede groep een ondoorzichtige, troebele bacteriënlaag op een vaste voedingsbodem. Het ondoorzichtige uiterlijk van de tweede groep treedt bij de meeste stammen uit deze groep pas op, wanneer de bacteriën zich op de voedingsbodem reeds tamelijk goed ontwikkeld hebben. Dit troebel worden van de bacteriëncultuur is een proces, dat langzamerhand in intensiteit toeneemt.

Toen nu microscopisch de bacteriën van de stammen uit deze twee groepen werden vergeleken, viel een eigenaardig verschijnsel in het oog. Terwijl de bacteriën uit jonge culturen van alle stammen geheel gelijk van uiterlijk zijn, zijn bij de stammen uit de tweede groep, dus bij stam no. 4, 5, 6, 7 en 8 (zie bladz. 23 en 24), wanneer deze reeds eenige tijd het troebele uiterlijk vertoonen, in de bacteriecellen een of meer zeer kleine bolvormige, ovale of onregelmatig gevormde, scherp omlijnde lichaampjes waar te nemen. Deze lichaampjes nemen langzamerhand in grootte toe. Bij stam no. 7 vullen zij al spoedig de cel in zulk een mate, dat slechts een smal randje protoplasma overblijft.

De bacteriën, die deze lichaampjes bevatten, blijven zeer goed overentbaar en verliezen ook hun beweeglijkheid niet. De stammen

uit de eerste groep bevatten deze lichaampjes nooit. Er blijkt dus een zeer nauw verband te bestaan tusschen het uiterlijk van de cultuur en het voorkomen van bepaalde lichaampjes in de cel. Het troebele uiterlijk blijkt het gevolg van deze lichaampjes te zijn. Eén ding is nog niet duidelijk, n.l. dat deze ondoorzichtigheid eerder is waar te nemen dan de lichaampjes. Het is echter zeer goed mogelijk, dat de lichaampjes wel reeds aanwezig zijn bij het eerste optreden van ondoorzichtigheid, maar te klein om waar te nemen. Ook in vloeibaar milieu zijn, zooals in hoofdstuk IV is meegedeeld, de twee groepen hoewel moeilijker, te onderscheiden; ook hier treden bij de stammen uit de tweede groep de lichaampjes op. Figuur 2 geeft een beeld van de lichaampjes uit de stammen no. 4, 5, 6 en 8, zij

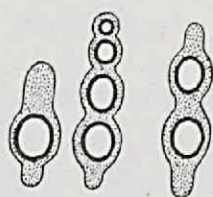
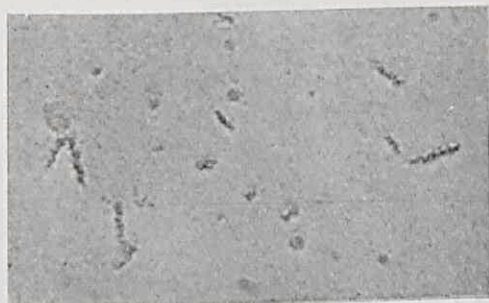


Fig. 2. *Bacterium halobium*. Bacteriën met kleine gasvacuolen.

zijn steeds bolvormig of elliptisch, terwijl de figuren 3 (a, b, c en d) het ontstaan en de ontwikkeling van de lichaampjes bij stam no. 7 uitbeelden. Dit is de eenige stam van groep II, waarvan de culturen op vaste bodem reeds zeer jong geheel ondoorzichtig zijn. In een zeer jonge cultuur in een vloeibaar milieu, waaraan macroscopisch nog geen ontwikkeling is waar te nemen, komen alle vormen, in deze figuren weergegeven, voor, die in figuur 3e geteekend in de minderheid, terwijl in geheel ontwikkelde culturen slechts de vormen van figuur 3d en vooral van figuur 3e voorkomen. Ik stel mij het ontstaan en de ontwikkeling als volgt voor: terwijl een zeer jonge bacterie nog in het geheel geen structuur vertoont (figuur 3a), treedt spoedig op bepaalde plaatsen (figuur 3b) een vage aanduiding van lichaampjes op; deze ontwikkelen zich spoedig tot de scherp omlijnde lichaampjes, zoodat een bacterie optreedt, zooals in figuur 3c is weergegeven; hieruit ontstaan bacteriën van het type, zooals in figuur 3d geteekend is, terwijl de vele lichaampjes, die bij deze bacterie voorkomen ten slotte kunnen samenvloeien om bacteriën te vormen, zooals in volwassen culturen het meest optreden (figuur 3e). Zie ook de foto's a, b en c.

Het was nu de vraag van welke aard deze lichaampjes zijn. Allereerst werd gedacht aan zwavelkorrels. WINOGRADSKY (1887) merkte op, dat, als hij *Beggiatoa* doodde, de zwavel, die deze bacterie kan

bevatten, na eenige tijd uitkristalliseert. *Bacterium halobium* kan gemakkelijk gedood worden in water, de lichaampjes komen vrij en vloeien samen tot grootere onregelmatige complexen; uitkristallisatie van de inhoud heeft echter niet plaats. Toch is uit dit samenvloeien



a



b



c

Foto a en b. *Bacterium halobium* (stam 7) levend in pekkel. Lineaire vergrooting 1000 $\times$. Foto c. idem (stam 5).

van de afzonderlijke lichaampjes, dat ten gevolge van het tegen elkaar botsen door een lichte strooming in de vloeistof of door Brownsche beweging veroorzaakt wordt en dat onder de microscoop zeer goed is waar te nemen, reeds iets te concludeeren, n.l. dat men niet met een vaste stof te doen heeft. Om zeker te zijn, dat de inhoud niet uit zwavel bestaat, werd nagegaan of deze oplosbaar was in zwavelkoolstof. Om het echter de zwavelkoolstof mogelijk te maken tot

de lichaampjes door te dringen, werd allereerst alcohol (96 %), die zich zoowel met water als met zwavelkoolstof mengt, bij het preparaat van de bacteriën gevoegd. De bacteriën bevonden zich in dit preparaat in geconcentreerde pekkel. De alcohol had een onverwachte uitwerking: de bacteriën veranderden onmiddellijk in een onduidelijke netachtige massa, van de lichaampjes met de scherpe omlijning was niets meer waar te nemen. Zij bevatten dus in geen geval zwavel, deze lost niet op in alcohol. Ook is het niet waarschijnlijk, dat de inhoudstof van de lichaampjes vette olie is, daar deze niet gemakkelijk in koude alcohol oplost. Het viel op, dat, als de bacteriën, alvorens de

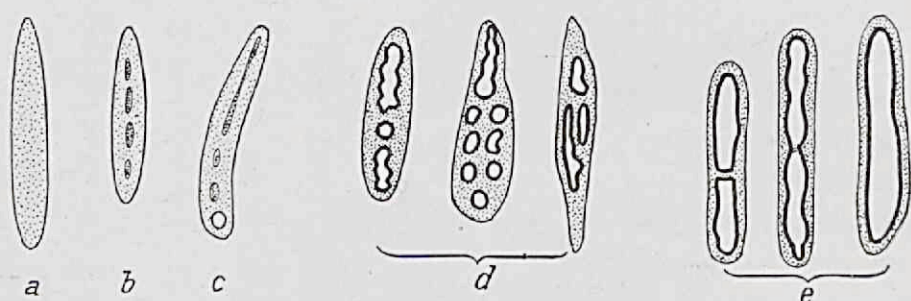


Fig. 3. *Bacterium halobium* (stam 7. Bacteriën van verschillende ouderdom).

alcohol toegevoegd werd, door toevoeging van water gedood waren, de invloed van de alcohol geringer was: pas als een suspensie van de bacteriën in water eenige tijd met een ongeveer gelijk volume alcohol (96%) geschud werd, verdwenen de samengevloeiende lichaampjes. Het protoplasma om de lichaampjes moet dus een dusdanige verandering hebben ondergaan, dat het minder doorlaatbaar wordt voor alcohol.

Nu is echter een opvallend kenmerk van de lichaampjes, dat zij in het microscopische beeld bij een bepaalde instelling een roode kleur vertoonen, terwijl zij scherp omljnd zijn. Schroeft men de tubus naar boven, dan verdwijnt deze kleur en worden zij donker bij zwart af, terwijl bij een lage instelling de roode kleur eveneens verdwijnt en de lichaampjes zeer helder en licht worden, terwijl de donkere rand ten koste van de lichaampjes breder wordt. Zie hiervoor de foto's *a*, *b* en *c*, waar de lichaampjes zoowel donkerder als lichter

dan het protoplasma en de omgevende vloeistof verschijnen, al naar de instelling van het beeld. Het lichter worden bij lage en donker worden bij hoge instelling is, hoewel minder uitgesproken, ook aan luchtbelllen in water waar te nemen. Dit verschijnsel, dat het gevolg is van het feit, dat lucht een lagere brekingsindex heeft dan water, volgt uit fig. 4: men ziet, dat de stralen, die evenwijdig invallen, de stof met de geringere breking divergeerend verlaten, zoodat bij instelling van de microscoop op de bovenkant van de luchtbel het oog per eenheid van oppervlakte van de luchtbel veel minder stralen bereiken dan bij instelling op de onderkant van de luchtbel per eenheid van oppervlakte van de luchtbel. Verder volgt uit deze figuur de breder wordende donkere ring om de stof met de zwakke lichtbreking bij omlaag schroeven van de tubus. Hoewel om de lichaampjes (ook de ronde) de donkere rand bij lage instelling smaller is dan bij luchtbelllen, was het dus te vermoeden, dat de lichaampjes een stof bevatten, die een geringere brekingsindex dan water en pekkel heeft. Het bleek, dat dit vermoeden juist was, daar bij zooveel mogelijk evenwijdig invallend licht (dus met platte spiegel en zonder condensor) de lijn van BECK om de langwerpige lichaampjes is waar te nemen, die bij omhoog schroeven van de tubus zich naar het water of de pekkel toe verplaatst. De lijn van BECK, die het gevolg is van algeheele terugkaatsing van een deel van het invallende licht op de rechte lijnige grens van twee stoffen met verschillende brekingsindices, verplaatst zich n.l. bij langzamerhand hooger wordende instelling naar de stof met de grootste brekingsindex (zie METZNER (1928)). Daar de eenige bekende stoffen, die een geringere optische dichtheid dan water bezitten, gassen en dampen zijn of tenminste lichamen, waarin gassen of dampen in groote hoeveelheid voorkomen, moeten de lichaampjes dus een gas of een gasmengsel

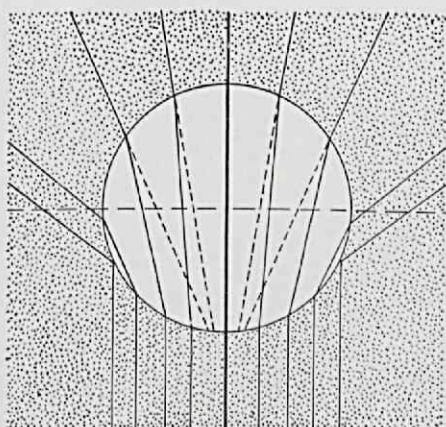


Fig. 4. Lichtbreking tengevolge van een luchtbel in water. (Naar fig. 163 METZNER (1928) bladz. 205).

bevatten. Dat zij bij hooge instelling donkerder zijn dan luchtbelllen in hetzelfde milieu, kan het gevolg zijn van het feit, dat zij omsloten worden door protoplasma, een optisch dichtere stof dan water (brekingsindex = 1,33) of pekell(brekingsindex = 1,37). METZNER (1928) vermeldt n.l., dat de brekingsindex van protoplasma $\pm 1,5$

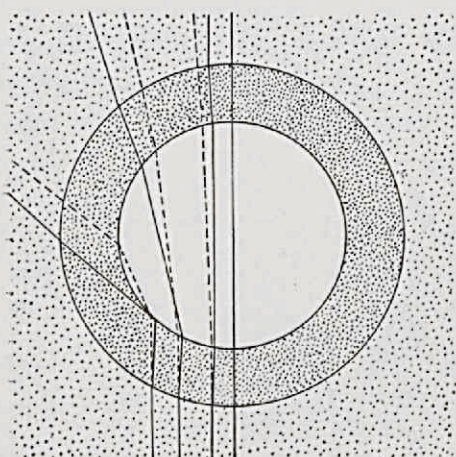


Fig. 5. Vergelijking van de lichtbreking tengevolge van een luchtbel in water met de lichtbreking tengevolge van een luchtbel, die bovendien omgeven is door een laag van een stof met een brekings-index van 1,5. De getrokken lijnen geven de stralengang weer, als de stof met de brekings-index van 1,5 voorkomt, de gestippelde deelen niet aanwezig was.

is. Uit figuur 5, waar drie evenwijdig invallende lichtstralen zijn geteekend, blijkt, dat, wanneer deze een object treffen, dat een geringere brekingsindex heeft dan de omgeving, zij minder divergeerend dit object verlaten dan wanneer dit object bovendien door een laag van een stof wordt omgeven, die een nog grootere brekingsindex heeft dan de omgeving. Wat de roode kleur bij een bepaalde instelling betreft, deze kan niet het gevolg zijn van onvoldoende op kleur gecorrigeerde lenzen, daar, wanneer de volgende lenzen werden gebruikt: compensatie-oculair 4 (ZEISS) 45 mm. met een apochromaat objectief 2mm, apert. 1,4, 90 (ZEISS) of met een olie-

immersie, homogeen, $1/12$, apert. 1,3, 2,0 mm. (ZEISS), de roode kleur eveneens optrad. Deze kleur is misschien te begrijpen, wanneer men bedenkt, dat van de stralen uit het zichtbare deel van het spectrum de roode op de grens van twee stoffen met verschillende brekingsindices het minst sterk worden gebroken. De in de figuur 4 geteekende stralen moet men zich voorstellen, als te zijn van monochromatisch licht. De roode stralen zullen het minst divergeeren, zoodat het mogelijk is, dat, als men op de rand van het lichaam scherp instelt, slechts de roode stralen in voldoende hoeveelheid per oppervlakte-eenheid van het lichaam het oog treffen, tenminste in het middengedeelte; de rand moet donker zijn (bij het naar om-

hoog schroeven van de tubus zullen ook de roode stralen te zeer verspreid over het lichaam verdeeld zijn om een indruk te geven en is het lichaam donker, bij lage instelling daarentegen moeten ook andere stralen dan de roode een lichtindruk te weeg brengen en is het lichaam wit en licht met een breede donkere rand). Dat een lichaam een roode kleur kan vertoonen bij een bepaalde instelling van de microscoop, als gevolg van een lichtbreking, die zwakker is dan die van de omgeving, blijkt ook uit het volgende: wanneer bacteriën van een stam uit groep 1 in een oplossing van 4,5 mol saccharose worden gebracht, waarvan de brekingsindex groter is dan van het protoplasma van de bacteriën, dan zijn de geheele bacteriën bij een bepaalde instelling rood gekleurd. KLEBAHN (1895) nam verder waar, dat kleine gasbellen in preparaten van gedroogde *Diatomeeënschalen* in canadabalsem eveneens een roode kleur vertoonen. Ik kan hier aan toevoegen, dat ook spleten tusschen zoutkristallen, die met lucht zijn gevuld, onder de microscoop dezelfde roode kleur vertoonen als de lichaampjes in de bacteriën. Ook grillig gevormde luchtbelllen in water (KLEBAHN (1895)) of in een stof met een grootere brekingsindex dan water b.v. olijfolie (brekingsindex = 1,47) vertoonen een roode kleur.

Nu zijn hoofdzakelijk in de cellen van *Cyanophyceae* lichaampjes beschreven, waarvan de laatste tijd aangenomen wordt, dat zij gas bevatten. Het is dus te vermoeden, dat de lichaampjes in de bacteriën van de stammen uit groep II van *Bacterium halobium* tot deze z.g. gasvacuolen behooren. Om ze echter hiermee te kunnen vergelijken, moeten eerst de eigenschappen van deze vacuolen worden behandeld. Dit zal in de volgende § geschieden.

§ 2. Literatuuroverzicht.

In 1894 merkte RICHTER op, dat bij verschillende *Cyanophyceae* met z.g. waterbloei, roode korrels in de cellen voorkomen, die hij aanzag voor zwavelkorrels. In 1895 bestreed STRODTMANN (a en b) deze meening. Deze auteur komt n.l. tot de overtuiging, dat de „roode” korrels gas bevatten en de oorzaak zijn van het drijfvermogen van het wier. Dat dit laatste het geval is, blijkt uit de volgende

proef. De wieren werden in een flesch met water gebracht, waar zij spoedig aan de oppervlakte kwamen te drijven. De flesch werd geheel gevuld met water, waarna een kurk zeer krachtig op de waterkolom werd gedrukt. Het gevolg was, dat de wieren op de bodem zonken, terwijl bij microscopisch onderzoek bleek, dat de lichaampjes uit de cellen waren verdwenen. STRODTMANN onderzocht verschillende *Cyanophyceae* en vond, dat de lichaampjes bij alle vrij drijvende soorten voorkomen, nooit bij vastzittende.

In hetzelfde jaar publiceerde KLEBAHN (1895) een onderzoek, dat hij in vele opzichten tezamen met STRODTMANN heeft uitgevoerd. KLEBAHN bevestigt hierin de resultaten van STRODTMANN en merkt verder op, dat, terwijl de wieren normaal ondoorzichtig van uiterlijk zijn en slechts in opvallend licht groengeel, zij, door de druk in de genoemde proef, groen en doorschijnend worden. De roode kleur beschouwt KLEBAHN als het gevolg van een lichtbreking, die geringer is dan die van het omgevende protoplasma. Hij neemt waar, dat gedroogde wieren bij verhitting in olie of hars op meer dan 100°, de lichaampjes behouden. Zij kunnen dus niet uit water of een andere vluchtige vloeistof bestaan. Een gas kan, volgens hem, slechts al deze eigenschappen toekomen. Hij noemt de lichaampjes gasvacuolen. Het volgende staft nog deze opvatting: door de wieren te behandelen met vloeistoffen als alcohol, phenol of sterke zuren kan men de gasvacuolen doen verdwijnen, terwijl kleine luchtbelllen op dezelfde wijze b.v. uit de schalen van een *diatomee* zijn te verwijderen. KLEBAHN verklaart dit uit de groote capillaire kracht, die deze vloeistoffen ten opzichte van organische stoffen vertoonen. Het gas wordt door deze kracht samengedrukt en daardoor gemakkelijk geabsorbeerd. Ook het verdwijnen door druk verklaart KLEBAHN door absorptie van het gas door deze druk. Dat de gasvacuolen niet rond zijn behoeft volgens KLEBAHN niet te bevreemden: zeer kleine luchtbelletjes tusschen voorwerp- en dekglas kunnen eveneens grillige vormen vertoonen; ook is het zeer goed mogelijk, dat de gasvacuolen een protoplasmatische wand bezitten.

In 1896 beschreef KLEBAHN een proef, tezamen met STRODTMANN uitgevoerd, die als resultaat opleverde, dat de gasvacuolen, als de wieren onder vacuum worden gebracht, niet verdwijnen.

BRAND (1901) is de eerste, die op grond van de laatste proef meent, dat de vacuolen geen gas kunnen bevatten.

In 1922 beschreef WILLE lichaampjes in *Thiotrix tenuis* WINOGR., die door WINOGRADSKI als zwavelkorrels zijn beschreven, maar die het karakter van de „gasvacuolen” bleken te hebben wat optische eigenschappen en gedrag ten opzichte van reagentia betreft. Hier worden dus voor het eerst deze lichaampjes bij een bacterie beschreven.

Daarna verschijnt van MOLISCH (1903) een publicatie, waarin deze de gastheorie van KLEBAHN heftig bestrijdt, hoofdzakelijk op grond van de feiten, dat de vacuolen in vacuum niet verdwijnen (wat MOLISCH bevestigt) en dat zij niet rond zijn. Niet alleen de „gasvacuolen” in de cel, maar ook geïsoleerde „gasvacuolen” hebben een onregelmatige vorm. Dit isoleeren gelukt MOLISCH door de wieren eenige dagen in 10 % KNO_3 te brengen. De cellen gaan hierin te gronde, terwijl de vacuolen bewaard blijven en samen-vloeien tot onregelmatig gevormde lichaampjes.

Ook pleit volgens MOLISCH tegen de gastheorie, dat in een vochtige kamer met de damp van chloroform, alcohol of aether de „gasvacuolen” vernietigd worden, terwijl gas door de geringe hoeveelheden van deze stoffen, die tot de „gasvacuolen” doordringen, niet geabsorbeerd kan worden. MOLISCH onderscheidt twee soorten „gasvacuolen” en noemt ze Schwebekörper; de eerste soort bevat volgens hem een aantal zeer kleine deeltjes in Brownsche beweging, deze kan dus geen gas bevatten, maar moet uit een licht beweeglijke vloeistof bestaan. De tweede soort, die het meeste voorkomt, bevat deze deeltjes niet en bestaat volgens MOLISCH uit een zeer viskeuse vloeistof. FISCHER (1905), die een bepaalde reservestof, het anabaenine (verwant met glycogeen) bij *Cyanophyceen* beschrijft, houdt de „gasvacuolen” voor een optisch effect, veroorzaakt door interferentie van het licht in het anisotrope anabaenine. In 1906 heeft MOLISCH bijgedragen tot uitbreiding van de kennis, wat betreft het voorkomen van de „gasvacuolen”. Hij trof deze n.l. bij twee zwavel-purperbacteriën aan, die door hem als nieuwe soorten worden beschreven. Zij veroorzaken, dat deze bacteriën in vloeibaar milieu aan de oppervlakte komen te drijven. Zij zijn volgens hem sterk

lichtbrekend. Hij blijft bij zijn meening, dat de Schwebekörperchen of aerosomen geen gas bevatten. Het voorkomen van „gasvacuolen” bij zwavel-purperbacteriën, die hierdoor aan de oppervlakte komen te drijven, is opmerkelijk, daar uit de onderzoekingen van VAN NIEL (1931) is gebleken, dat deze bacteriën obligaat anaëroob zijn. Er blijkt uit, dat bij de zwavelbacteriën het vermogen tot drijven, dat de „gasvacuolen” aan de bacteriën verleen, geen levensfunctie kan zijn, maar den dood tengevolge moet hebben. Hiermee in verband is opmerkelijk, dat de *Cyanophyceae*, die in geweldige massa in de zomer waterbloei kunnen vertoonen, niet zelden alle zeer spoedig afsterven (KLEBAHN (1896)).

LAUTERBORN (1915), die de naam pseudovacuelen voor de „gasvacuolen” gebruikt, beschrijft een nieuwe *Oscillatoria* met groote pseudovacuelen, die echter geen waterbloei vertoont, maar op de bodem van meren voorkomt. Hij is van meening, dat de pseudovacuelen geen gas bevatten en dat „die Erhöhung der Schwebefähigkeit kaum die Hauptfunktion der Pseudovakuolen sein kann”. Hij veronderstelt, dat de inhoud een labiel stofwisselingsproduct is, dat bij O_2 -gebrek als energiebron kan dienen, zonder hiervoor eenige aanwijzing te hebben. Hij treft ook draadvormige bacteriën met pseudovacuelen in het slijk op de bodem van een meer aan.

Wat de lichtbreking van de pseudovacuelen betreft, is hij niet duidelijk. Bij één van de bacteriën, *Pelonema tenue*, LAUTERB., spreekt hij van zwak lichtbrekende, bij *Pelonema pseudovacuatatum* LAUTERB., echter van sterk lichtbrekende pseudovacuelen; bij beide bacteriën hebben de vacuelen een roodachtige glans.

In 1922 verscheen van KLEBAHN een uitvoerige publicatie, die vele nieuwe argumenten brengt ten gunste van de gastheorie. Allereerst werd echter MOLISCH (1903) bestreden: Hoe is het mogelijk, dat MOLISCH in lichaampjes met een breedte van 2μ honderden korreltjes in Brownsche beweging ziet? Een inhoud, bestaande uit een stof van een „festweiche” consistentie kan noch het optische gedrag van de vacuelen verklaren, noch de oorzaak zijn van het groote drijfvermogen van de organismen, die de vacuelen bevatten, allermint kan het het spoorloze verdwijnen van de vacuelen door druk verklaren, terwijl de gastheorie dit alles geheel verklaart. Dat

de vacuolen in vacuüm bewaard blijven, hoeft volgens KLEBAHN niet tegen de gastheorie te pleiten, als de vacuolen een wand hebben, die ondoorlaatbaar is voor gas. Dat ze een wand hebben, maakt KLEBAHN zeer waarschijnlijk, ten eerste is het mogelijk de vacuolen te isoleeren, wat ook MOLISCH (1903) deed, ten tweede gelukt het KLEBAHN de gasvacuolen eerst te verwijderen, om ze dan opnieuw in dezelfde cellen te doen ontstaan. Hij gaat als volgt te werk: de wieren worden met formaldehyde gefixeerd, daarna over alcohol, cederolie en ligroïne, met paraffine doordrenkt en met de microtoom gesneden. Daarna met toluol de paraffine weer opgelost en de doorsneden bekeken. De vacuolen blijken, zooals te verwachten was, verdwenen te zijn. Als echter de toluol verdampt is en de doorsneden in geconcentreerde suikeroplossing bekeken worden, blijkt het beeld precies gelijk aan dat van onbehandelde wieren met gasvacuolen. KLEBAHN verklaart dit als volgt: de wanden van de vacuolen zijn bewaard gebleven; door de chemicaliën is het gas verdrongen; na het verdampen van de toluol treedt echter lucht in de vacuolen binnen.

Dat stoffen als chloroform en aether in zeer kleine hoeveelheden de vacuolen vernietigen is volgens KLEBAHN, die aan deze stoffen zeer veel nieuwe toevoegt (vluchtige koolwaterstoffen, chloorderivaten van koolwaterstoffen e.a.) evenmin een argument tegen de gastheorie. Hij verklaart het verschijnsel als volgt: daar al deze stoffen tot de vetoplossende middelen behooren en het zeer goed mogelijk is, dat de wand van de gasvacuolen geheel of gedeeltelijk uit een vetachtige stof bestaat, zullen deze stoffen, al zijn de hoeveelheden, die in het water en de wieren binnendringen, zeer klein, deze wand kunnen oplossen of tenminste voor gas doorlaatbaar maken.

MOLISCH (1906) heeft verder volgens KLEBAHN veel te weinig aandacht aan het optische gedrag van de vacuolen geschonken. In de purperbacteriën kon hij zeer gemakkelijk de zwavelkorrels en de „Schwebekörperchen” onderscheiden. De eerste zijn sterk lichtbrekend. Hoe kunnen nu de laatste het ook zijn? Ook LAUTERBORN (1915) e.a., die de vacuolen geen inhoudstof toeschrijven, die het S.G. van de wieren verlaagt, weet KLEBAHN te weerleggen. Gefixeerde *Gloietrichia echinulata*, die kort na de fixatie nog een zeer groot

drijfvermogen aan den dag legt, verliest deze na eenige tijd en zinkt op de bodem. Het blijkt, dat slechts in de uiteinden van de draden de gasvacuolen duidelijk zijn afgenomen, de dikkere deelen bevatten ze nog onveranderd. Het kan dus zeer goed, dat er wieren voorkomen, die op de bodem van een meer leven en toch gasvacuolen bevatten.

Behalve deze kritiek levert het onderzoek verschillende positieve gegevens op, die pleiten voor de gastheorie. 1°. Het gelukt hem, door een plotselinge druk uit te oefenen op het dekglas van een preparaat, waarin in uitgekookt water een draad van *Anabaena*, die van te voren met kaliloog is behandeld (wat geen zichtbare invloed op de gasvacuolen heeft) langs de geheele draad gasbelletjes te voorschijn te brengen, terwijl de gasvacuolen verdwijnen. De figuur 4 op blz. 559 is zeer overtuigend. 2°. Luchtbellen in gelatine-schuim zijn met phenol zeer snel te verwijderen, evenals door druk. 3°. Er kan in een daarvoor geconstrueerd apparaat een blijvende volumevermindering van een brij van de wieren in water door druk geconstateerd worden. Deze druk moet echter groot genoeg zijn om de vacuolen te vernietigen. De volumevermindering is bijna volkomen evenredig met de gebruikte hoeveelheid algen. Hij berekent uit de verschillende waarnemingen een volume aan gasvacuolen van $\pm 1\%$ van het geheele volume van de wieren. 4°. Getracht wordt het gas te analyseren: titratie volgens WINKLER van de zuurstof in water levert geen grootere opbrengst, wanneer in dit water *Gloietrichia* door druk van de vacuolen is bevrijd. Met verschillende toestellen wordt gas uit de wieren verdreven, nadat met zeer veel moeite de geabsorbeerde lucht uit het water en de wieren zooveel mogelijk is verwijderd. Dit gas wordt daarna in een toestel van KROGH gemeten en geanalyseerd. Weinig zuurstof en koolzuur, geen waterstof, koolwaterstoffen en koolmonoxyde kwamen in het opgevangen gas voor; dus bevatten de vacuolen waarschijnlijk in hoofdzaak stikstof. Ten laatste moet nog vermeld worden, dat KLEBAHN een drukkamer construeerde, om microscopisch de wieren onder druk of vacuum te observeren. Het blijkt, dat een plotselinge drukvermeerdering van 2—3 atmosferen reeds voldoende is om de gasvacuolen bij gefixeerde *Gloietrichia* te doen verdwijnen; tegenover langzaam aanzwellende druk zijn de

vacuolen zeer resistent: een druk van 9 atmosferen doet nog enkele vacuolen bewaard blijven.

In 1925 zette KLEBAHN zijn proeven voort. Op drie verschillende wijzen met verschillende toestellen vindt hij, dat *Gloiotrichia echinulata*, waaruit de gasvacuolen verwijderd zijn, minder gas bevat dan materiaal, waarin deze nog aanwezig zijn. Zijn verschillende bepalingen kloppen onderling goed en leveren een gasgehalte van ± 0.9 volume-percenten op. Ten laatste bepaalde hij nog eens de volume-vermindering, die een hoeveelheid water met wieren ondergaat bij verwijdering van de „gasvacuolen” door toevoeging van xylol en vond 1.55 %. Dat KLEBAHN steeds een verschil in gasgehalte vindt tusschen wieren met en zonder „gasvacuolen” en een hiermee overeenstemmende volume-vermindering bepaalt bij verwijdering van deze vacuolen, is natuurlijk een groot argument voor zijn theorie, het gevonden percentage lijkt echter te oordeelen naar de beschrijving en teekeningen van de gebruikte wieren te klein of de „gasvacuolen” moeten, hoewel zij een zeer gering volume hebben, zich door de geheele cel vertakken. Het gevonden percentage komt in ieder geval goed overeen met de, uit het S.G. van de wieren (dat KLEBAHN (1922) bepaalt) berekende hoeveelheid lucht, die noodig is om de algen te doen drijven.

Eveneens in 1925 besprak VAN GOOR de verschillende opvattingen en kwam tot de overtuiging, zonder de publicaties van KLEBAHN (1922 en 1925) te kennen, dat MOLISCH (1903) gelijk heeft. Evenals BRAND (1901) neemt hij aan, dat de roode kleur de kleur van de lichaampjes is.

Daarna beschrijft KOLKWITZ (1928) weer een bacterie n.l. *Sarcina ventriculi*, die „gasvacuolen” kan bevatten. Hij oppert de mogelijkheid, dat de inhoud van deze vacuolen een gas is, dat door gisting is ontstaan en dat dit bij de andere bacteriën met gasvacuolen eveneens het geval is, daar deze alle modderbewoners zijn.

Deze hypothese wordt in 1929 door CANABAEUS verder uitgewerkt voor de *Cyanophyceae*. Het gelukt haar invloed uit te oefenen op de vorming van gasvacuolen. Bij verschillende wieren, die gewoonlijk geen gasvacuolen vormen, kan zij door toevoegen van NaCl of andere zouten in de cultuurvloeistof, maar vooral door de wieren

onder anaërobe omstandigheden te brengen, gasvacuolen doen optreden. Door het laatste komt zij tot de overtuiging, dat bij de blauwe wieren de gasvacuolen eveneens gistingsgassen bevatten. Het verband, dat zij meent op te merken tusschen de z.g. heterocysten en gasvacuolen kan hier buiten beschouwing blijven.

Ik wil uit de genoemde onderzoekingen de volgende conclusie trekken: hoewel over de wijze van ontstaan van de „gasvacuolen” nog niets bekend is en omtrent de omstandigheden, die invloed hebben op dit ontstaan nog vragen open blijven, evenzoo wat betreft de chemische samenstelling van de inhoud, staat sinds de onderzoekingen van KLEBAHN met zeer groote waarschijnlijkheid vast, dat de inhoud een gas is.

§ 3. *Eigen proeven en bespreking der resultaten in verband met de gegevens uit de literatuur.*

Uit het optische gedrag van de lichaampjes in de cellen van *Bacterium halobium* concludeer ik, dat deze lichaampjes dezelfde zijn als die, waarvan in de vorige § sprake was. Uit de volgende proeven zal blijken, dat deze gevolgtrekking juist is, terwijl eveneens verschillende argumenten ten gunste van de theorie van KLEBAHN naar voren zullen komen. Ik wil dan ook evenals KOLKWITZ (1928) en CANABAEUS (1929) de naam gasvacuolen van KLEBAHN (1895) overnemen.

A. *Gedrag ten opzichte van druk en vacuum.*

Wanneer op de pekel, waarin de bacteriën van een der stammen uit groep II gesuspendeerd zijn, een druk wordt uitgeoefend door op het vat, dat geheel gevuld is, de kurk met kracht te drukken, dan blijkt bij microscopisch onderzoek, dat de lichaampjes uit de cel zijn verdwenen: het uiterlijk van de bacteriën is geheel gelijk geworden aan dat van de bacteriën, behorende tot de stammen uit groep I. Had men te doen met stam 7), waarvan een suspensie een zeer troebel, melkachtig uiterlijk heeft, dan was na afloop van de druk de vloeistof, indien dit pekel was, zeer veel helderder, indien water was gebruikt, geheel helder geworden. Dit verschil is te wijten aan het feit, dat in water het protoplasma van de bacteriën verslijmt, terwijl in pekel

na afloop van de druk de bacteriën, hoewel van de lichaampjes bevrijd, bewaard blijven. Bij de andere stammen was eveneens een dergelijk helder worden waar te nemen; daar een suspensie van deze stammen echter minder troebel is dan één van stam 7), was dit verschijnsel minder opvallend. Zoo ook was een vlok bacteriën van een van de stammen uit groep II, als deze in de suspensie aanwezig was, na afloop van de druk helder rood van kleur geworden, zelfs was dit het geval met een vlok van stam 7), die normaal bijna wit van kleur is. De proef komt dus geheel overeen met die van STRODTMANN (1895) en KLEBAHN (1895) bij *Gloiotrichia*, welk wier eveneens na het verdwijnen van de „gasvacuolen” doorzichtig was geworden. Het troebele uiterlijk van de cultuur van *Bacterium halobium* (groep II), met als uiterste de „witte” kleur bij aanwezigheid van de lichaampjes, die ik voortaan dus gasvacuolen zal noemen, is een nieuw argument voor de theorie van KLEBAHN.

Een nog sterker argument levert het volgende: wordt de druk plotseling opgeheven, dan treden uit een vlok bacteriën van stam 7), als deze in de suspensie aanwezig is, vele met het bloote oog waarneembare gasbellen naar buiten, terwijl dit niet het geval is met een vlok bacteriën, behorende tot een stam, die geen gasvacuolen bevat. Er werd bij deze proef uitgekookt water of uitgekookte zoutoplossing gebruikt. Naar analogie van de verklaring van KLEBAHN (1895) van de proef met *Anabaena* en *Gloiotrichia* onder het dekglas, zou men dit als volgt kunnen verklaren: door de druk wordt het gas tot absorptie in het protoplasma of de omgevende vloeistof gebracht, daar volgens de wet van HENRY de oplosbaarheid van een gas evenredig is met zijn druk. De korte duur van de proef veroorzaakt echter, dat het gas geen tijd wordt gelaten in de verdere vloeistof te diffundeeren. Bij opheffen van de druk zal dus het protoplasma en het water of de pekkel, die de vlok bacteriën doordrenkt, zeer sterk oververzadigd zijn met gas en dit gas dus weer afgeven.

Het is echter zeer goed mogelijk, dat de druk niet groot genoeg is om het gas geheel te absorbeeren. Ook moet men niet vergeten, dat wanneer de vacuole een voor gas ondoorlaatbare wand bezit, deze eerst moet barsten, alvorens het gas geabsorbeerd kan worden. Het

is misschien juister het proces zich bij de bacterie als volgt voor te stellen. Door de druk zal allereerst de voor gas ondoorlaatbare vacuolewand (als deze tenminste aanwezig is) op de plaats, waar hij de minste weerstand biedt, barsten. (Hoewel de druk buiten de bacterie aan alle zijden even groot is, zal dit binnen de bacterie zeker niet het geval zijn.) Daarna zal het gas voor een deel geabsorbeerd worden door het protoplasma, de rest komt door een barst naar buiten en zal door de vloeistof geheel of gedeeltelijk worden geabsorbeerd, afhankelijk van de duur van de druk. Na afloop van de druk komt het gas weer geheel vrij.

Ook kon een invloed op het S.G. van een vlok bacteriën waargenomen worden, hoewel niet in zulk een mate als bij *Gloio-trichia*, daar een vlok bacteriën in sommige gevallen in water reeds vóór de gasvacuolen waren verwijderd, zich op de bodem bevond. Waar echter een bacteriënmassa dreef, had het verwijderen van de gasvacuolen steeds zinken tengevolge, terwijl een vlok bacteriën van een stam zonder gasvacuolen steeds, zoowel in water als in verzadigde NaCl oplossing, een grooter S.G. had dan de vloeistof. Ik wil er hier op wijzen, dat ook aan een suspensie van bacteriën van stam 7 het geringe S.G. van de bacteriën is waar te nemen, na enkele dagen rustig staan is n.l. aan de oppervlakte van de suspensie een dikke laag bacteriën te vinden. MOLISCH (1906) nam hetzelfde waar aan de door hem beschreven purperbacteriën met gasvacuolen. Hij wijst er op, dat het aanwezige slijm de oorzaak zal zijn, dat de bacteriën zich minder vlug dan *Gloio-trichia* en andere blauwe wieren kunnen verplaatsen. Daar bij *Bacterium halobium* eveneens slijm wordt aangetroffen, kan dit ook hier de oorzaak zijn van het feit, dat de bacteriën niet eerder dan na enkele dagen aan de oppervlakte komen te drijven.

Evenals KLEBAHN (1922) waarnam bij *Gloio-trichia* verdwijnen de gasvacuolen bij *Bacterium halobium* tengevolge van een stoot gemakkelijker dan door een langzaam sterker wordende druk. Voordat ik hierop nader kan ingaan, moet ik eerst vermelden, dat de *Bacterium* onder vacuum, evenals de *Cyanophyceen* de gasvacuolen behoudt. Verschillende bacteriënsuspensies, zoowel in een verzadigde oplossing van NaCl, als in water bevonden zich meer dan

een week in een vacuum-exsiccator bij een druk van 1 cc. kwik: er had geen verandering van kleur plaats en de gasvacuolen bleken onveranderd aanwezig te zijn gebleven. Men moet echter, wil men dit microscopisch constateeren, voorzichtig te werk gaan, daar bleek, dat bij een plotseling terugbrengen van de druk van 1 cc. kwik op 1 atmosfeer de vacuolen verdwijnen uit een bacteriënsuspensie in water, niet uit de bacteriën, die in een oplossing van keukenzout zijn gesuspendeerd. Zooals vermeld worden de bacteriën door water gedood en versmelten de vrij gekomen gasvacuolen tot grillig gevormde lichaampjes. Ik wil er hier op wijzen, dat een gelijk beeld optreedt, als MOLISCH (1903) verkreeg, wanneer hij *Aphanizomenon flos aquae* RALFS. eenige dagen in 10% KNO_3 bracht, waardoor de draden vernietigd werden en de gasvacuolen vrij kwamen en samen-smolten (figuur 4, bladz. 55). De samengevloeiide gasvacuolen van *Bacterium halobium* in water blijken dus door een druk van 1 atmosfeer reeds te worden vernietigd, deze druk moet echter plotseling worden toegediend, bij langzaam terugbrengen van vacuum op 1 atmosfeer bleven de samengevloeiide gasvacuolen onveranderd in de suspensie aanwezig. Door een plotselinge stoot zal de protoplasmarest, die de lichaampjes, gevormd door het samenvloeien van de vacuolen, omgeeft, gemakkelijker kunnen scheuren dan door een langzamer aanzwellende druk.

Het gelukte niet de bacteriën van de gasvacuolen te berooven door op het dekglas te drukken van een preparaat in water of pekell. KLEBAHN (1922) vermeldt, dat hoewel het ook met levend materiaal van *Gloietrichia* mogelijk is, de gasvacuolen door druk op het dekglas van het preparaat te verwijderen, hij toch beter resultaat verkrijgt, wanneer hij gefixeerde of met KOH behandelde blauwe wieren gebruikt. Er werd nu een preparaat gemaakt van de bacteriën van stam 7 in 20% KOH; het bleek, dat men reeds, nadat de bacteriën ongeveer 1 minuut zich hierin bevonden, door op het dekglas met een naald een druk uit te oefenen de vacuolen verwijderen kon, wat zeer goed macroscopisch aan het helder worden van het preparaat op de plaats, waar de naald gerust had, te zien was. Na afloop waren microscopisch tusschen de resten van de bacteriën vele kleine gasbelletjes waar te nemen. Werd het zelfde gedaan met bacteriën van een stam

zonder gasvacuolen, dan ook waren na afloop enkele gasbelletjes waar te nemen, echter zeer veel minder dan wanneer stam 7 gebruikt was. KLEBAHN (1895, 1922) wijst er op, dat, als men op water een druk uitoefent en deze plotseling opheft, er luchtbelllen gevormd worden. Dat gasbelletjes bij de proef met een stam zonder gasvacuolen ontstaan, kan dus zeer goed hierin zijn verklaring vinden.

Het volgende maakt het zeer waarschijnlijk, dat de bacteriën, die door druk van de gasvacuolen ontdaan zijn, nog levensvatbaar zijn. Wanneer de klassieke proef met de druk op de kurk op een suspensie van de bacteriën in een verzadigde oplossing van NaCl, steriel wordt uitgevoerd en na afloop (als in een microscopisch preparaat van de suspensie geen bacteriën met gasvacuolen meer waar te nemen zijn), van deze suspensie een hoeveelheid op agar wordt uitgestreken, dan ontwikkelen zich hierop vele kolonies. Voor het grootste deel bestaan deze uit bacteriën van hetzelfde type als de stam, waarvan is uitgegaan, enkele kolonies blijven echter geheel helder van uiterlijk. Bij microscopisch onderzoek blijken de bacteriën van deze kolonies dan ook geen gasvacuolen te bezitten. Dit resultaat werd zoowel met stam 7, als met een van de andere stammen met gasvacuolen verkregen. De kleur van de heldere kolonies was roodbruin. Ook kwam het voor, dat een segment van een kolonie bestond uit bacteriën zonder gasvacuolen, de rest uit bacteriën met gasvacuolen. Bij verder kweken van de doorzichtige kolonies bleven de culturen de eerste tijd uit bacteriën zonder gasvacuolen bestaan. De culturen, ontstaan uit bacteriën van stam 8, werden na eenige weken echter weer troebel, als gevolg van het weder optreden van gasvacuolen. De culturen, ontstaan uit bacteriën van stam 7, bleven langer het vermogen gasvacuolen te vormen missen. Na ongeveer twee maanden vertoonden echter ook sommige bacteriën van enkele van deze culturen weer het karakteristieke beeld, eigen aan de bacteriën van stam 7, als gevolg van het weer optreden van gasvacuolen, terwijl de cultuur eenigszins troebel was geworden.

Ik sprak, wat betreft de levensvatbaarheid van de bacteriën, die van de gasvacuolen zijn ontdaan, van groote waarschijnlijkheid en niet van zekerheid, omdat het nog mogelijk is, dat enkele bacteriën, hoewel deze niet opgemerkt waren, door de druk niet van de gas-

vacuolen zijn beroofd en dat de opgetreden kolonies de nakomelingen zijn van deze bacteriën. Er zijn dus de volgende mogelijkheden: 1°. De heldere kolonies zijn uit bacteriën, waarvan de gasvacuolen zijn verwijderd, de troebele kolonies uit normaal gebleven bacteriën voortgekomen. De nakomelingen van de bacteriën, waarvan de gasvacuolen zijn verwijderd, missen dus, als we met dit geval te maken hebben, eenige tijd het vermogen gasvacuolen te vormen. Toch geloof ik niet, dat het ontbreken van de gasvacuolen direct het gevolg hoeft te zijn van dit mechanisch ingrijpen. Mechanische invloeden kunnen van zeer ingrijpende aard zijn op het fysisch-chemische karakter van het protoplasma, in ieder geval moet de bacterie, ten gevolge van de wond, die door het uittreden van het gas moet zijn ontstaan in minder gunstige condities verkeeren. Nu is het opvallend, dat ook door ander soort ingrijpen n.l. bij plotseling overbrengen van de bacterie van een bodem met 30 % NaCl op een met 20 %, lange tijd geen gasvacuolen worden gevormd. Het is mogelijk, dat slechte condities, waarin de bacteriën zich bevinden, in het algemeen de vorming van gasvacuolen remmen. Opmerkelijk is, dat ook de culturen op bodems met 20 % NaCl eenigszins bruin van tint zijn en dat de plotseling opgetreden doorzichtige plaatsen in de cultuur van stam 4, waarvan de nakomelingen eenige tijd het vermogen gasvacuolen te vormen hadden verloren, eveneens bruin-rood van kleur waren (zie bladz. 24). De verwijdering van de gasvacuolen zou dus, als geval I juist is, slechts indirect de oorzaak zijn van het ontbreken van deze bij de nakomelingen. 2°. Zoowel de heldere als de troebele kolonies zijn uit bacteriën, waarvan de gasvacuolen zijn verwijderd, voortgekomen. 3°. Beide typen van kolonies zijn uit bacteriën, die de gasvacuolen hebben behouden, voortgekomen. Dat de nakomelingen van deze bacteriën in een groot percentage het vermogen gasvacuolen te vormen hebben verloren, moet in dit geval het gevolg zijn van de nadeelige invloed van de druk op de bacteriën.

B. *De invloed van verschillende reagentia.*

Zooals in de inleiding van dit hoofdstuk vermeld is, verdwijnen de gasvacuolen onmiddellijk, wanneer bij de levende bacteriën in een verzadigde oplossing van NaCl alcohol 96 % wordt gevoegd.

Hetzelfde had plaats met geconcentreerd zoutzuur, met aceton en met een 6 % oplossing van phenol. In de inleiding werd eveneens vermeld, dat als de bacteriën van te voren in water waren gebracht, de alcohol minder snel inwerkt. Dit was ook het geval met phenol en aceton, niet met zoutzuur. Het door water gedooide protoplasma wordt waarschijnlijk door het sterke zuur spoedig vernietigd. Men kan onder het microscoop het plotseling verdwijnen van de vacuolen door toevoeging van dit zuur achtereenvolgens bij de verschillende bacterie-individuen vervolgen. Belangrijk is, dat ook in de preparaten, waarin met reagentia de gasvacuolen zijn verwijderd, vele gasbelletjes ontstaan. Zeer gemakkelijk zijn deze zelfs met het bloote oog waar te nemen, wanneer een hoeveelheid bacteriën van stam 7 in aceton of geconcentreerd zoutzuur wordt gebracht. (Als men het gemakkelijk verdampende aceton gebruikt, doet men het best een preparaat te vervaardigen en dit met vaseline af te sluiten.) Brengt men bacteriën van een stam zonder gasvacuolen in aceton of zoutzuur, dan zijn (ook microscopisch) geen gasbellen waar te nemen. Er werd bij gebruik van beide stammen voor gezorgd, dat geen voedingsbodem mee in de aceton of het zuur werd overgebracht. De stammen waren onder dezelfde omstandigheden gekweekt. Vooral de proef met aceton is van belang voor de gastheorie, daar aceton een zeer indifferente stof is, zoodat het gas niet ontstaan kan zijn door een chemische reactie met een specifieke inhoudstof van de bacteriën van stam 7.

Het blijkt dus, dat de gasvacuolen van *Bacterium halobium* bij toediening van dezelfde stoffen en even snel verdwijnen als dit het geval is met de gasvacuolen van de blauwe wieren. De meening van KLEBAHN (1895), dat deze stoffen het gas verdringen, doordat er een grootere adhaesie bestaat tusschen deze vloeistoffen en het protoplasma om de vacuole dan tusschen het gas en dit protoplasma, geeft een zeer goede verklaring van dit verschijnsel.

Zooals in het literatuuroverzicht beschreven is, was het mogelijk bij de blauwe wieren de gasvacuolen ook met vloeistoffen, die in zeer geringe hoeveelheid in water oplossen, te verwijderen. Dit waren alles organische stoffen, die gemakkelijk vet oplossen. Om na te gaan of de gasvacuolen van *Bacterium halobium* ook door deze stoffen

kunnen worden vernietigd, werd een suspensie van stam 7 in water en een in pekkel met xylol geschud. Deze suspensies waren zeer geconcentreerd, zoodat zij geheel wit van uiterlijk waren. Vijf minuten na het schudden was echter de waterige suspensie geheel helder, terwijl de suspensie in de pekkel veel minder troebel was geworden. Het bleek, dat in de eerste van de bacteriën zoo goed als niets meer te vinden was, terwijl in de laatste de bacteriën nog onveranderd voorkwamen, behalve dat de gasvacuolen verdwenen waren. Dus ook bij *Bacterium halobium* is het zeer goed mogelijk, dat de meening van KLEBAHN (1922), dat de gasvacuolen een wand bezitten, die uit een vetachtige stof bestaat, dus door vetoplosmiddelen als xylol wordt vernietigd, juist is.

C. De invloed van hooge temperatuur.

Wordt een suspensie van de bacteriën in water eenige tijd gekookt, dan verdwijnen de gasvacuolen. Ook WILLE (1902) kon door koken de gasvacuolen uit *Thiothrix* verwijderen. Dat *Gloiotrichia*, na te zijn gedroogd, bij sterk verhitten in olie, hars of paraffine tot 228° C, zoodat het wier bruin wordt, de gasvacuolen behoudt (KLEBAHN (1922)), is hiermee niet in tegenspraak. De celwanden van de gedroogde wieren zullen de gasvacuolen blijven omsluiten, terwijl het koken van de niet gedroogde bacteriën de structuur hiervan zal vernietigen, zoodat het gas kan vrijkomen. KLEBAHN (1922) vermeldt trouwens op bladz. 559, dat lang koken van *Clathrocystis aeruginosa* HENFR. de gasvacuolen vernietigt.

D. De aard van het gas.

Ter eerste oriëntering naar de chemische samenstelling van de inhoud van de gasvacuolen, werd de volgende proef gedaan. Een suspensie van de bacteriën van stam 7 werd bereid in een waterige indigo-karmijnoplossing. De door de indigo-karmijn blauw gekleurde suspensie werd door toevoeging van eenige druppels van een oplossing van het reductiemiddel NaHSO_3 juist ontkleurd. Vervolgens werd een druk op de vloeistof uitgeoefend, zoodat de gasvacuolen uit de bacteriën werden verwijderd. Indien de vacuolen zuurstof

bevatten, zou dus te verwachten zijn, dat de blauwe kleur weer optrad. Dit was echter in het geheel niet het geval, ook niet wanneer vele vlokken bacteriën in de suspensie aanwezig waren, terwijl de oplossing, waar deze met de lucht in aanraking kwam, onmiddellijk blauw van kleur werd. De vacuolen bevatten dus zeer weinig of geen zuurstof. *Bacterium halobium* gedraagt zich in dit opzicht waarschijnlijk evenals de blauwe wieren (KLEBAHN (1922)). Welk gas of gasmengsel dan wel de inhoud van de gasvacuolen uitmaakt, werd niet nader onderzocht.

In het literatuuroverzicht is de meening van KOLKWITZ (1928) en CANABAEUS (1929) besproken. De laatste concludeert uit haar proeven met verschillende blauwe wieren, dat in het algemeen de vorming van gasvacuolen het gevolg is van intramoleculaire ademhaling tengevolge van zuurstofgebrek. Het is mogelijk, dat dit bij de *Cyanophyceae* met gasvacuolen het geval is, bij de aërobe *Bacterium halobium* zeer zeker niet. Het feit, dat *Sarcina ventriculi* een enkele maal gasvacuolen kan bevatten, terwijl zij bij geen andere bekende gistende bacteriën tot nu toe zijn aangetroffen, maar wel bij een aërobe bacterie en bij purperbacteriën, die volgens de onderzoekingen van VAN NIEL (1931) evenmin zich anaëroob in het donker kunnen ontwikkelen, maakt deze theorie niet zeer waarschijnlijk.

E. Enkele conclusies.

Het voorkomen van gasvacuolen bij *Bacterium halobium* is een nieuw bewijs voor de nauwe verwantschap tusschen de *Schizophyceae* en de *Schizomycetes*.

Bacterium halobium blijkt een zeer gunstig object ter nadere onderzoek van de gasvacuolen te zijn, daar men hier met vergelijkbare stammen met en zonder deze inhoudsbestanddeelen te doen heeft.

Niet alleen grillig gevormde, maar ook ronde en ovale gasvacuolen komen voor.

Het is mogelijk, dat bij *Bacterium halobium* het drijfvermogen, dat de gasvacuolen de bacteriën verleen, als een levensfunctie is te beschouwen, daar zij aëroob zijn en in pekkel zeer weinig zuurstof is opgelost (zie hierover bladz. 52).

HOOFDSTUK VI

DE KLEURSTOF VAN DE DRIE GEKLEURDE BACTERIËN

§ 1. Literatuuroverzicht.

Slechts in weinig onderzoeken naar de oorzaak van het rood worden van gezouten visch is aandacht geschonken aan de eigenschappen van de kleurstof van de geïsoleerde micro-organismen. PEIRCE (1914) vermeldt, dat de kleurstof van de door hem geïsoleerde bacterie in de agar van de voedingsbodem diffundeert. In hoofdstuk IV is de mogelijkheid geopperd, dat dit een onjuiste waarneming is geweest. HARRISON en KENNEDY (1922) vermelden, dat de kleurstof van de „*Pseudomonas*” in een zoutoplossing, in absolute methylalcohol, in aethylalcohol en in aceton oplost, niet in aether, xylol, chloroform of zwak zuur. KLEBAHN (1919) ging de invloed van geconcentreerd zwavelzuur na: hij bracht een kleine hoeveelheid levende bacterien, zoowel tot de *Sarcina* als de *Bacterium* behorende, in een druppel geconcentreerd zwavelzuur; het gevolg was, dat op de plaatsen waar het zuur inwerkte, een blauwe verkleuring optrad. Terwijl in deze eigenschap de twee bacteriën dus overeenkomen, loopen zij in extraheerbaarheid van de kleurstof sterk uiteen: terwijl de kleurstof van *Bacterium halobium* zeer gemakkelijk te extraheeren is met aethyl- en methylalcohol en na indampen van de verkregen oplossing gemakkelijk op te lossen in aether, aceton, chloroform en vele andere organische vloeistoffen, schijnt de kleurstof van de *Sarcina* in deze gebruikelijke oplosmiddelen niet oplosbaar te zijn. Wat het absorptie-spectrum betreft: in alcohol opgelost vertoont de kleurstof uit *Bacterium halobium* drie banden (maxima bij $528\mu\mu$, $493\mu\mu$ en $462\mu\mu$). Van de kleurstof van de *Sarcina* kon uit de aard der zaak geen absorptie-spectrum van een oplossing

ontworpen worden. KLEBAHN (1919) onderzocht deze echter in opvallend zonlicht met een microspectraalapparaat van SEIBERT en vond een band tusschen 555 en 535 $\mu\mu$ en algeheele absorptie vanaf 515 $\mu\mu$. Hij besluit uit de oplosbaarheid en het gedrag ten opzichte van zwavelzuur tot nauwe verwantschap van de kleurstof uit *Bacterium halobium* met de lipochromen, dus met de carotinoïden.

§ 2. Eigen onderzoek.

A. De kleurstof van *Bacterium halobium*.

1) Oplosbaarheid.

Wat de oplosbaarheid van de kleurstof betreft, kan ik het onderzoek van KLEBAHN (1919) geheel bevestigen: niet in water, maar in vele organische oplosmiddelen lost de kleurstof zeer goed op. De kleur van de oplossingen is als volgt: paars-rood in CS_2 ; rood in benzol, xylol, toluol, chloroform, olijfolie; oranje-rood in petroleum-aether, aceton, aethyl- en methylalcohol. Geen diffusie van de kleurstof had plaats in de agar van de voedingsbodem.

2) Vergelijking met bacterio-purpurine.

De kleurstof van de purperbacteriën, de bacterio-purpurine bestaat uit twee componenten. Deze kan men afzonderlijk winnen door de bacteriën achtereenvolgens met alcohol en met chloroform of CS_2 te behandelen (MOLISCH (1907)). Hierdoor wordt de groene component, de bacterio-chlorine door de alcohol geëxtraheerd, terwijl de rood gekleurde bacterio-erythrine, die slecht in alcohol oplost, pas door de chloroform of CS_2 uit de bacteriën wordt opgelost. Om na te gaan of *Bacterium halobium* tot de purperbacteriën behoort, werd dus een hoeveelheid bacteriën met aethylalcohol (96 %) behandeld; dit geschiedde met verse bacteriën van stam 5 bij kamertemperatuur. Het extract was echter, zooals onder 1) van deze § reeds meegedeeld is, oranje-rood van kleur. Nu vermeldt BUDER (1919) echter, dat een klein gedeelte van de bacterio-erythrine bij de behandeling met alcohol reeds oplost en dat dit gedeelte groter wordt, naarmate het percentage van de alcohol hoger is. Men kan

met absolute alcohol en gedroogde purperbacteriën een rood of bruin extract verkrijgen. Voegt men nu chloroform bij dit extract en daarna water, dan gaat de erythrine over in de chloroform, de chlorine blijft in de verdunde alcohol. Dit voorschrift werd toegepast op de alcoholische oplossing van de kleurstof uit *Bacterium halobium*, echter zonder resultaat: bij toevoeging van chloroform en daarna van water, ging bij toenemende hoeveelheid water (begonnen was met eenige druppels op 10 c.c. alcohol) steeds meer van de roode kleurstof in de chloroform over, totdat de alcohol niet groen, maar geheel kleurloos was. Bacterio-chlorine is dus niet aanwezig; *Bacterium halobium* behoort dus niet tot de purperbacteriën.

3) *Toepassing van de micro-kristallisatiemethode van MOLISCH (1896).*

Versche culturen van verschillende stammen van de *Bacterium* werden in een afgesloten reageerbuis met alcoholische kali (40 % alcohol, 20 % KOH) gebracht. Na eenige dagen waren onder de microscoop in de vlok bacteriën kleine kristallen waar te nemen. Deze bestonden uit twee soorten, de eene soort was rood en sterf-vormig met onregelmatig vertakte stralen, de andere soort dun, naaldvormig en geel. Beide kleurden zich met geconcentreerd H_2SO_4 blauw. Men heeft dus hierin een aanwijzing met twee verschillende soorten carotinoïden te doen te hebben. (MOLISCH (1896), TSWETT (1911), VAN WISSELING (1915).)

4) *Toepassing van de capillairanalyse van GOPPELSROEDER (1901).*

Een hoeveelheid versche bacteriën werd bij kamertemperatuur geheel met methylalcohol uitgetrokken. In het extract werd een strook filtreerpapier zoodanig gehangen, dat slechts een klein deel van het papier met de vloeistof in aanraking was. Nadat de capillaire opstijging in het papier opgehouden was, werd de strook uit de vloeistof genomen en gedroogd. De strook bleek tot vlak onder de hoogte, waartoe het extract was opgestegen, licht rose van kleur te zijn, daarboven volgde eerst een roode, daarna een oranje-gele zone. Dit wijst dus ook op twee kleurstoffen.

Om nu echter nauwkeuriger de aard van deze kleurstoffen na te

gaan, was het noodzakelijk deze in kristalvorm te winnen; hiervoor is noodig, een groote hoeveelheid kleurstof te isoleren.

5) *Wijze van isolatie.*

De bacteriën werden op agarbodem in petrischalen gekweekt, zoodat de agar geheel met de cultuur overdekt was. Met een spatel konden de bacteriën gemakkelijk van de voedingsbodem afgeschraapt worden. Zij werden versch geëxtraheerd volgens de methode, die WILLSTÄTTER en STOLL (1913) toepasten om de carotinoïden uit groene bladeren te winnen. De bacteriën werden in een mortier met fijn kwartszand en een weinig 70 % aceton gewreven en daarna met 100 % aceton geëxtraheerd. De slijmerige witte rest werd afgefiltreerd en het filtraat in een scheitrechter gebracht. Vervolgens werd een ongeveer even groot volume aether toegevoegd, daarna water, met het gevolg dat de kleurstof geheel in de aether overging. Hierna werd de aether vele malen met water gewasschen om de aceton uit de aether te verwijderen. Wil men de vorming van een emulsie op de scheidingslaag van de waterige aceton en de aether zooveel mogelijk voorkomen, dan kan men, in navolging van VAN DEVENTER (1930) in plaats van water een ± 6 % NaCl oplossing gebruiken. Hierna werd de aether gedroogd met watervrij Na_2SO_4 . Op deze wijze was dus de kleurstof uit de bacterien in een aetherische oplossing verkregen. Daar aether zeer gemakkelijk door verdamping is te verwijderen, kon de kleurstof dus nu na indamping van de oplossing in vele andere oplosmiddelen overgevoerd worden. Het indampen geschiedde bij lage druk, in het donker, in een waterbad, waarvan de temperatuur nooit hooger was dan 50° . De wijze van isolatie komt dus geheel met die van WILLSTÄTTER en STOLL (1913) overeen, behalve dat deze de bladeren met 30 % aceton wreven. Het bleek echter, dat bij deze concentratie van de aceton de kleurstof van de bacteriën kolloïdaal in oplossing gaat en niet meer over te voeren is in aether, behalve dan door toevoegen van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of veel NaCl. Een concentratie van 70 % aceton bleek het best aan het doel te beantwoorden, een nog meer geconcentreerde aceton was ook minder geschikt, daar het bij deze concentratie moeilijk was, de bacteriën voldoende te doen zwellen en fijn te wrijven.

6) *Zuivering van de kleurstof.*

Het residu, verkregen na indamping van het aether-extract, is olieachtig. Dit is een heel gewoon verschijnsel. De carotinoïden lossen in het algemeen zeer goed in vetachtige stoffen op en komen in de plant ook veel in dergelijke stoffen opgelost voor (VAN WISSE-LINGH (1915), ZOPF (1891)). Vandaar ook, dat de methodes ter winning van carotinoïden in kristalvorm, zoowel de microchemische van MOLISCH (1896), als de macrochemische, aanvangen met een behandeling van de ruwe kleurstof, waarbij het tegelijkertijd geëxtraheerde vet wordt verzeept of op een andere wijze verwijderd. Het verzeepen is echter ook van belang voor andere eventueel aanwezige esters. VERMAST (1931) wijst er n.l. op, dat esters van xanthophyl, welke door verschillende onderzoekers in verschillende planten zijn aangetroffen, zich in oplosbaarheid b.v. in de twee-fasen-proef (petr.-aether/85 % alcohol), als carotine gedragen, dus in tegenstelling tot het niet verankerde xanthophyl zelf, in de petr.-aetherlaag oplossen. Het physaliëen uit *Physalis alkekengi* en het heleniëen uit *Tagetes* zijn dergelijke esters. Men is er dus nooit zeker van, dat een kleurstof uit een extract, dat men niet aan verzeeping heeft onderworpen, carotine is en niet een xanthophyl-ester, als deze kleurstof zich als carotine gedraagt.

Het was dus in verschillende opzichten van belang, het verkregen kleurstofextract uit *Bacterium halobium* met alcoholische kali in aanraking te brengen. Om uit de op deze wijze behandelde kleurstof-oplossing de kleurstof te doen neerslaan, werd gebruik gemaakt van het feit, dat de kleurstof zeer slecht in petr.-aether oplost. Deze eigenschap heeft de kleurstof gemeen met capsanthine.

Ter winning van de zuivere kleurstof werd daarom de methode van ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927) gevolgd, die uit het ruwe kleurstofextract uit de vruchten van *Capsicum annuum* deze capsanthine in kristalvorm wonnen (gebruik makende van de slechte oplosbaarheid in petr.-aether).

De kleurstof uit de bacteriëncultuur (stam 5) van ruim honderd petrischalen (diameter: 11 cM.) werd geëxtraheerd en in peroxyd-vrije aether overgevoerd. Vóórdat de aether werd gewasschen, werd een even groot volume petr.-aether toegevoegd, zoodat 1,5—2 L

oplossing verkregen was. Deze oplossing werd gedeeltelijk in een breede scheitrechter, gedeeltelijk in een flesch, boven 100 c.c. methylalcoholische-kali (30 % KOH op absolute methylalcohol) als onderlaag gebracht. Eenige keeren werden de vaten met de vloeistoffen op en neer bewogen (schudden van de oplossing met de alcoholische kali doet te veel kleurstof hierin overgaan). Na een nacht staan, werd het mengsel van aether en petr.-aether van de onderlaag verwijderd en zeer grondig gewasschen met water (15 maal met ongeveer 1 L) tot het water neutraal en kleurloos was, niet meer schuimde, wanneer het geschud werd en de kleurstofoplossing helder was. Nu werd de kleurstof langzamerhand in petr.-aether overgevoerd door de oplossing tot 250 cc in te dampen, daarna 700 cc petr.-aether toe te voegen, weer tot 250 cc in te dampen en daarna 850 cc petr.-aether toe te voegen. Vervolgens werd de oplossing in een koudmakend mengsel (ijs en keukenzout) in de ijskast een nacht bewaard. Het gevolg was, dat de bodem van het vat de volgende dag geheel bedekt was met ruw kristallijn kleurstofmateriaal. De moederlaag was echter nog zeer intensief gekleurd. Deze werd op één vierde van het volume ingedampt. In een koudmakend mengsel sloegen ook hieruit roode kristallen neer. Tot zoover werd geheel de verbeterde methode van ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927) gevolgd en hetzelfde resultaat verkregen. ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927) kristalliseerden de



Foto e. Kristallen van bacterio-ruberine.

ruwe capsanthine ter verdere zuivering in CS_2 om. Deze bewerking had echter, waar het de kleurstof van *Bacterium halobium* betrof, weinig resultaat. Een zeer goede methode ter verdere zuivering, werd

echter gevonden in het toevoegen van petr.-aether na het oplossen van het ruwe kristallijne materiaal in CS_2 (gedestilleerd). Onmiddellijk sloeg een fijne regen van kristallen neer of bleef ge-

deeltelijk in de oplossing zweven. De afgefilterde kristallen werden nogmaals met petr.-aether gewasschen, daarna gedroogd en onder N_2 bij lage temperatuur bewaard. De kleur van de kristallen (zie foto e) is zeer donker rood. Nog moet worden vermeld, dat zorg werd gedragen, dat bij de behandeling de kleurstof zoo min mogelijk werd blootgesteld aan belichting en hooge temperatuur of met zuurstof in aanraking kwam. De oplossing werd daarom van het licht afgesloten, er boven werd steeds stikstof of koolzuur gebracht en bij indamping gezorgd, dat de temperatuur van het waterbad nooit hooger was dan $50^\circ C$. Het is n.l. een bekend feit, dat carotinoïden gemakkelijk geoxydeerd worden en dat het licht hierbij een groote rol speelt. Een oplossing van de ongezuiverde kleurstof van de bacterie was, na ongeveer een week aan licht en lucht te zijn blootgesteld, na steeds geler van kleur te zijn geworden, geheel ontkleurd, terwijl een dergelijke oplossing (N.B. ook in aether) aan de lucht in het donker bewaard, meer dan een maand goed bleef.

7) *Toepassing van de chromatographische analyse van TSWETT (1906a en b).*

Het principe van deze analyse berust op het feit, dat de carotinoïden in bepaalde oplosmiddelen in zeer verschillende mate of in het geheel niet worden geadsorbeerd aan fijn verdeeld materiaal als $CaCO_3$, inuline, saccharose en andere stoffen. Hieruit volgt, dat als zich verschillende carotinoïden in eenzelfde oplosmiddel bevinden en men deze oplossing door een dikke laag van één van de genoemde adsorbentia voert, de stof, die het sterkst geadsorbeerd wordt, de carotinoïden, waarvan dit in mindere mate het geval is, zal verdringen. Deze zullen dus in de onderste gedeelten van de laag, waar ze geen concurrentie meer ondervinden van de eerstgenoemde, vastgehouden worden. Degene, die niet geadsorbeerd worden, zullen natuurlijk in het oplosmiddel blijven en dit kan worden opgevangen. Het moet dus mogelijk zijn met deze methode een mengsel van carotinoïden in zijn componenten te splitsen. Wat een uitvoeriger beschrijving van de analyse betreft, verwijs ik naar TSWETT (1906a en b) en VAN DEVENTER (1930). Ik gebruikte $CaCO_3$ (Merck), welke aan de zuiverheidseischen van de Nederlandsche pharmacopee bleek

te voldoen. Na een paar uur bij 150°C gedroogd te zijn, werd zij in een adsorptiebuis ($2\frac{1}{2}$ cM of $1\frac{1}{2}$ cM bij 7 cM, voor de vorm zie figuur 6) aangestampt. In de overgang van het wijde tot het nauwe gedeelte van de buis bevond zich een prop glaswol. Glas verdient de voorkeur boven watten, daar er carotinoïden zijn, die zeer sterk door cellulose worden geadsorbeerd (b.v. carotinoïde C (VAN DEVENTER (1930))). Eenige kristallen van de kleurstof uit *Bacterium halobium* werden in gedestilleerde zwavelkoolstof opgelost en op de van te voren met dit oplosmiddel bevochtigde zuil van CaCO_3 gegoten. De oplossing werd met behulp van een waterstraalluchtpomp langzaam door de zuil gezogen. Spoedig traden twee duidelijk van elkaar gescheiden gekleurde zônes in de CaCO_3 op, de onderste in veel geringere intensiteit dan de bovenste. De zwavelkoolstof verliet geheel ontkleurd de CaCO_3 . Nadat de oplossing geheel was doorgeleid, werd eenige tijd het zuivere oplosmiddel door de zuil gezogen. Tengevolge hiervan verwijderden de twee ringen zich steeds verder van elkaar en werd de bovenste ring steeds breder, terwijl hierin drie zônes waren te onderscheiden, waar de kleurstof het sterkst was geadsorbeerd. Ik wil deze zônes A_1 , A_2 en A_3 noemen, terwijl ik de onderste ring B noem. Nog later splitste ook A_1 zich, zoodat de bovenste ring uit vier eenigszins in elkaar overvloeiende zônes bestond (A_1' , A_1'' , A_2 en A_3). De kleur van de verschillende adsorptiezônes was eenigszins verschillend, B, A_1' en A_1'' waren steenrood, A_2 wijnrood, A_3 paarsrood van kleur. Met aether konden de ringen weer van de CaCO_3 worden vrijgemaakt, nog beter gelukte dit, wanneer bij de aether eenige cc methylalcohol was gevoegd. Ik had dus een aanwijzing, dat ook de gewonnen kristallen uit een mengsel van twee of meer nauw verwante kleurstoffen bestaan, die aan CaCO_3 worden geadsorbeerd. Er zijn echter nog verschillende moeilijkheden aan de chromatographische analyse verbonden, b.v. kan men niet een scherpe lijn trekken tusschen stoffen, die niet en die wel geadsorbeerd worden. De adsorptie is n.l. zeer sterk afhankelijk van de vastheid, waarmee de CaCO_3 is aangestampt, de concentratie, die de kleurstofoplossing heeft en de sterkte van de zuiging, waarmee de kleurstofoplossing en het zuivere oplosmiddel door de CaCO_3 wordt gevoerd. Zoo werd ring B, die, als de zuil niet zeer

vast was aangestampt, een gering geconcentreerde kleurstofoplossing gebruikt was en een sterke zuiging was toegepast, aanvankelijk nog geadsorbeerd, maar zodra het zuivere oplosmiddel werd doorgeleid weer vrijgemaakt. Verder is steeds door de verschillende botanische onderzoekers, die met deze methode hebben gewerkt, aangenomen, dat alle opgetreden ringen ook verschillende kleurstoffen bevatten. Wel merkte TSWETT (1906b) op, dat men de analyse moet herhalen om de kleurstoffen geheel vrij van elkaar te verkrijgen. Er is echter kort geleden van chemische zijde een publicatie verschenen van KUHN, WINTERSTEIN en LEDERER (1931), waaruit blijkt, dat men zeer voorzichtig moet zijn met conclusies uit deze analyse getrokken. Deze auteurs verkregen, nadat zij 0,5 mgr kristallen van xanthophyl uit bladeren, met 0,5 mgr kristallen zeaxanthine tezamen hadden opgelost in zwavelkoolstof, vier adsorptie ringen aan CaCO_3 . Het bleek, dat als zij de kleurstof uit de tweede en de derde ring tezamen opnieuw door CaCO_3 leidden, er weer vier ringen optraden. Dit kon zoo lang herhaald worden, totdat men het kleurstofmengsel geheel tot twee ringen (de eerste en de vierde) had teruggebracht. De gezamenlijke ringen I bleken na afloop voor 90 % zuiver xanthophyl, de gezamenlijke ringen IV voor 70 % zuivere zeaxanthine te zijn. De twee middelste ringen vertegenwoordigden dus niet twee afzonderlijke kleurstoffen. Het kan zijn, dat iets dergelijks het geval is met de vier adsorptieringen, die TSWETT (1906b) verkreeg met xanthophyl uit bladeren. De kleurstof in de vier ringen aanwezig, noemde hij respectievelijk α , α' , α'' en β xanthophyl. KUHN en WINTERSTEIN (1931) vermelden n.l., dat de β -xanthophyl van TSWETT (1906b) hoogstwaarschijnlijk violaxanthine is (de carotinoïde kleurstof uit *Viola tricolor*). Het zou dus mogelijk zijn, dat de twee middelste ringen van TSWETT bestaan uit mengsels van xanthophyl en violaxanthine.

Het was dus de vraag in hoeverre de adsorptieringen, verkregen met de bacteriekleurstof, afzonderlijke kleurstoffen bevatten.

Er is echter nog een tweede mogelijkheid, n.l. dat er nog meer componenten aanwezig zijn, dan dat er ringen optreden. KUHN en LEDERER (1931) spreken n.l. niet van optreden van adsorptieringen, als zij een mengsel van α - en β -carotine aan kaolien laten adsorbeeren.

(Deze α en β vorm werden onderscheiden op grond van spectroscopische en polarimetrische bepalingen).

Dus werd nagegaan, wat gebeurde bij een herhaling van de analyse. Daar ik voorzag, dat bij deze bewerking veel kleurstof verloren zou gaan, wilde ik liever niet met de kristallen werken. Er werd dus nagegaan of met een oplossing van de ongezuiverde kleurstof hetzelfde adsorptie-beeld kon worden verkregen. Dit bleek het geval te zijn. Nadat de kleurstofoplossing door de CaCO_3 zuil geleid was, werd lange tijd het zuivere oplosmiddel doorgezogen. Daarna werd ring A van B gescheiden, door, nadat de zuil eenigszins gedroogd was, het gedeelte van de CaCO_3 , waarin ring A zich bevond, af te scheppen. Deze werd in een nieuwe adsorptie-buis gebracht en drooggezogen. Nu werd gedroogde aether door de CaCO_3 gezogen, zoodat de kleurstof van het adsorbens werd vrijgemaakt. Uit de aetherische oplossing werd de aether door verdamping verwijderd, de kleurstof opnieuw in zwavelkoolstof opgelost en door een zuil CaCO_3 geleid. Het bleek, dat de scheiding volkomen plaats had gehad, ring B trad niet opnieuw op. Ook wanneer omgekeerd ring B uit de CaCO_3 werd vrijgemaakt en opnieuw door CaCO_3 geleid werd, trad slechts ring B op. A en B zijn dus twee afzonderlijke kleurstoffen. Dit was trouwens te verwachten, gezien het optreden van twee soorten kristallen bij toepassing van de microchemische kristallisatiemethode van MOLISCH (1896). De chromatographische analyse behoeft dus slechts één maal toegepast om A en B te scheiden, mits men lang genoeg met het zuivere oplosmiddel naspoelt. Het bleek n.l. dat, deed men dit niet en scheidde men de twee kleurstoffen direct nadat de kleurstofoplossing doorgeleid was, kleurstof A tot een hoog percentage met B verontreinigd was. Bij deze proef moet nog vermeld worden, dat bij het lange doorleiden van CS_2 opviel, dat sommige ringen zich nog verder deelden. Zoo splitste ring B zich onduidelijk in drie deelen, terwijl behalve A_1 ook A_3 zich in tweeën deelde, zoodat het beeld optrad, zooals in figuur 6 is weergegeven. De vraag was nu, of al deze zônes eveneens zelfstandige componenten van de kleurstof van *Bacterium halobium* bevatten. Het werd alleen nagegaan voor de zônes van ring A, terwijl geen rekening werd gehouden met de splitsing van A_1 en A_3 .

I. A_1 werd van A_2 en A_3 gescheiden en opnieuw geanalyseerd: drie zônes traden op, waarvan de onderste paarsrood was. De geheele ring A is dus weer te voorschijn gekomen. De laag CaCO_3 , waarin zich de bovenste van de drie zônes bevond, werd afgeschept en de hieraan geadsorbeerde kleurstof opnieuw geanalyseerd. Nu trad slechts één ring op, die zich na eenige tijd in tweeën deelde, wat toe te schrijven is aan de splitsing van A_1 in A_1' en A_1'' . Wel vloeiende de ring naar beneden eenigszins uit. De vierde analyse deed ook dit uitvloeien verdwijnen. A_1 is dus een zelfstandig deel van kleurstof A.

II. Met A_3 werd het zelfde resultaat bereikt. Reeds bij de derde analyse trad slechts één ring op, die zich na eenige tijd in twee deelen splitste, wat het gevolg is van de splitsing van deze ring in A_3' en A_3'' .

III. Voor de zône, waarin zich kleurstof A_2 bevond, bestond nu echter de mogelijkheid, dat deze slechts een mengsel van A_1 en A_3 bevatte, evenals de twee middelste ringen in de CaCO_3 zuil, waardoor KUHN, WINTERSTEIN en LEDERER (1931) een oplossing van een mengsel van xanthophyl en zeaxanthine leidden, slechts een mengsel bevatten van deze twee kleurstoffen. Bij de tweede analyse trad echter reeds de middelste van de drie opgetreden ringen duidelijk op de voorgrond. Bij de vierde analyse ontstond één ring, die naar boven en naar beneden eenigszins uitvloeide. Ook A_2 is dus een zelfstandige component van kleurstof A.

Het blijkt dus, dat de roode kleur van *Bacterium halobium* het gevolg is van het voorkomen van twee nauw verwante kleurstoffen, waarvan degene (A), die in de grootste hoeveelheid aanwezig is, op zijn minst bestaat uit drie componenten (isomeren?), terwijl de andere kleurstof (B) waarschijnlijk eveneens uit enkele componenten bestaat. De twee kleurstoffen werden door mij (1931) bacterio-ruberine α en β genoemd. Bacterio-ruberine α en β kunnen dus op dezelfde

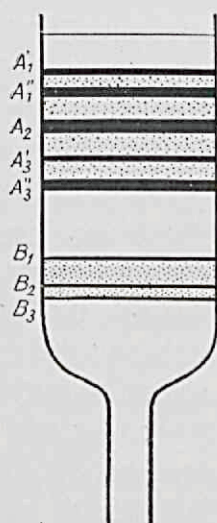


Fig. 6.
Chromatogram
van bacterio-ruberine met behulp van CS_2 en CaCO_3 .

wijze kristallijn gewonnen worden. Zij kunnen in het kristallijnen neerslag óf als mengsel voorkomen, óf zij vormen mengkristallen. Het voorkomen van mengkristallen werd o.a. door KUHN, WINTERSTEIN en LEDERER (1931) waarschijnlijk gemaakt voor het mengsel van carotinoïden, dat uit de eidooier kan worden geëxtraheerd. Deze onderzoekers toonden n.l. aan, dat het xanthophyl uit de eidooier uit een mengsel bestaat van xanthophyl uit bladeren en zeaxanthine (afhankelijk van het voedsel van de kip). Deze twee kleurstoffen zijn echter niet door kristallisatie te scheiden. Zij verklaren dit, door aan te nemen, dat mengkristallen worden gevormd.

Daar het voor de vergelijking van bacterio-ruberine met de andere bekende carotinoïden van belang was te weten of deze ook in petr.-aether opgelost aan CaCO_3 geadsorbeerd wordt, werd een dergelijke oplossing eveneens door een zuil fijn verdeeld CaCO_3 geleid. Het bleek, dat alle aanwezige kleurstofcomponenten geadsorbeerd werden: het extract, dat vrij kwam was geheel ontkleurd. Twee ringen waren in de zuil aanwezig, de bovenste was rood, de onderste oranje van kleur. Geen van de ringen was in zônes verdeeld. Het bleek echter, dat wanneer aether werd toegevoegd, drie zônes in de bovenste ring (die verreweg de meeste kleurstof bevatte, dus uit bacterio-ruberine α bestond) optraden, terwijl de kleurstof in dit oplosmiddel opgelost, langzaam door de CaCO_3 naar beneden zakte en vrij kwam.

8) *Enkele eigenschappen van bacterio-ruberine α en β .*

a) *Inleiding.*

Om de kleurstoffen uit *Bacterium halobium* met andere reeds beschreven carotinoïden te kunnen vergelijken, moesten verschillende eigenschappen van deze kleurstoffen worden nagegaan. Ik onderzocht allereerst of verschillende reacties, die kenmerkend voor de carotinoïden zijn, een positief verloop hadden. Daarna werden het absorptie-spectrum en de oplosbaarheid nagegaan. Ik ben mij hierbij bewust zeer onvolledig te zijn, want zonder verder chemisch onderzoek is het natuurlijk uitgesloten nauwkeurig bacterio-ruberine α en β met de reeds bekende carotinoïden te vergelijken.

b) *Gedrag ten opzichte van de reacties van VAN WISSELINGH op carotinoïden.*

VAN WISSELINGH (1915) beschreef een reeks reacties, die min of meer karakteristiek zijn voor de carotinoïden uit de plant. Het bleek, dat degene, hiervan door mij op de kristallen van bacterio-ruberine α en β toegepast, een positief resultaat opleverden. Kristallen van bacterio-ruberine α worden in geconcentreerd zwavelzuur blauw; in geconcentreerd salpeterzuur eerst blauwgroen, later groen; in een oplossing van jodium in joodkalium langzamerhand groen; in een verzadigde oplossing van ZnCl_2 in 26 % HCl onmiddellijk blauw; in verdund broomwater blauwgroen. Kristallen van bacterio-ruberine β worden in geconcentreerd zwavelzuur blauw; in geconcentreerd salpeterzuur blauwgroen; in een oplossing van jodium in joodkalium groen; in een verzadigde oplossing van ZnCl_2 in 26 % HCl onmiddellijk blauw; in verdund broomwater blauw.

c) *Absorptie-spectrum.*

Ter vergelijking met de banden, die KLEBAHN (1919) waarnam in het absorptie-spectrum van een oplossing van de kleurstof van *Bacterium halobium*, werd allereerst het spectrum van het mengsel van bacterio-ruberine α en β , zooals het in de bacteriën voorkomt, onderzocht. Foto *f* geeft een spectogram gemaakt met een kleine Fuess-spectrograaf van de ongezuiverde kleurstof, opgelost in CS_2 . Men ziet, dat het spectrum twee banden vertoont, waarvan degene, die zich het dichtst bij

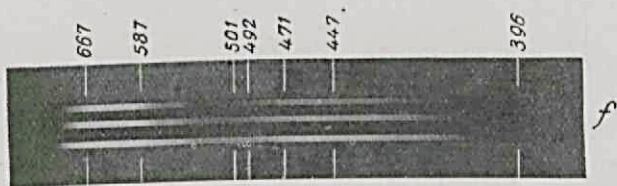


Foto *f*. Spectrogram van de absorptiebanden van bacterio-ruberine in CS_2 .

het violette deel van het spectrum bevindt, onduidelijk in twee deelen is gedeeld. Met behulp van een dubbelmonochromator, werd vervolgens quantitief het absorptiespectrum bepaald. De opstelling was dezelfde als JANSSEN (1931) bij zijn onderzoek gebruikte en die hij als volgt beschreef: „Met behulp van een lens werd het licht, afkomstig

van een 6 Volts automobiel-lampje, dat met constante stroom gevoed werd, evenwijdig gemaakt. De hierachter geplaatste lens

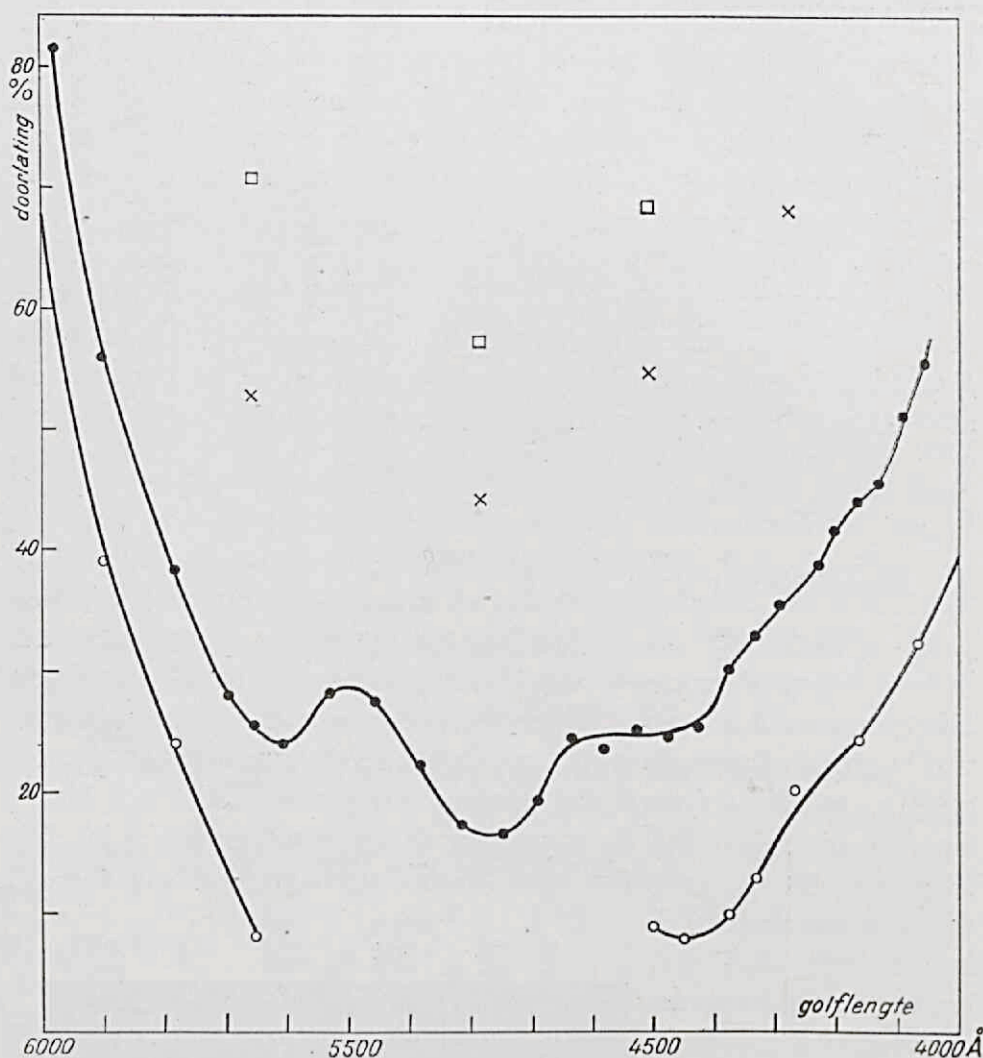


Fig. 7. Percentueele doorlating bij verschillende golflengten voor oplossingen van bacterio-ruberine $\alpha + \beta$ in CS_2 . De teekens ●, ○, × en □ geven bepalingen aan, gedaan aan oplossingen, waarvan de concentratie zich respectievelijk verhoudt als $1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{4} : \frac{1}{8}$.

vormde een beeld van de spiraal der lamp op de eerste spleet van een dubbelmonochromator volgens VAN CITTERT (1923). Een achter de monochromator geplaatst achromatisch lenzenstelsel

beeldde de laatste spleet van de monochromator af op een vacuum-thermo-element. De opvallende energie werd gemeten met een

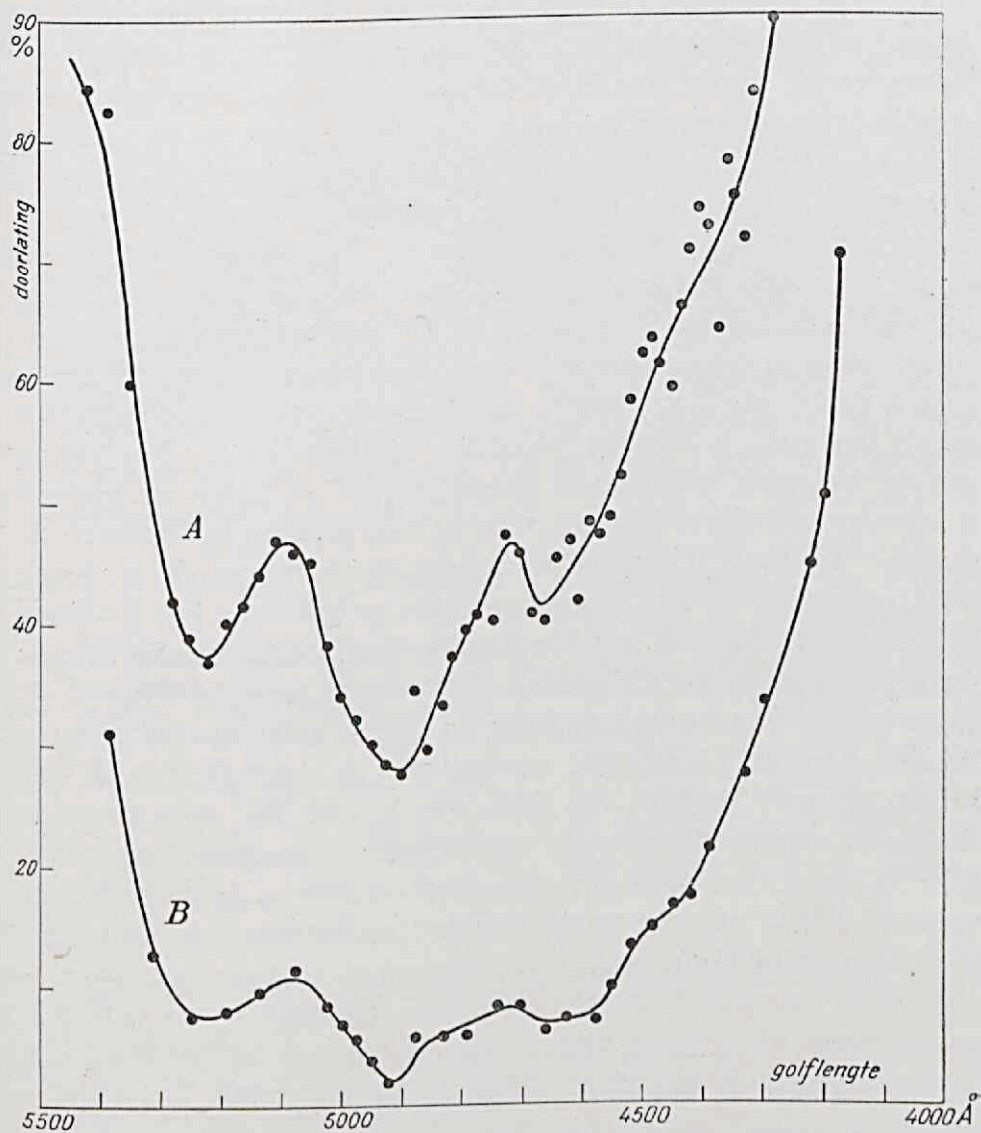


Fig. 8. Doorlatingskromme van bacterio-ruberine α (A) en bacterio-ruberine $\alpha + \beta$ (B) in methylalcohol.

thermo-relais-opstelling volgens MOLL en BURGER (1925). Tusschen de beide eerste lenzen werden twee naast elkaar opgestelde kuvetten geplaatst. Deze kuvetten, waarvan het eene met het oplosmiddel,

het andere met de oplossing gevuld was, konden om de beurt in de lichtbundel gebracht worden”.

Voor een uitvoeriger beschrijving zie VAN DEVENTER (1930). Men bepaalt de intensiteit van het licht, dat door de te onderzoeken oplossing wordt doorgelaten in de verschillende spectraalgebieden. De doorlating in procenten verkrijgt men door de verkregen uitslag, wanneer de kuvet met de kleurstofoplossing zich in de lichtbundel bevindt, te deelen door de uitslag verkregen, wanneer dit met de kuvet met het oplosmiddel het geval is. Een doorlatingskromme wordt verkregen, wanneer men de doorlating in procenten uitzet tegen de golflengten. De plaatsen in de kromme, waar deze doorlating gering is, komen overeen met de absorptiebanden van de kleurstofoplossing. Om deze banden van het volledig aantal kleurstoffen uit de bacteriën te bepalen, werd een ongeveer 0,001 % oplossing van de verkregen kristallen in gedestilleerde CS_2 bereid en hiervan de absorptie-kromme bepaald; deze is weergegeven in figuur 7 (de onderste kromme). Daar het bij deze concentratie van de oplossing slechts mogelijk was, de doorlating in een gedeelte van het spectrum te bepalen, werd een 0,0005 % oplossing bereid. Een volledige kromme kon hiervan verkregen worden (de bovenste kromme in figuur 7). Eveneens werd voor enkele golflengten de doorlating van oplossingen bepaald van een concentratie van 0,00025 en 0,000125 %. De gebruikte kuvetten hadden een dikte van $\frac{1}{2}$ cM. Het meten van de doorlating van oplossingen van verschillende concentratie was noodzakelijk om na te gaan of deze kleurstofoplossingen de wet van Beer volgden d.w.z. of voor verschillende concentraties de extinctie-coëfficiënt gelijk blijft. Is dit niet het geval, dan mogen geen conclusies uit de krommen getrokken worden, daar dan bij verschillende concentraties de banden niet op dezelfde plaats in het spectrum liggen. In formule uitgedrukt luidt de wet van BEER:

$$E = \log \frac{I}{I_0} = -k c d,$$

waarin E = extinctie, K = extinctie-coëfficiënt, c = concentratie van de absorbeerende deeltjes, d = dikte van laag in cM, I_0 = intensiteit van het licht vóór de absorptie, I = intensiteit van het licht

na de absorptie. De log. van de percentueele doorlating moet dus recht evenredig zijn met de concentratie, bij gelijke dikte van de kuvet. Bij uitzetting van deze twee grootheden moet men dus een rechte lijn verkrijgen. Voor de golflengten : 5655, 5280, 5000 en 4770 Å werd de wet van BEER getoetst. De oplossingen bleken de wet te volgen.

In figuur 8 (B) is weergegeven de doorlatingskromme van de bacteriekleurstoffen in methylalcohol. Vergelijkt men deze met de kromme, verkregen met de oplossing in zwavelkoolstof (figuur 7), dan valt de groote bandverschuiving naar het violette deel van het spectrum op, als gevolg van het verschil in eigenschappen tusschen de oplosmiddelen. Daar de invloed van het oplosmiddel op de absorptie van de opgeloste stof, als alcoholen gebruikt worden, weinig zal verschillen, kunnen dus nu de minima uit de doorlatingskromme voor methylalcohol met de banden, die KLEBAHN (1919) waarnam, vergeleken worden (zie tabel I).

TABEL I

Aethylalcoholextract van <i>Bacterium halobium</i> volgens Klebahn (1919)		Bacterio-ruberine $\alpha + \beta$ in methylalcohol	
band	max.	band	max.
I krachtig	528 $\mu\mu$	I krachtig	523 $\mu\mu$
II zeer krachtig	493 $\mu\mu$	II zeer krachtig	492 $\mu\mu$
III zwak	462 $\mu\mu$	III krachtig	462 $\mu\mu$

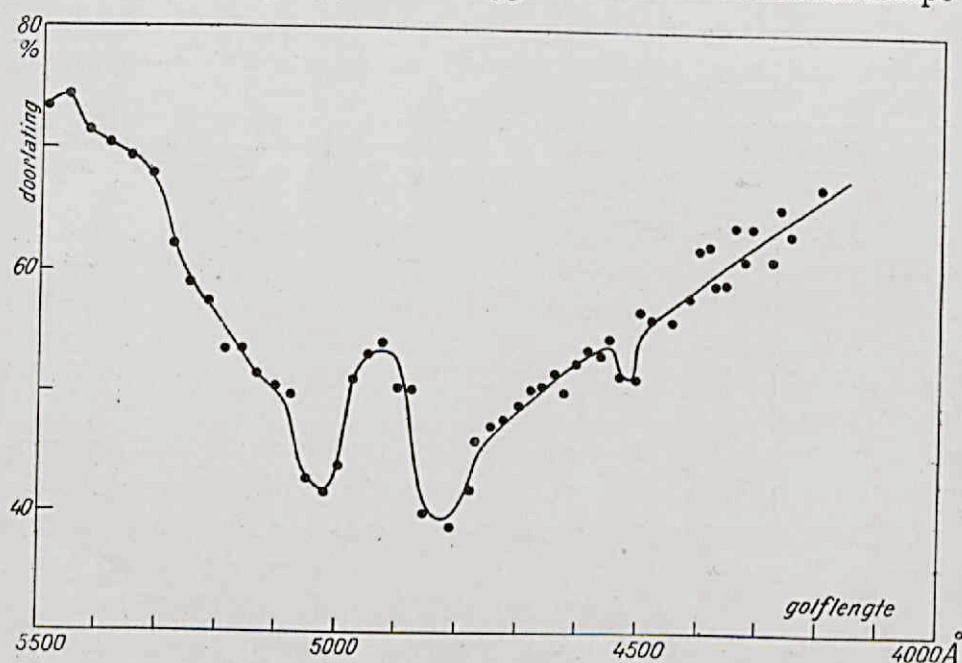
De overeenkomst tusschen de waarneming van KLEBAHN en mij is dus zeer groot.

Nu moeten echter de doorlatingskrommen van de kleurstofcomponenten nog afzonderlijk worden onderzocht. In figuur 8 (A) en 9 zijn de doorlatingskrommen van bacterio-ruberine α en β afzonderlijk (opgelost in methylalcohol) weergegeven. De componenten waren weer verkregen door gefractioneerde adsorptie aan CaCO_3 van een oplossing van de kristallen. De volgende banden uitgedrukt in $\mu\mu$ zijn uit de krommen af te leiden:

TABEL II

Bacterio-ruberine α in methylalcohol		Bacterio-ruberine β in methylalcohol	
band	max.	band	max.
I zeer krachtig	522 $\mu\mu$	I zeer krachtig	502 $\mu\mu$
II zeer krachtig	490 $\mu\mu$	II zeer krachtig	482 $\mu\mu$
III krachtig	466 $\mu\mu$	III zwak	452 $\mu\mu$?

Het blijkt, dat α en β beide twee zeer krachtige absorptie-banden vertoonen en dat die van α ten opzichte van die van β naar het blauw verschoven liggen. Uit de vergelijking met het mengsel van beide is verder af te leiden, dat α de toonaangevende component is, daar de minima van α samenvallen met die van het mengsel der twee kleurstoffen. Dus ook in zwavelkoolstof opgelost zullen de minima van α moeten samenvallen met de minima in de doorlatingskromme van het mengsel. Hieruit volgt, dat de maxima van de absorptie-banden van bacterio-ruberine α (opgelost in zwavelkoolstof) ongeveer bij 560 $\mu\mu$, 530 $\mu\mu$ en 500 $\mu\mu$ moeten liggen. Van de verschillende compo-

Fig. 9. Doorlatingskromme van bacterio-ruberine β .

nenten, waarin α en β zijn onderverdeeld, werd niet afzonderlijk het absorptie-spectrum bepaald.

Het in dit gedeelte van de § beschreven onderzoek werd in het Fysisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht verricht. Professor Dr. L. S. ORNSTEIN dank ik ten zeerste ervoor, dat hij mij toestond van de toestellen gebruik te maken. Ook wil ik Dr. C. JANSSEN CZN. op deze plaats danken voor de door hem verleende assistentie.

d) *Oplosbaarheid van bacterio-ruberine α en β .*

De proeven werden genomen met α en β verkregen door chromatographische analyse van een oplossing van de kristallen in zwavelkoolstof. De oplosbaarheid bleek in grove trekken voor beide kleurstoffen gelijk te zijn. Het best lossen beide op in methylalcohol, dan volgen aceton, aether, zwavelkoolstof, chloroform, toluol; in absolute aethylalcohol en terpentijnolie lossen zij vrij goed, in aethylalcohol 96 % vrij slecht, in oliëfolie slecht en in petr.-aether en benzine zeer slecht op, in verdund zoutzuur of zwavelzuur en in water niet. Bacterio-ruberine β is in oplossing geler van kleur dan bacterio-ruberine α . Vervolgens werd nagegaan, hoe de kleurstoffen zich in de 2-fasen-proef (petr.-aether/methylalcohol 80—92 %) gedragen. Het bleek, dat zij geheel in de methylalcohol oplossen, dus hypophasisch zijn, evenals xanthophyl (WILLSTÄTTER en STOLL (1913)). Toch is deze voorkeur voor de alcohol niet zoo groot als van fucoxanthine en capsanthine, die in het systeem 70 % methylalcohol/aether + petr.-aether (1 : 1) geheel in de methylalcohol oplossen (respectievelijk WILLSTÄTTER en PAGE (1914) en ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927)). Bacterio-ruberine α en β verdeelen zich over de beide fasen, α in grootere hoeveelheid in de methylalcohol, β in grootere hoeveelheid in de bovenste fase. Dat het bij deze proef noodzakelijk is van de van vet bevrijde kleurstof uit te gaan, blijkt uit de ervaring, die ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927) opdeden met capsanthine. Deze kleurstof gaf n.l. vóór de verzeeping van het extract de voorkeur aan het mengsel van aether en petr.-aether, na de verzeeping aan de 75 % methylalcohol. Ook bacterio-ruberine lost vóór de verzeeping van het tegelijkertijd geëxtraheerde vet beter

op in petr.-aether dan na deze zuivering, maar van een omkeering van de ontmengingsproef is toch geen sprake. Vervolgens werd nagegaan, hoe de twee kleurstoffen zich gedroegen ten opzichte van het systeem zwavelkoolstof/methylalcohol 100 %. Bacterio-ruberine α bleek in de methylalcohol op te lossen, bacterio-ruberine β zich over beide fasen te verdeelen. Werd echter de methylalcohol eenigszins verdund, dan gingen beide kleurstoffen onmiddellijk geheel in de zwavelkoolstof over.

e) *Vergelijking met andere kleurstoffen.*

Hoewel het reeds onder A 2) van deze § is besproken, wil ik er hier nogmaals op wijzen, dat de veronderstelling in de inleiding onjuist is gebleken te zijn. In geen geval behooren alle roode pek-bacteriën tot de purperbacteriën. *Bacterium halobium* tenminste bevat twee of meer carotinoïde kleurstoffen, terwijl bacterio-purpurine uit een of twee (of meer?) carotinoïde kleurstoffen en een groene kleurstof van geheel andere samenstelling bestaat. Uit tabel III blijkt, dat bacterio-ruberine α en β in eigenschappen verschillen van bacterio-erythrine β , de carotinoïde, die door de meeste onderzoekers in de purperbacterien is aangetroffen.

Bacterio-erythrine α komt echter, wat spectrum betreft overeen met bacterio-ruberine α . Bacterio-erythrine α is door MOLISCH (1907) in de purperbacterie *Rhodobacillus palustris* aangetroffen en ook ARCICHOVSKY verkreeg volgens BUDER (1919) van de carotinoïde kleurstof uit een purperbacterie het absorptie-spectrum van bacterio-erythrine α . Onderzoekingen over de chemie van de kleurstoffen moeten beslissen of werkelijk bacterio-ruberine α en bacterio-erythrine α dezelfde pigmenten zijn. De slechte oplosbaarheid van bacterio-erythrine in alcohol doet het niet verwachten. In de tweede plaats wil ik er op wijzen, dat ook *Bacillus prodigiosus* een geheel andere kleurstof produceert dan *Bacterium halobium*. Het prodigiosine behoort niet tot de carotinoïden, hetgeen door WREDE (1930) is aangetoond.

Wanneer men bacterio-ruberine α en β met andere bekende carotinoïden vergelijkt (zie tabel III), dan blijkt, dat bacterio-ruberine α eenige overeenstemming vertoont met rhodoxanthine, de caroti-

noïde kleurstof, die LIPPMAA (1925) o.a. uit rood gekleurde bladeren van *Reseda odorata* isoleerde. Ook de kleur van de kristallen komt bij beide kleurstoffen overeen, eveneens het volgende.

In zeer geconcentreerde methylalcoholische kali ontstaat volgens LIPPMAA (1925) een kalium-verbinding van rhodoxanthine, die met verdund zoutzuur onmiddellijk ontkleurt en die niet of in zeer geringe mate oplosbaar is in aether en andere oplosmiddelen. Wanneer men bacterio-ruberine (opgelost in een mengsel van aether en petr.-aether) met geconcentreerde methylalcoholische kali behandelt (zie onder A 6) van deze §), dan gaat een deel van de kleurstof in de alcoholische kali over, die hierdoor rood gekleurd wordt. Het blijkt echter, dat bacterio-ruberine in de alcoholische kali een verandering ondergaat, daar bij toevoeging van aether en daarna water geen kleurstof uit deze oplossing in de aether over kan worden gevoerd, terwijl bij toevoeging van verdund zoutzuur onmiddellijk ontkleuring plaats heeft. Het is dus waarschijnlijk, dat ook hier een kalium-verbinding ontstaat, die onoplosbaar is in aether.

Een verschil tusschen bacterio-ruberine α en rhodoxanthine komt in de oplosbaarheid en de adsorptie tot uiting, daar volgens LIPPMAA (1925) de kristallen van rhodoxanthine in methylalcohol veel slechter oplossen dan in zwavelkoolstof, aceton en andere oplosmiddelen en rhodoxanthine in zwavelkoolstof opgelost niet aan CaCO_3 wordt geadsorbeerd. Van een overeenkomst van bacterio-ruberine β met een andere bekende carotinoïde (zie tabel III) is weinig te bespeuren.

9) *Berust het verschil in kleur tusschen de verschillende stammen op een verschil in kleurstof?*

Daar tot nu toe slechts met stam 5) was gewerkt, werd vervolgens de kleurstof uit de overige stammen chromatographisch volgens TSWETT (1906a en b) geanalyseerd. Hiertoe werd de ongezuiverde kleurstof in zwavelkoolstof opgelost en door CaCO_3 geleid. Het bleek, dat alle stammen het zelfde adsorptie-beeld opleverden (zie figuur 6). Daar het echter mogelijk was, dat de kleurstof van de verschillende stammen, hoewel nauw verwant en uit evenveel componenten bestaande, toch in hoedanigheid van deze componenten verschilt, werd een mengsel van de kleurstof uit twee stammen

TABEL III

	Absorptie-spectrum van de kleurstof in CS ₂ opgelost	Absorptie-spectrum van de kleurstof in alcohol opgelost	2-fasenproef petr.-aether methylalc. 85%	2-fasenproef petr.-aether + aether (1 : 1) methylalc. 70 %	2-fasenproef methyl-alc. 85% CS ₂	Adsorptie van de kleurstof opge- lost in CS ₂ aan CaCO ₃	Adsorptie van de kleurstof opge- lost in petr.- aether aan CaCO ₃
carotine	521—500, 488—471, 455—442 v. DEVENTER (1930)	492—478, 459—446, 415— WILLSTÄTTER en STOLL (1913)	petr.-aether W. en St. (1913)			negatief TSWETT (1906a en b)	negatief TSWETT (1906a en b)
lycopine	554—540, 514—499, 479—472 WILLSTÄTTER en ESCHER (1910)	510—499, 480—468, 440— WILLSTÄTTER en ESCHER (1910)	waarschijnlijk petr.-aether zie PALMER (1922)				negatief COWARD (1924)
xanthophyl uit bladeren (= luteïne volgens KUHN, WINTERSTEIN en LEDE- RER (1931))	maxima bij: 508, 475 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	484—472, 454—441, 410— WILLSTÄTTER en STOLL (1913)	methyl-alc. W. en St. (1913)	beide KUHN en WINTERST. (1931)	hoofdzakelijk in methylalc. LIPPMAA (1925)	positief TSWETT (1906b)	positief TSWETT (1906b)
zeaxanthine	maxima bij: 517, 482 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	maxima bij: 483, 451 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	beide PALMER en ECKLES (1914)			positief KUHN, WINTERST. en LEDERER (1931)	
violaxanthine	maxima bij: 500, 469 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	maxima bij: 471, 442 KUHN en WINTERSTEIN (1931)		beide KUHN en WINTERST. (1931)		positief KUHN en WIN- TERSTEIN (1931)	
fucoxanthine		486—469, 455—440, 440— WILLSTÄTTER, zie PALMER (1922)		methyl-alc. WILLST. en PAGE (1914)			
capsanthine	548—532, 511—457 ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927)	517—477, 464—446 ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927)		methyl-alc. ZECHM. en CH. (1927)			
rhodoxanthine	570—560, 530—515, 490—475, 450—440 LIPPMAA (1925)		methyl-alc. LIPPMAA (1925)		CS ₂ LIPPMAA (1925)	negatief LIPPMAA (1925)	positief LIPPMAA (1925)
carotinoïde A (v. DEVENTER (1930))	maxima bij: 517, 475, 455 v. DEVENTER (1930)		petr.-aether v. DEVENTER (1930)				negatief v. DEVENTER (1930)
carotinoïde B (v. DEVENTER (1930))	maxima bij: 535, 505, 475 v. DEVENTER (1930)	maxima bij: 490, 470, 440 v. DEVENTER (1930)	beide v. DEVENTER (1930)				positief v. DEVENTER (1930)
carotinoïde C (v. DEVENTER (1930))	meer naar rood verschoven ten opzichte van carotinoïde A en B (v. DEVENTER (1930))		petr.-aether v. DEVENTER (1930)				negatief v. DEVENTER (1930)
bacterio-erythrine α	585—555, 540—515 MOLISCH (1907)						
bacterio-erythrine β	560—535, 510—490 MOLISCH (1907)						
bacterio-ruberine α	569—553, 546—515, 504—495 (ongeveer)	529—513, 506—475, 470—461 maxima bij: 522, 490, 466	methyl-alcohol	beide	CS ₂	positief	positief
bacterio-ruberine β		510—498, 488—467, 455—450 maxima bij: 502, 482, 452	methyl-alcohol	beide	CS ₂	positief	positief

	Absorptie-spectrum van de kleurstof in CS ₂ opgelost	Absorptie-spectrum van de kleurstof in alcohol opgelost	2-fasenproef petr.-aether methylalc. 85%	2-fasenproef petr.-aether + aether (1:1) methylalc. 70%	2-fasenproef methylalc. 85% CS ₂	Adsorptie van de kleurstof opge- lost in CS ₂ aan CaCO ₃	Adsorptie van de kleurstof opge- lost in petr.- aether aan CaCO ₃
carotine	521—500, 488—471, 455—442 v. DEVENTER (1930)	492—478, 459—446, 415— WILLSTÄTTER en STOLL (1913)	petr.-aether W. en St. (1913)			negatief TSWETT (1906a en b)	negatief TSWETT (1906a en b)
lycopine	554—540, 514—499, 479—472 WILLSTÄTTER en ESCHER (1910)	510—499, 480—468, 440— WILLSTÄTTER en ESCHER (1910)	waarschijnlijk petr.-aether zie PALMER (1922)				negatief COWARD (1924)
xanthophyl uit bladeren (= luteine volgens KUHN, WINTER- STEIN en LEDE- RER (1931))	maxima bij: 508, 475 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	484—472, 454—441, 410— WILLSTÄTTER en STOLL (1913)	methylalc. W. en St. (1913)	beide KUHN en WINTERST. (1931)	hoofdzakelijk in methylalc. LIPPMAA (1925)	positief TSWETT (1906b)	positief TSWETT (1906b)
zeaxanthine	maxima bij: 517, 482 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	maxima bij: 483, 451 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	beide PALMER en ECKLES (1914)			positief KUHN, WINTERST. en LEDERER (1931)	
violaxanthine	maxima bij: 500, 469 KUHN en WINTERSTEIN (1931)	maxima bij: 471, 442 KUHN en WINTERSTEIN (1931)		beide KUHN en WINTERST. (1931)		positief KUHN en WIN- TERSTEIN (1931)	
fucoxanthine		486—469, 455—440, 440— WILLSTÄTTER, zie PALMER (1922)		methylalc. WILLST. en PAGE (1914)			
capsanthine	548—532, 511—457 ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927)	517—477, 464—446 ZECHMEISTER en CHOLNOKY (1927)		methylalc. ZECHM. en CH. (1927)			
rhodoxanthine	570—560, 530—515, 490—475, 450—440 LIPPMAA (1925)		methylalc. LIPPMAA (1925)		CS ₂ LIPPMAA (1925)	negatief LIPPMAA (1925)	positief LIPPMAA (1925)
carotinoïde A (v. DEVENTER (1930))	maxima bij: 517, 475, 455 v. DEVENTER (1930)		petr.-aether v. DEVENTER (1930)				negatief v. DEVENTER (1930)
carotinoïde B (v. DEVENTER (1930))	maxima bij: 535, 505, 475 v. DEVENTER (1930)	maxima bij: 490, 470, 440 v. DEVENTER (1930)	beide v. DEVENTER (1930)				positief v. DEVENTER (1930)
carotinoïde C (v. DEVENTER (1930))	meer naar rood verschoven ten opzichte van carotinoïde A en B (v. DEVENTER (1930))		petr.-aether v. DEVENTER (1930)				negatief v. DEVENTER (1930)
bacterio-erythrine α	585—555, 540—515 MOLISCH (1907)						
bacterio-erythrine β	560—535, 510—490 MOLISCH (1907)						
bacterio-ruberine α	569—553, 546—515, 504—495 (ongeveer)	529—513, 506—475, 470—461 maxima bij: 522, 490, 466	methyl-alcohol	beide	CS ₂	positief	positief
bacterio-ruberine β		510—498, 488—467, 455—450 maxima bij: 502, 482, 452	methyl-alcohol	beide	CS ₂	positief	positief

geanalyseerd. Is b.v. A_1 van stam 1) een isomeer van A_1 van stam 2), dan is het zeer waarschijnlijk, dat deze twee stoffen niet even sterk worden geadsorbeerd. Een mengsel van de kleurstoffen uit twee stammen moet in dit geval een grooter aantal adsorptie-ringen opleveren dan de kleurstoffen van één stam afzonderlijk. Het bleek echter, dat vermenging van de kleurstoffen geen vermeerdering van ringen teweeg bracht, zelfs al werd de kleurstof gewonnen uit een mengsel van alle geïsoleerde stammen tezamen.

Een tweede argument, dat er voor pleit, dat het kleurstofmengsel uit de verschillende stammen niet belangrijk in samenstelling verschilt, levert de vergelijking van het absorptie-spectrum van een oplossing van bacterio-ruberine uit de verschillende stammen. Het spectrum werd bepaald van een oplossing in zwavelkoolstof van de ongezuiverde kleurstof uit de stammen 6) en 8) met behulp van een monochromator van Winkel-Zeiss. Voor het gebruik van dit toestel dank ik Dr. E. NUERNBERGK zeer.

De plaats van de banden werd met het bloote oog afgelezen. Voor stam 8) werden de volgende banden bepaald: van 572—557 $\mu\mu$ en van 540—519 $\mu\mu$, voor stam 6): van 572—553 $\mu\mu$ en van 535—522 $\mu\mu$. In de belangrijkste banden komen dus de kleurstoffen uit deze stammen overeen. Daar stam 6) en 8) tot de twee stammen behoren, die het meest in kleur verschillen, neem ik aan, dat ook bij de overige stammen deze overeenkomst bestaat.

Zooals te verwachten was, daar de kleurstof tot de carotinoïden behoort, is bacterio-ruberine in zuur en alkalisch milieu niet verschillend van kleur. Dus het verschil in kleur tusschen de verschillende stammen kan niet het gevolg zijn van verschillende zuurgraad. Daar een dergelijk kleurverschil wel voorkomt bij de kleurstof van *Bacillus prodigiosus* (KRAFT (1902), WREDE (1930)), volgt ook hieruit, dat bacterio-ruberine en prodigiosine niet verwant zijn.

Het verschil in kleur tusschen de verschillende stammen zal dus een gevolg kunnen zijn: 1°. van de verschillende wijzen, waarop een gelijke kleurstof in de cel aanwezig is. (De kleurstofmoleculen kunnen in de verschillende stammen in verschillend groote complexen aanwezig zijn), 2°. van een verschillende verhouding, waarin de gelijke componenten voorkomen. (Het is mogelijk, dat een paars gekleurde

stam bacterio-ruberine α in relatief grootere hoeveelheid bevat dan een roode stam), 3°. van een combinatie van het 1°. en 2°. geval. Dat het 2°. geval voorkomt, is niet zeer waarschijnlijk. Dit grond ik niet op het feit, dat het spectrum van de kleurstof uit de verschillende stammen in groote trekken overeenkomt, daar bleek, dat bacterio-ruberine α in een zoo overheerschende mate voorkomt, dat de maxima van absorptie van een oplossing van een mengsel der beide kleurstoffen overeenkomt met de maxima van een oplossing van α afzonderlijk, zie figuur 8. Het is echter moeilijk te begrijpen, hoe een mengsel van de twee kleurstoffen een paarse kleur aan de bacteriën kan verleenen, daar zelfs in zwavelkoolstof opgelost de kleur van bacterio-ruberine α en β respectievelijk paars-rood en oranje-rood is. Ook is het opvallend, dat zoodra de kleurstof bij de extractie uit de bacteriën in de aceton overgaat, de kleur verandert van paars in oranje-rood, als stam 6) gebruikt is en oranje-rood blijft, als stam 8) gebruikt is. Ook de intensiteit van de kleur van de ringen in het chromatogram zijn voor het bloote oog in hun onderlinge verhouding gelijk voor de verschillende stammen.

B. De kleurstof van de beide overige gekleurde bacteriën.

Aangaande de kleurstof van *Sarcina morrhuae* en *Bacterium trapanicum* werden slechts zeer weinig onderzoeken gedaan. Bij geen van beide bacteriën diffundeert de kleurstof in de agar van de voedingsbodem. De kleurstof van beide bacteriën heeft de eigenschappen van de carotinoïden, daar met de microchemische kristallisatiemethode van MOLISCH (1896) kristalletjes werden verkregen, die met geconcentreerd zwavelzuur blauw kleurden. Bij beide bacteriën zijn deze kristallen alle naaldevormig en rood.

De kleurstof uit *Bacterium trapanicum* bleek zeer gemakkelijk met methylalcohol geëxtraheerd te kunnen worden. Het extract had een oranje kleur. Evenmin als aan KLEBAHN (1919) gelukte het mij de kleurstof uit de *Sarcina* in oplossing te verkrijgen.

HOOFDSTUK VII

ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKHEID VAN VERANDERING VAN HET MILIEU VAN DE BACTERIEN

§ 1. *Inleiding.*

Om iets meer te weten te komen omtrent het potentieele milieu van deze organismen, werden de volgende vragen gesteld:

- 1) Is het mogelijk de bacteriën in een synthetisch milieu te kweken d.w.z. de pepton door een organische stof van bekende samenstelling te vervangen?
- 2) Welke zijn de pH-grenzen waarbinnen groei mogelijk is?
- 3) Is het mogelijk veranderingen in de osmotische druk van het milieu aan te brengen?
- 4) Heeft de NaCl slechts osmotische beteekenis? In hoeverre is deze door andere zouten te vervangen, die een gelijke osmotische druk aan de pekkel verleen?
- 5) Zijn anionen vergiftig?
- 6) Zijn kationen vergiftig?
- 7) Bestaat er een ionen-antagonisme?

Dat de oplossing van deze vragen een zeer omvangrijk onderzoek vereischt, is te begrijpen. De genomen proeven dragen dan ook ten-deele nog een oriënteerend karakter. Over vraag 3) zal niet meer gesproken worden, deze vraag werd reeds in hoofdstuk IV behandeld.

§ 2. *Vroegere onderzoekingen.*

Ik wil mij hier beperken tot de micro-organismen, die in een geconcentreerde pekkel leven.

LE DANTEC (1891) en CLOAKE (1923) geven op, dat stoffen als natriumbisulfiet, natriumhyposulfiet, borax, KNO_3 , Na_2CO_3 , bij het zout gevoegd, waarmee de visch wordt gezouten, het rood worden voorkomen. Het best bleek borax te voldoen. Volgens HANZAWA en TAKEDA (1930) wordt in Amerika „preservaline” gebruikt, d.i. een poeder van borax met NaCl om het „rood” van gezouten kabeljauw te bestrijden. HANZAWA en TAKEDA (1930) namen zelf waar, dat als 2 % natriumbisulfiet of KNO_3 bij de vischbouillon wordt gevoegd, hierin geen ontwikkeling van *Torula Wehmeri* kan plaats hebben. Deze onderzoeken zijn dus geheel op de practijk gericht. De volgende onderzoekers gaan op een meer wetenschappelijke wijze de invloed na van verschillende zouten op de ontwikkeling van micro-organismen uit verschillende pekels. LE DANTEC (1906) nam waar, dat „le microbe du rouge de morue” zich niet ontwikkelt, als het NaCl door andere chloriden als KCl , MgCl_2 of CaCl_2 is vervangen. KLEBAHN (1919) vond, dat *Bacterium halobium* NaNO_3 tot ongeveer 1,6 mol, KCl tot ongeveer 2,6 mol, *Sarcina morrhuae* NaNO_3 tot ongeveer 2,3 mol, KNO_3 tot ongeveer 2,4 mol en KCl tot ongeveer 1,6 mol verdraagt. Hij zorgde er voor, door met NaCl aan te vullen, dat de zoutconcentratie van deze voedingsbodems nooit lager werd dan ongeveer 25 %. Hoewel de proeven volgens KLEBAHN nog onvolledig zijn, kon hij toch de volgende conclusie trekken: de ontwikkeling van deze halophile bacteriën hangt niet alleen van de osmotische druk van de voedingsbodem af, maar ook van de specifieke werking van de zouten; Na kan niet door K worden vervangen. Het blijkt dus, dat deze bacteriën zich anders gedragen dan de lichtende bacteriën, die in oplossingen van een andere samenstelling dan zeewater, maar hiermee isotonisch, zich evengoed als in zeewater kunnen ontwikkelen (BEYERINCK (1889), MOLISCH (1904)).

BARANIK-PIKOWSKY (1927) vond, dat verschillende bacteriën, die hij isoleerde van Limanslijk en -zout (74,65 % $\text{NaCl} + \text{KCl}$, 0,08 % CaCl_2 , 20,26 % MgCl_2 , 4,07 % CaSO_4 , 0,12 % MgCO_3) uit de omgeving van Odessa, zich beter in oplossingen van dit zout ontwikkelen dan in oplossingen van NaCl en dat het Limanzout ook in hogere concentratie verdragen wordt dan zuivere NaCl . Hij veronderstelt, dat Mg , Ca en K een antagonistische invloed teweeg-

brengen. GOLIKOWA (1930) werkte met verschillende stammen van een kleurloze bacterie, geïsoleerd van gezouten visch, deze is staafvormig, beweeglijk en vormt sporen. De bacterie ontwikkelde zich op agar of in vloeibaar milieu met een zoutconcentratie van 1,5 % tot verzadigd (optimum bij 15—18 %). Hij deed nu de volgende proeven: achtereenvolgens werd de 10 % NaCl van de voedingsbodem vervangen door 10 % van verschillende andere zouten. Het resultaat was als volgt: in NaCl en KCl zeer goede ontwikkeling, in Na-citraat en Na-tartraat goede, in NaBr en NaBr + NH_4Cl (samen 10 %) tamelijk goede, in CaCl_2 , NH_4Cl en KBr tamelijk slechte, in MgCl_2 slechte. Hij werkte dus niet met vergelijkbare concentraties, daar hij niet de moleculaire, maar de percentueele concentratie gelijk maakte, daarenboven schonk hij geen aandacht aan het noodzakelijke verschil in pH tusschen enkele van de zoutoplossingen. Toch is het resultaat zeer opmerkelijk. De kleurloze bacterie blijkt in tegenstelling met *Bacterium halobium* en *Sarcina morrhuae* zeer ongevoelig te zijn voor vervanging van de NaCl door andere zouten. Zoowel het Na als het Cl kunnen geheel door andere elementen vervangen worden. SASLAWSKY en HARZSTEIN (1930) werkten met bacteriën uit Limanslijs, die thiosulfaat oxydeeren, en die zich ontwikkelen in oplossingen met 1—22 % NaCl met een optimum bij 6 % = ± 1 mol. Zij vervingen ook de NaCl door verschillende andere zouten. Het bleek echter, dat deze bacterie weer veel gevoeliger voor een dergelijke verandering is dan die van GOLIKOWA (1930). Geen groei en oxydatie had plaats in NaNO_3 , Na_2SO_4 , KCl, NH_4Cl , $\text{KCl} + \text{NH}_4\text{Cl}$ in een concentratie van $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1, $1\frac{1}{2}$, $1\frac{3}{4}$ of 2 mol; in LiCl en NaBr ontwikkelde de bacterie zich zeer zwak, respectievelijk bij een concentratie lager dan $\pm \frac{1}{4}$ mol en ± 1 mol; in MgCl_2 of CaCl_2 goed in een concentratie lager dan $\frac{1}{2}$ mol. Toch namen zij waar, dat de zouten, waarbij geen ontwikkeling plaats heeft, niet altijd schadelijk zijn, want zóó gecombineerd, dat zoowel Na als Cl aanwezig zijn, zijn zij wel in staat het NaCl te vervangen (b.v. NaBr + KCl, zelfs in een concentratie ieder van $1\frac{1}{2}$ mol, of $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$). De conclusie, die zij trekken, is, dat beide elementen Na zoowel als Cl noodig zijn, zoodat de werking van NaCl niet alleen is terug te voeren op een verhooging van de osmoti-

sche druk, maar ook op een specifieke inwerking van dit zout. Op deze werking gaan zij niet nader in. Het lijkt mij b.v. mogelijk, dat Na en Cl in de cultuurvloeistof, waarin zij worden toegevoegd in de vorm van NaBr en KCl slechts werken als antagonisten. K^+ , Br^- , NH_4^+ en NO_3^- zouden dan toch vergiftig zijn, welke vergiftigheid echter door andere ionen als Na^+ en Cl^- kan worden opgeheven. Ook wanneer NaCl op zichzelf noodzakelijk is, behoeven Na en Cl nog niet bij de opbouw van de cel noodzakelijk te zijn. Het is mogelijk, dat het protoplasma slechts in NaCl de juiste fysisch-chemische hoedanigheid (b.v. watergehalte) bezit.

BAAS-BECKING (1930) gaat op een eenigszins andere wijze na, welke zouten en ionen vergiftig werken. Hij onderzocht in welke zouten *Dunaliella viridis* TEOD., een groene flagellaat, die in pekels van verschillende samenstelling wordt aangetroffen, ongeschaad 6 uur kan verblijven. Het resultaat is, dat binnen de pH-grenzen 4 en 11 dit het geval is met zeer veel Na- of K- zouten, zoowel met één als met 2-waardige anionen in een concentratie van 2,5 mol. Zelfs zouten met anionen als CrO_4^- of CNS^- bleken het organisme in een zeer groote concentratie binnen 6 uur niet te schaden. Met kationen bleek het echter anders gesteld: terwijl monovalente kationen, als Na, K en Li eveneens niet schadelijk zijn, binnen dit tijdsverloop in een concentratie van 2,5 mol, is ± 1 mol de concentratiegrens voor $MgCl_2$, waarin *Dunaliella* na 1 uur nog levend is, terwijl voor chloriden van 2-waardige kationen als Ca, Ba, Sr e.a. dit $\pm 0,01$ mol en voor een 3-waardig ion als Al $\pm 0,005$ mol is. BAAS-BECKING (1930) concludeert hieruit, dat de wand en het protoplasma aan de oppervlakte van *Dunaliella* zich als negatief geladen kolloïden gedragen. Verder bleek, dat stoffen, die phenolgroepen bevatten, een overeenkomstige werking uitoefenen op *Dunaliella* als op een agarsol: hoe meer phenolgroepen aanwezig zijn, hoe schadelijker de werking op *Dunaliella* en hoe eerder dehydratatie van het agarsol. Ook de werking van aethylalcohol is voor beide overeenkomstig. De conclusie, die hij hieruit trekt, is, dat de cellen van *Dunaliella* zich ook als hydrophiele kolloïden gedragen. Hij verwachtte dit trouwens reeds, toen de lyotrope reeks zich deed gelden bij de vergiftigheid van kationen (Mg is veel minder vergiftig dan de andere bivalente kationen).

In „Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina* L.” beschrijven BOONE en BAAS-BECKING (1931) een onderzoek met *Artemia salina* L. een kreeftje, dat in verschillende pekels wordt aangetroffen. Dit onderzoek bevestigt het eigenaardige feit, hetwelk MARTIN en WILBUR (1921) reeds opmerkten, dat K zeer schadelijk is voor *Artemia*. De nauplii ontwikkelden zich niet in oplossingen, die meer dan 0,1 mol KCl bevatten. *Artemia* bleek zich ook in andere opzichten anders dan *Dunaliella* te gedragen, daar anionen en kationen even schadelijk kunnen zijn, een anion als NO_3 was zelfs vergiftiger, dan een kation als Ca. Verder werd nagegaan of er een antagonistische werking tusschen Na, K, Mg en Ca bestaat. Te dien einde werden voedingsoplossingen gemaakt, waaraan deze elementen als chloriden in zeer veel combinaties werden toegevoegd, zoodat steeds in het geheel 1 mol chloride aanwezig was. Er werd nagegaan in welke combinaties de ontwikkeling tot nauplii plaats had. Het resultaat van het onderzoek was: Na oefent een antagonistische werking op K uit en dit antagonisme blijft bestaan, als 0,5 mol MgCl_2 of 0,3 mol CaCl_2 aanwezig zijn.

Eveneens in 1931 ging BAAS-BECKING (a) na of bij *Dunaliella* ook een antagonisme voorkomt. Het bleek, dat voor dit organisme Ca en Mg antagonistisch zijn. Verder kwam een eigenaardig verschijnsel aan den dag n.l. dat dit antagonisme afhankelijk is van de concentratie van de pekels: in een concentratie van 1 mol NaCl heffen Mg en Ca elkanders vergiftigheid op in een verhouding $\text{Mg} : \text{Ca} = 4 \text{ à } 5$, terwijl in 4 mol NaCl deze verhouding = 20. Deze bepalingen werden gedaan bij een $\text{pH} = 9$. Andere organismen uit de pekels van zouttuinen gedragen zich overeenkomstig. Een blauw wier ontwikkelde zich bij een NaCl concentratie van 4 mol niet, als er bivalente kationen aanwezig waren, terwijl bij een concentratie van NaCl van 1,56 mol de verhouding $\text{Mg} : \text{Ca} = 0,13 : 0,012 = 10,8$ moest zijn.

Vergelijkt men het resultaat van al deze onderzoeken, dan is wel het meest opvallende, het volkomen verschillende gedrag van de onderzochte pekelorganismen. De eenige overeenkomst is, dat NaCl tot zeer hoge concentraties wordt verdragen. De andere zouten zijn alle in verschillende mate schadelijk of niet schadelijk en ook

TABEL IV

Organische stoffen, aanwezig in de voedingsbodems	Bacte- rium halo- bium	Sarcina mor- rhuae	Bacte- rium trapa- nicum	Sarcina gigantea
1 % pepton Poulenc	+	+	+	+
1 % pepton Riedel	+	+	+	n.o.
1 % peptone granulée Cogit.	+	n.o.	+	n.o.
1 % pepton Witte	+	+	+	n.o.
vischbouillon	+	n.o.	n.o.	n.o.
gistextract	+	n.o.	n.o.	n.o.
1 % asparagine	—	+	+	+
1 % glyocol	—	+	geringe ontwik- keling	n.o.
1 % ureum	—	n.o.	n.o.	n.o.
1 % asparagine + 1 % glucose	—	n.o.	n.o.	n.o.
1 % asparagine + 1 % glyocol	—	n.o.	+	n.o.
1 % glucose + 1 % ureum	—	n.o.	+	n.o.
3 % asparagine	—	n.o.	+	n.o.
0,1 % asparagine	—	n.o.	+	n.o.
1 % glucose + 1 % KNO_3	—	n.o.	n.o.	+
1 % glucose + 1 % NH_4Cl	—	+	n.o.	+
1 % glucose + 1 % NH_4NO_3	—	n.o.	n.o.	n.o.

Het teeken + beteekent ontwikkeling, het teeken — geen ontwikkeling van de bacteriën, n.o. = niet onderzocht.

het antagonisme, als het voorkomt, kan bij de verschillende organis-
men van geheel verschillende aard zijn. Het blijft natuurlijk de vraag
of men nauplii van *Artemia* mag vergelijken met wieren en bacteriën.

§ 3. Eigen proeven.

A. *Bacterium halobium*.

Uit de tabel IV blijkt, dat in tegenstelling met de andere onder-
zochte bacteriën in geen van de synthetische milieu's d.w.z. in de
voedingsbodems met een organische stof, waarvan de samenstelling
geheel bekend is, ontwikkeling plaats had. Er werd voor gezorgd, dat

de gebruikte vloeibare voedingsbodems 30 % NaCl bevatten en dat de reactie neutraal was. De proeven werden gedaan met de volgende organische stoffen: eiwit, pepton, asparagine, glyocol, ureum en glucose. Eiwit of pepton blijkt dus voor zoover onderzocht, noodzakelijk; toch viel op, dat de verschillende soorten pepton in het geheel niet een even gunstig resultaat opleverden. Pepton „Poulenc” was verreweg het meest geschikt, zich uitende in de kortste incubatietijd. Terwijl voor de ontwikkeling tot een bacterie-huidje aan de oppervlakte van de voedingsoplossing, indien pepton „Poulenc” gebruikt was, ongeveer acht dagen nodig was, was dit voor pepton „Riedel” ongeveer 12 dagen en voor pepton „Cogit” ongeveer 25 dagen. Voor pepton „Witte”, wat eigenlijk geen pepton is, maar een stof, die tusschen pepton en eiwit in staat, bedroeg dit eveneens ongeveer 12 dagen.

Ook HARRISON en KENNEDY (1922) konden geen ontwikkeling verkrijgen in media met als organische stof eenvoudiger N-verbindingen dan pepton (b.v. NH_4 -tartraat of asparagine).

Vervolgens werd nagegaan, in hoeverre het mogelijk was, bij deze bacterie verandering in het anorganisch milieu aan te brengen. Tot nu toe werd de bacterie slechts gekweekt met 30 % ruw NaCl in de voedingsbodem. Het bleek, dat de bacterie evengoed tot ontwikkeling kwam in een oplossing van de volgende samenstelling: NaCl 4,3—5,25 mol, MgSO_4 0,02 %, K_2HPO_4 0,02 %, pepton „Poulenc” 1 %. De pH van deze oplossing, die bij de volgende proeven als contrôle-oplossing dienst deed, is 5,6, die van de oplossing met ruw NaCl 5,9, als pepton „Poulenc” werd gebruikt. Als met KOH de pH van deze oplossingen tot 7,5 verhoogd werd, dan ontwikkelde *Bacterium halobium* zich ook zeer goed. Nu werd nagegaan in hoeverre het mogelijk was de zouten uit de contrôle-oplossing geheel of gedeeltelijk door andere te vervangen, zoodat de oplossing geen lagere osmotische druk verkreeg dan overeenkwam met 4,3 mol NaCl, terwijl er voor gezorgd werd, dat de pH binnen de grenzen 5,5—7,5 bleef. De gebruikte zouten waren voor analytische doeleinden geleverd door de Utrechtsche Pharmaceutische Groothandel. Het water was gedestilleerd. Voor de culturen werden cultuurbuizen van gewoon glas gebruikt. Bij het enten werd er voor

TABEL V

	Bacterium halobium	Sarcina morrhuae	Bacterium trapanicum
3,1 mol KCl	+	+	+
2 mol MgSO ₄	—	n.o.	n.o.
1,5 mol MgSO ₄	+	n.o.	+
1,25 mol LiCl*	—	—	n.o.
0,5 mol LiCl*	+	+	—
0,5 mol (NH ₄) ₂ SO ₄	geringe ontwikkeling	n.o.	n.o.
1,5 mol KNO ₃ *	—	+	n.o.
1 mol KNO ₃ *	—	n.o.	n.o.
0,5 mol KNO ₃	+	n.o.	n.o.
0,01 mol KNO ₃	+	+	+
1,25 mol KBr	—	—	n.o.
0,5 mol KBr	—	+	n.o.
0,1 mol KBr*	—	n.o.	n.o.
0,02 mol KBr*	+	n.o.	n.o.
0,5 mol KJ	—	—	n.o.
0,1 mol KJ	—	+	n.o.
0,02 mol KJ*	—	n.o.	n.o.
0,1 mol BaCl ₂ *	—	—	n.o.
0,05 mol BaCl ₂ *	geringe ontwikkeling	+	n.o.
0,1 mol Na ₂ B ₄ O ₇	—	—	n.o.
0,01 mol Na ₂ B ₄ O ₇ *	—	+	n.o.
0,005 mol Na ₂ B ₄ O ₇	+	+	+
0,3 mol CaCl ₂	—	+	n.o.
0,15 mol CaCl ₂	—	n.o.	—
0,1 mol CaCl ₂	+	n.o.	+

Het teeken + beteekent ontwikkeling, het teeken — geen ontwikkeling van de bacteriën, n.o. = niet onderzocht.

gezorgd, dat geen voedingsbodem mee werd overgeënt, door steeds van een cultuur op vaste bodem te enten. De proeven werden minstens met drie stammen uitgevoerd. Het bleek, dat uit de contrôle-oplossing de MgSO₄ niet door Na₂SO₄ of CaSO₄ kon worden vervangen. Het magnesium, dat mogelijk door het glas wordt afgegeven

of als verontreiniging in de andere gebruikte chemicaliën aanwezig was, is dus niet voldoende voor de ontwikkeling van deze bacterie. Het bleek, dat Mg niet alleen in kleine hoeveelheden noodzakelijk is, maar dat het ook in groote hoeveelheden verdragen werd, de hoogste concentratie van MgSO_4 , waarbij ontwikkeling mogelijk was, bedroeg n.l. 1,5 mol (zie tabel V). KCl is het eenige zout behalve natuurlijk NaCl, dat in grootere concentratie de groei niet belemmert. KCl werd n.l. verdragen in de hoogst mogelijke concentratie d.i. 3,1 mol. Hier volgen van enkele andere zouten de hoogste concentraties, waarin deze in de voedingsoplossing aanwezig mogen zijn, zal ontwikkeling plaats hebben: Li Cl 0,5 mol, KNO_3 0,5 mol, CaCl_2 0,1 mol, BaCl_2 0,05 mol, KBr 0,02 mol, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,005 mol, terwijl KJ in een concentratie van 0,02 mol niet wordt verdragen (zie tabel V). Nu is het echter mogelijk, dat er fouten zijn opgetreden bij het gebruik van niet op zuiverheid gecontrôleerde zouten. Het zou b.v. mogelijk zijn, dat de schadelijke werking van een zout, dat in een bepaalde concentratie aanwezig is, teweeggebracht wordt door een zeer vergiftig werkende verontreiniging, die bij deze concentratie in zoodanige hoeveelheid voorkomt, dat de ontwikkeling van de bacteriën hierdoor wordt belemmerd. Om een dergelijke fout te voor-

TABEL VI

	Bacterium halobium	Bacterium trapanicum	Sarcina morrhuae
0,15 mol CaCl_2	—	—	+
0,1 mol CaCl_2	+	+	+
0,5 mol CaCl_2 0,5 mol MgCl_2	—	n.o.	n.o.
0,2 mol CaCl_2 0,2 mol MgCl_2	geringe ontwikkeling	n.o.	+
0,2 mol CaCl_2 0,15 mol MgCl_2	geringe ontwikkeling	n.o.	+
0,2 mol CaCl_2 0,1 mol MgCl_2	+	+	+
0,5 mol CaCl_2 3,1 mol KCl	—	n.o.	n.o.

Het teeken + beteekent ontwikkeling, het teeken — geen ontwikkeling van de bacteriën, n.o. = niet onderzocht.

komen, werden de volgende zouten tweemaal omgekristalliseerd: LiCl, KNO₃, KBr, KJ, BaCl₂ en Na₂B₄O₇ en de proeven, in de tabel V met een sterretje voorzien, herhaald. (N.B. alleen met *Bacterium halobium*). Het resultaat was echter hetzelfde.

CaCl₂ wordt dus verdragen in een concentratie van 0,1 mol. Het bleek echter, dat als Mg in een bepaalde concentratie aanwezig was, de oplossing meer Ca kon bevatten, zonder dat de ontwikkeling werd geremd. Tabel VI geeft een beeld van deze antagonistische werking. Men ziet, dat Mg de meest ontgiftende werking uitoefent

bij een verhouding $\frac{[Mg]}{[Ca]} = \frac{1}{2}$ (bij een totale concentratie van 4,7 mol).

Het is nu interessant om na te gaan of de ervaringen met de bacteriën in cultuur gedaan, het onder bepaalde omstandigheden massale optreden van de bacteriën in de natuur kunnen verklaren. Hierbij wordt aangenomen, dat de roode bacteriën, die in zouttuinen worden aangetroffen, tot *Bacterium halobium* behoren. Men moet dus nagaan onder welke omstandigheden deze bacteriën optreden.

In 1931 gaat BAAS-BECKING (a) aan de hand van gegevens van USIGLIO (1849) na, wat er gebeurt bij het indampen van zeewater. Het blijkt, dat de concentratie van de magnesium in de pekkel voortdurend toeneemt, terwijl bij een concentratie van NaCl van ongeveer 1 mol een deel van het calcium in de vorm van CaCO₃ neerslaat, bij een concentratie van NaCl van ongeveer 2,6 mol een tweede gedeelte in de vorm van CaSO₄. Het gevolg is, dat bij een concentratie van NaCl = 3,8 mol, de concentratie van MgCl₂ = 0,426 mol, van CaCl₂ = 0,018 mol, zodat de verhouding $\frac{[Mg]}{[Ca]} = 23,7$, terwijl bij

een concentratie van NaCl = 0,5 mol, deze verhouding = 5. Een tweede gevolg van het neerslaan van het CaCO₃ is, dat de pH, die in de eerste phase van indamping onder invloed van de koolzuur-assimilatie van groene wieren tot 9,2 kan stijgen, daalt tot ± 7 (BAAS-BECKING (1932)). BAAS-BECKING (1931(a)) neemt waar, dat tijdens de eerste stadia van het indampingsproces *Dunaliella* in de zoutoplossing voorkomt. Wanneer echter een bepaalde concentratie is

bereikt, sterft dit organisme en roode bacteriën treden op. De omstandigheden in de pekkel zijn dan de volgende: hoog zoutgehalte, neutrale reactie, hooge concentratie van magnesium, nagenoeg geen calcium (zie ook PEIRCE (1914), die vermeldt, dat de pekkel, als de roode bacteriën er in voorkomen, rijk is aan Na, Mg, K, Cl en SO_4 , arm aan Ca, Fe en NO_3). BAAS-BECKING (1931a) gaat aan massaculturen na, onder welke omstandigheden de roode bacteriën uit de zouttuinen zich ontwikkelen. Hij komt tot de conclusie, dat zij een hoog zoutgehalte, hooge concentratie van magnesium, hooge pH en geen calcium verlangen. Deze conclusie trekt hij echter met reserve, daar de bacteriën ook van organische stoffen in het milieu afhankelijk zijn.

We kunnen dus nu aan de hand van de genomen proeven nagaan of de genoemde (anorganische) omstandigheden werkelijk bepalend voor de ontwikkeling van de bacteriën zijn. In hoofdstuk IV is met zeer groote waarschijnlijkheid de noodzaak van een hoog zoutgehalte aangetoond. Wat de hooge concentratie van Mg betreft: deze blijkt niet noodzakelijk. Wel kwam ook in cultuur tot uiting, dat Mg in groote concentratie verdragen wordt. Ook de zeer geringe concentratie van Ca in de pekkel op het oogenblik, dat de roode bacteriën in de zoutpannen optreden, blijkt niet bepalend voor dit optreden. Een tamelijk hooge concentratie van Ca-zouten bleek verdragen te worden (0,2 mol CaCl_2 , als Mg aanwezig is). Wat de pH betreft, het blijkt, dat de *Bacterium* zich bij een neutrale en zelfs bij een eenigszins zure reactie zeer goed ontwikkelt. Er werd nagegaan of dit ook het geval was bij een pH van 9,1 (verkregen met een mengsel van Na-carbonaat en -bicarbonaat). Het bleek niet het geval te zijn. Dit is dus in tegenstelling met de waarneming van BAAS-BECKING (1931(a)), maar in overeenstemming met het optreden van de bacteriën in de natuur. Ook HARRISON en KENNEDY (1922) verkregen slechts ontwikkeling bij een pH tusschen 5,6 en 8,6, met een optimum bij 6. Het blijkt dus, dat het optreden van de roode bacteriën in de zouttuinen op een bepaald tijdstip van het indampingsproces waarschijnlijk slechts het gevolg is van de bereikte zoutconcentratie, samengaande met het grooter gehalte aan beschikbare organische stof door de dood van *Dunaliella* en *Artemia*, in ieder geval wordt

het optreden niet bepaald door het gehalte aan Mg en Ca in de pekels. Dit geldt dus slechts, als werkelijk de bacterie uit de zouttuinen tot *Bacterium halobium* behoort. Het kan natuurlijk ook zijn, dat al moet deze tot *Bacterium halobium* gerekend worden, de verschillende stammen zich eenigszins anders gedragen. Hieraan zou het verschillende resultaat van BAAS-BECKING en mij, wat betreft de pH geweten kunnen worden.

Bij vergelijking van de eischen, die *Dunaliella* en die *Bacterium halobium* aan het milieu stellen, valt het verschillend gedrag ten opzichte van Mg en Ca op. *Dunaliella* verdraagt veel minder van deze elementen dan *Bacterium halobium* (BAAS-BECKING (1930, 1931(a)). Voor Ca is dit opvallend, daar *Dunaliella* juist in de pekels van de zouttuinen voorkomt (in tegenstelling met de *Bacterium*), als hieruit de Ca nog niet is neergeslagen. Er moet echter vermeld worden, dat de vergiftigheid van Ca voor *Dunaliella* door BAAS-BECKING in 1930 bepaald werd bij een tamelijk lage pH. In 1931 neemt BAAS-BECKING (a) waar, dat *Dunaliella* Ca en Mg bij een pH van 9 veel beter verdraagt dan bij een pH van 6. Ook in de pekels in de zoutpannen is zooals vermeld de pH, voordat het Ca neerslaat, tengevolge van de aanwezige carbonaten, zeer hoog (± 9). Ook het Ca-Mg antagonisme is bij beide organismen verschillend: bij een concentratie van

NaCl = 4 mol: $\frac{[Mg]}{[Ca]} = 20$ voor *Dunaliella* en $\frac{1}{2}$ voor *Bacterium halobium*.

Een tweede groot verschil tusschen *Dunaliella* en *Bacterium halobium* blijkt uit hun beider gevoeligheid ten opzichte van anionen en kationen. Terwijl voor *Dunaliella* kationen zeer veel vergiftiger zijn dan anionen, bestaat voor de *Bacterium* dit verschil in gevoeligheid niet, zoowel anionen als kationen kunnen schadelijk zijn. Zouten met tweewaardige kationen als Ca en Ba blijken voor *Bacterium halobium* zelfs minder schadelijk te zijn dan zouten met eenwaardige anionen als Br en J, terwijl een éénwaardig kation als Li zich geheel anders gedraagt dan de éénwaardige kationen Na en K. Dat van de anionen NO₃ voor *Bacterium halobium* schadelijker is dan Cl of SO₄, kan het gevolg zijn van het vermogen van de bacteriën nitraten tot de in het algemeen meer vergiftige nitrieten te reduceeren. Wel treedt

evenals bij *Dunaliella* de uitzonderlijke positie van magnesium tusschen de bivalente kationen in het oog. Dat anionen en kationen een even sterk vergiftige werking op *Bacterium halobium* kunnen uitoefenen, heeft dit organisme met de andere in het literatuuroverzicht besproken pekelorganismen gemeen. Bij deze organismen bevindt zich het protoplasma waarschijnlijk dicht bij het iso-electrische punt dan dit bij *Dunaliella* het geval is. Toch gedragen ook deze organismen zich niet op dezelfde wijze als *Bacterium halobium*. Al deze organismen verdragen b.v. bromiden in grootere concentratie dan *Bacterium halobium*. Een overeenkomst tusschen de larven van *Artemia* en de *Bacterium* komt tot uiting in de ongelijke gevoeligheid van beide voor éénwaardige kationen. Het eigenaardige feit, dat Li veel schadelijker is dan K en Na voor *Bacterium halobium* is te vergelijken met het nog opvallender feit, dat voor de nauplii van *Artemia* zoowel Li als K zeer veel schadelijker zijn dan Na. Vergelijkt men *Bacterium halobium* met de bacteriën, die GOLIKOWA (1930) onderzocht, dan blijkt, dat de volgorde van de zouten, waarop deze in toenemende mate de ontwikkeling belemmeren, nagenoeg gelijk is, slechts $MgCl_2$ staat op een andere plaats in de reeks. Een groot verschil tusschen deze twee bacteriën is echter het feit, dat de bacterie van GOLIKOWA zich geheel zonder NaCl kan ontwikkelen. Voor *Bacterium halobium* bleek dit niet mogelijk, tenminste er trad geen ontwikkeling op, als in plaats van NaCl, KCl in de voedingsoplossing aanwezig was. Daar een dergelijke voedingsoplossing slechts een concentratie van 3,1 mol kan hebben, werden verschillende stammen, voordat zij in deze oplossing geënt werden, op een bodem met 3,1 mol NaCl gekweekt. Wanneer zij zich hierop eenige tijd goed ontwikkeld hadden (en de stammen uit groep II weer gasvacuolen vormden), werden zij van deze bodems in de voedingsoplossing van KCl geënt. Er trad echter in het geheel geen ontwikkeling op. Daar 3,1 mol KCl, als NaCl aanwezig is, zeer goed verdragen wordt, wijst dit op een antagonistische werking tusschen Na en K. Het is dus hetzelfde verschijnsel als SASLAWSKY en HARZSTEIN (1930) bij dethiosulfaat-bacteriën uit Liman-zout waarnamen. Zooals vroeger reeds vermeld is, was evenmin groei van de *Bacterium* te constateeren in een oplossing, die in plaats van NaCl 4,5 mol saccharose bevatte.

Er werd op verschillende plaatsen over vergiftigheid van ionen en ionen-antagonisme gesproken. Daar echter bij een hoge concentratie de zouten waarschijnlijk slechts voor een gedeelte in ionen zijn gesplitst, kan het zijn, dat men de invloed van verschillende elementen ten deele terug moet voeren tot een invloed van de moleculen, waarin deze voorkomen.

B. *Sarcina morrhuae* en *Bacterium trapanicum*.

Zooals uit tabel IV blijkt, heeft ontwikkeling van beide bacteriën plaats in verschillende voedingsbodems met eenvoudige stikstofverbindingen. De onderzoeken naar het potentieele milieu, wat anorganische stoffen betreft, dragen nog slechts een voorloopig karakter. De zouten uit de oplossingen waren voor analytische doeleinden geleverd door de Utrechtsche Pharm. Groothandel, het water was gedestilleerd. Daar *Sarcina morrhuae* zich zeer slecht in vloeibaar milieu ontwikkelt, werd voor deze bacterie aan de verschillende oplossingen agar toegevoegd, terwijl slechts dan van een negatief resultaat werd gesproken, wanneer de bodem, waarop geen ontwikkeling plaats had, een vaste consistentie had. Om dit laatste te bereiken, was het noodig, dat de reactie ongeveer neutraal was. Hierin werd voorzien door toevoegen van KOH. Orienteerend zijn de proeven ook in dit opzicht, dat zoowel glaswerk, als agar, als de chemicaliën in de oplossing niet extra werden gereinigd. De controle-oplossing voor deze bacteriën was dezelfde als die voor *Bacterium halobium*. Hier volgen voor *Sarcina morrhuae* de hoogste concentraties van enkele zouten, die verdragen kunnen worden, als NaCl aanwezig is: KCl 3,1 mol, KBr 0,5 mol, LiCl 0,5 mol, KJ 0,1 mol, BaCl₂ 0,05 mol, Na₂B₄O₇ 0,01 mol, terwijl KNO₃ in een concentratie van 1,5 mol of meer, CaCl₂ in een van 0,3 mol of meer en MgCl₂ in een van 0,2 mol of meer worden verdragen (zie tabel V en VI). Het bleek, dat Na niet door K, Cl niet door NO₃ kon worden vervangen, er had n.l. geen ontwikkeling plaats, als in plaats van de NaCl 3,1 mol KCl of 2,2 mol KNO₃ was toegevoegd, terwijl de *Sarcina* toch zeer goed verlaging van de concentratie verdraagt. In het algemeen gedraagt *Sarcina morrhuae* zich dus, wat de schadelijke werking van zouten betreft, evenals *Bacterium halobium*, behalve dat de

meeste zouten in mindere mate vergiftig zijn. Deze laatste conclusie is echter misschien niet geoorloofd, daar de *Sarcina* op vaste bodem, de *Bacterium* in vloeibaar milieu werd gekweekt. Verder blijkt, dat het gedrag ten opzichte van KCl niet klopt met de proeven van KLEBAHN (1919), die vond, dat de bacterie zich niet ontwikkelde, als meer dan 20 % ($= \pm 2,6$ mol) aanwezig was. KLEBAHN vermeldt echter, dat zijn proeven slechts voorloopige waarde bezitten („Ins besondere können die Zahlen auf Genauigkeit keinen Anspruch machen“). Wat *Bacterium trapanicum* betreft, voor de zeer weinige proeven met deze bacterie genomen, verwijs ik naar de tabellen IV, V en VI. Opvallend is, dat Li voor deze bacterie in nog grotere mate schadelijk is, dan voor de beide andere.

De in dit hoofdstuk besproken pH bepalingen werden langs electrische weg met behulp van een waterstofelectrode verricht. Voor het gebruik van het toestel in het Laboratorium voor Vergelijkende Physiologie van de Rijksuniversiteit te Utrecht dank ik Prof. Dr. H. J. JORDAN ten zeerste.

HOOFDSTUK VIII

DE KLEURLOOZE SARCINA VAN GEZOUTEN HARING

Een reincultuur werd verkregen volgens de uitstrijkmethode. De cellen zijn $3-6\mu$ in diameter groot, zij komen afzonderlijk, in paren en in pakjes voor. Foto d geeft een beeld van deze groote *Sarcina* in verzadigde pekkel. Het protoplasma is homogeen. In water verandert het uiterlijk van de cellen niet, behalve dat het protoplasma korrelig wordt. De bacterie is grampositief en katalase-positief. De kolonies op agar (30 % NaCl) zijn rond en ondoorzichtig. De bacterie is aëroob. Op sommige voedingsbodems kan zij een bruinachtig-gele kleur vertoonen. De optimum temperatuur is 20°C . Met suikers of in aangezuurde mout (beide 30 % NaCl) heeft geen gisting plaats. De *Sarcina* is weinig gevoelig voor wisseling van de concentratie van het zout in de voedingsbodem; zij kan van een bodem met 30 % NaCl onmiddellijk op een met 5 % NaCl geënt worden, terwijl de groei nog eenigszins verbeterd wordt. Op een met 3 % NaCl (entmateriaal van een bodem met 5 %) heeft ook nog ontwikkeling plaats, echter in mindere mate. Nitraten worden niet gereduceerd tot nitrieten. In vele eigenschappen komt deze *Sarcina* dus overeen met *Sarcina morrhuae*. Een verschil maakt de afmeting, de kleur, het

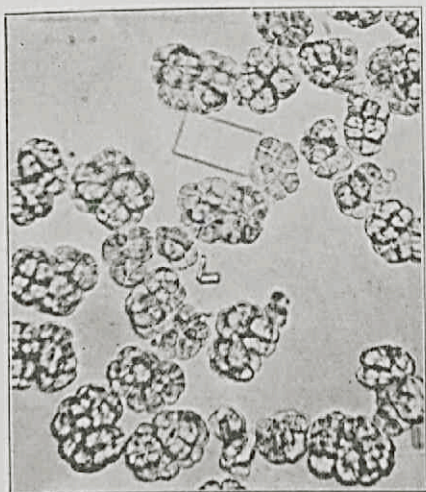


Foto d. *Sarcina gigantea*, levend, in pekkel. Lineaire vergrooting $500\times$.

gedrag ten opzichte van nitraat en de gramkleuring. Daar het verschil in grootte echter zeer aanzienlijk is, kan ik vooreerst niet anders doen dan aan te nemen met een nieuwe soort te doen te hebben, die in de voorloopige mededeeling (1931) van dit onderzoek reeds *Sarcina gigantea* werd genoemd. Uit tabel IV op bladz. 95 blijkt, dat in voedingseischen eveneens overeenstemming bestaat tusschen *Sarcina gigantea* en *Sarcina morrhuae*.

Een opmerkelijk verschijnsel deed zich bij *Sarcina gigantea* voor. Wanneer men bij een preparaat van de bacteriën in verzadigde NaCl-oplossing, een oplossing van twee of meer mol saccharose of glucose laat toestroomen, dan contraheert de cel-inhoud. Vooral aan mono- en diplococcen is dit verschijnsel zeer goed waar te nemen. Laat men daarna weer een verzadigde oplossing van NaCl toestroomen, terwijl men de suikeroplossing met filtreerpapier wegzuigt, dan neemt de cel-inhoud weer in volume toe en de bacteriën krijgen weer het normale uiterlijk. Het verschijnsel doet sterk aan plasmolyse denken. Het verschil is echter, dat de inhoud, die bij de contractie de bolvorm blijft behouden, niet van de wand loslaat, doordat deze wand opzwelt. Het verschijnsel komt dus overeen met de afwijkende vorm van plasmolyse, die WALTER (1923) waarnam bij de roode wieren *Bangia* en *Lemanea*. Wel had in een osmotisch werkzame oplossing contractie van de inhoud van de cellen van deze wieren plaats, maar doordat de wand opzwol, bleef het contact van inhoud en wand bewaard. De celwand van deze wieren bestaat dus uit een stof, die zeer zwelbaar is. Deze wand vertoont de reacties van pectine, evenals agar. Het is zeer goed mogelijk, dat de wand van dezelfde samenstelling is als agar, daar deze uit de celwanden van andere roode wieren wordt verkregen. Gecomplieerder wordt het verschijnsel bij de roode wieren, doordat de plasmolyse ook in het volgende opzicht afwijkend is. Het volume van de cel-inhoud is niet omgekeerd evenredig met de concentratie van de oplossing, waarin de cel zich bevindt, zooals met de cel-inhoud van planten met normale plasmolyse het geval is. Eerst als de wieren in een ongeveer verzadigde oplossing van suiker of keukenzout worden gebracht, heeft een eenigszins aanmerkelijke volume-vermindering van de inhoud plaats. Dit moet volgens WALTER het gevolg zijn van het feit, dat er geen of slechts zeer

kleine vacuolen voorkomen. De geconcentreerde oplossingen zullen imbibitiewater onttrekken aan het protoplasma, waarvan WALTER aanneemt, dat het ondoorlaatbaar is voor suiker en zout. (Dat hij het protoplasma vergelijkt met stoffen als nucleïne, zetmeel, gelatine en caseïne, waarvan KATZ (1918) de z.g. zwellingskromme bepaalde (volume als functie van de relatieve dampspanning) kan hier buiten beschouwing blijven.) De volume-vermindering van het protoplasma moet echter veel geringer zijn dan het geval zou zijn, als zuivere osmose plaats had, dus als een vacuole aanwezig was. Over dit alles werd reeds in hoofdstuk IV gesproken. Het mechanisme van de cel beschrijft WALTER (1923) nu als volgt: In de cel werken op elkaar in: 1° de zwellingsdruk van het protoplasma, 2° de zwellingsdruk van de wand en 3° de elastische spanning van de cuticula. In de normale cel wordt door de druk van het protoplasma en de cuticula de wand samengeperst. Contraheert nu het protoplasma, dan krijgt de wand gelegenheid op te zwellen, hij zal dit doen in de mate de stof, die het protoplasma doet contraheeren, dit toelaat.

Met carposporen van *Lemanea* verkreeg WALTER (1923) teruggang van „plasmolyse” met NaCl oplossingen. Hier is dus blijkbaar het protoplasma sterk doorlaatbaar voor NaCl.

Men kan nu de contractie van de cel-inhoud van de *Sarcina* op dezelfde wijze verklaren als WALTER (1923) dit verschijnsel bij de roode wieren verklaarde. Men kan het ook toeschrijven aan normale plasmolyse voor het geval er een vacuole in de cel van de *Sarcina* voorkomt. In dit laatste geval moet het protoplasma voor NaCl geheel, voor suikers niet permeabel zijn. Ik wil op de verklaring van de contractie van de cel-inhoud volgens WALTER iets dieper ingaan. Deze verklaring geldt dus voor het geval, dat er geen vacuole aanwezig is. Er bestaan nu twee mogelijkheden: A. Het protoplasma is voor NaCl geheel, voor suikers niet permeabel. B. Het protoplasma is voor beide permeabel. Brengt men een cel in een suikeroplossing, dan zal, als we met het geval A te doen hebben, het protoplasma als lyophiel kolloïd, tengevolge van de osmotische wateronttrekking van de geconcentreerde suikeroplossing water afgeven. Het NaCl, waarvoor in dit geval aangenomen werd, dat het protoplasma permeabel is, zal aan de osmotische werking geen aandeel hebben. Wel

zal het naar buiten diffundeeren en daardoor minder dehydrateerend op het protoplasma inwerken; dit zal echter niet opwegen tegen de wateronttrekkende werking van de geconcentreerde suikeroplossing. Ook is het mogelijk, dat deze diffusie door een eventueel voorkomend DONNAN-evenwicht wordt tegengegaan. Maar ook als het geval B zich voordoet, is het misschien mogelijk, dat het protoplasma water afgeeft bij overbrenging in een suikeroplossing, n.l. als de kolloïdale deeltjes van het protoplasma in een suikeroplossing minder water kunnen binden dan in NaCl. Geval A lijkt mij in ieder geval veel aannemerlijker dan B.

Ook al komt een vacuole voor, toch blijft de plasmolyse afwijkend door de zwelling van de wand. Deze zwelling kan men zeer goed volgens WALTER (1923) verklaren. Men moet dan aannemen, dat de buitenste laag van de wand uit een stof bestaat, die in eigenschappen met die van een cuticula overeenkomt. Het is mogelijk, dat een cuticula aanwezig is, zij is dan echter te smal om met reagentia aan te toonen. De opzwellling van de wand moet het gevolg zijn van de opheffing van de druk op deze zwelbare wand, al of niet samengaannde met een invloed van de suiker op de zwelling van deze. Als deze dezelfde eigenschappen heeft als agar en de wand van de roode wieren, waarmee WALTER (1923) werkte, dan zal suiker geen invloed, NaCl echter een wateronttrekkende invloed op deze wand moeten hebben (WALTER (1923)). Dit zal dus een versterkende invloed op het verschijnsel uitoefenen.

SAMENVATTING

1. Van verschillende soorten gezouten visch en van een monster zout, afkomstig van een vischzouterij, werden de volgende aëroob te kweken bacteriën geïsoleerd: a) *Bacillus halobius ruber* KLEBAHN, waarvan de naam veranderd werd in *Bacterium halobium*, b) een rood gekleurde *Sarcina*, c) een oranje gekleurde staafvormige bacterie (*Bacterium trapanicum* n. sp.) en d) een ongekleurde *Sarcina* (*Sarcina gigantea* n. sp.). De roode *Sarcina* komt, doordat zij in verschillende groeivormen optreedt, zoowel met *Sarcina morrhuae* FARLOW, als met *Micrococcus* (*Diplococcus*) *morrhuae* KLEBAHN overeen, zoodat blijkt, dat deze tot dezelfde soort behooren, die *Sarcina morrhuae* KLEBAHN werd genoemd. Hoogstwaarschijnlijk zijn de vele in de literatuur beschreven bacteriën, die het rood worden van gezouten visch veroorzaken, tot *Bacterium halobium* en *Sarcina morrhuae* KLEBAHN terug te voeren. Aan deze veroorzakers van het „rood” moet waarschijnlijk *Bacterium trapanicum* nog worden toegevoegd.

2. Het onderzoek van KLEBAHN wordt bevestigd, wat betreft de gevoeligheid van *Bacterium halobium* ten opzichte van verlaging van de zoutconcentratie van de gebruikte voedingsbodem (30 % NaCl, 1 % pepton). De twee *Sarcina*'s zijn veel minder gevoelig voor een dergelijke verlaging. De mogelijkheid werd naar voren gebracht, dat de opzwellings, die *Bacterium halobium* vertoont tengevolge van verlaging van het zoutgehalte van de omgeving, het gevolg is van imbibitie van het protoplasma.

3. *Bacterium halobium* komt in verschillende stammen voor. Deze stammen zijn te verdeelen in 2 groepen. Groep I heeft een helder, doorzichtig uiterlijk in cultuur. Groep II is ondoorzichtig, troebel in cultuur, als gevolg van het voorkomen van z.g. gasvacuolen. Binnen de groepen wisselt de kleur van de stammen tusschen paars

en oranje. Waar deze vacuolen nagenoeg de geheele cel vullen, verleenen zij de bacteriën het vermogen aan de oppervlakte van water of pekkel te drijven. Door het voorkomen van stammen met en zonder de vacuolen was het zeer goed mogelijk, de theorie van KLEBAHN, dat de vacuolen gas bevatten, te toetsen. De verschillende waarnemingen en proeven spraken voor deze, door hem zoo goed als bewezen theorie. De voornaamste hiervan zijn: door druk en tengevolge van verschillende reagentia zijn de gasvacuolen uit de bacteriën te verwijderen, terwijl de bacteriën overigens onveranderd blijven. Na deze verwijdering zijn gasbellen tusschen de bacteriën waar te nemen. Ook door koken van een suspensie verdwijnen de vacuolen. De brekingsindex van de inhoud van de gasvacuolen is lager dan die van water. De theorie van KOLKWITZ en CANABAEUS, dat de gasvacuolen bij zuurstofgebrek ontstaan en gistingsgassen bevatten, kan niet voor de aërobe *Bacterium halobium* gelden. In de vacuolen kon geen zuurstof met gereduceerd indigokarmijn aangetoond worden. Hoogstwaarschijnlijk blijven de bacteriën, die door druk van de gasvacuolen zijn ontdaan, levensvatbaar.

4. De roode kleur van culturen van *Bacterium halobium*, *Bacterium trapanicum* en *Sarcina morrhuae* is het gevolg van het voorkomen van carotinoïde kleurstoffen in de cel. De kleurstof van *Bacterium halobium* werd nader onderzocht, zij bleek uit twee componenten te bestaan, deze werden kristallijn verkregen en bacterioruberine α en β genoemd. α komt in veel grootere hoeveelheid voor dan β . In methylalcohol vertoont α de volgende banden: I max. bij $522 \mu\mu$, II max. bij $490 \mu\mu$, III max. bij $466 \mu\mu$; β : I max. bij $502 \mu\mu$, II max. bij $482 \mu\mu$. Zij worden beide in CS_2 , zoowel als in petr.-aether opgelost, aan CaCO_3 geadsorbeerd en gedragen zich in het systeem petr.-aether/methylalcohol 85 % hypophasisch. α komt in minstens drie zeer nauw verwante componenten in de bacterie voor, die verschillend sterk aan CaCO_3 worden geadsorbeerd. De verschillende stammen bevatten dezelfde componenten in even groot aantal, waarschijnlijk ook in dezelfde quantitatieve verhouding. De kleurstof van *Bacterium halobium* is dus een geheel andere dan bacterio-purpurine en dan prodigiosine. Deze bacterie behoort niet tot de purperbacteriën en is ook niet verwant met *Bacillus prodigiosus*.

5. *Bacterium halobium* groeit niet in media zonder pepton of eiwit. De andere geïsoleerde bacteriën kunnen zich ook in media met eenvoudiger organische N-verbindingen ontwikkelen. Het onderzoek van KLEBAHN wordt bevestigd, wat betreft de noodzakelijkheid van NaCl in de voedingsbodem van *Bacterium halobium* en *Sarcina morrhuae*. Na kan n.l. niet geheel door K vervangen worden. Waarschijnlijk moet dit toegeschreven worden aan een antagonistische werking van Na op K. De mate van vergiftigheid van verschillende andere zouten dan NaCl werd voor *Bacterium halobium* nagegaan. Het bleek, dat zoowel anionen als kationen vergiftig kunnen zijn. De volgorde, waarin de schadelijke werking van de verschillende zouten toeneemt, is de volgende: KCl, MgSO₄, KNO₃, LiCl, CaCl₂, BaCl₂, KBr, Na₂B₄O₇. Opvallend is de groote vergiftigheid van Li ten opzichte van Na en K. Verder kwam een uitgesproken Mg-Ca-antagonisme tot uiting. Overeenkomstige proeven, die echter nog een voorloopig karakter dragen, werden met *Sarcina morrhuae* en *Bacterium trapanicum* uitgevoerd, zonder een groot verschil in resultaat op te leveren.

6. *Sarcina gigantea* vertoont hetzelfde verschijnsel als *Bangia* en *Lemanea* (twee roode wieren, die door WALTER zijn onderzocht) bij overbrenging in een geconcentreerde oplossing van suiker: de inhoud trekt samen, terwijl de wand opzwelt. Wanneer de bacterie daarna weer in een geconcentreerde oplossing van NaCl wordt gebracht, treedt de oorspronkelijke toestand weer in. Het verschijnsel kan ongeveer op dezelfde wijze verklaard worden, als WALTER (1923) dit deed bij de genoemde wieren: de suikeroplossing onttrekt osmotisch water aan het celvocht of het protoplasma. Een dergelijke wateronttrekking kan echter alleen plaats hebben als het protoplasma voor het zout geheel en voor de suiker niet doorlaatbaar is. Dit moet dus het geval zijn. De opzwellling van de wand moet het gevolg zijn van de aanwezigheid van een cuticula, die in het normale geval tezamen met het protoplasma de zwelling van de wand tegengaat.

LITERATUUR

- BAARS, (1930), Over sulfaatreductie door bacterien. Diss. Delft.
- BAAS-BECKING, (1928), On organisms living in concentrated brine. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. 3e serie. 1.
- , (1930), Observations on *Dunaliella viridis*, Teodoresco. Contributions to marine biol. Stanford press.
- , (1931(a)), Salt effects on swarms of *Dunaliella viridis* Teod. Journ. of Gen. Physiol. 14.
- , (1931(b)), Historical notes on salt and saltmanufacture. The Scientific Monthly 32.
- , (1931(c)), Gaia of leven op aarde. Rede uitgesproken bij het aanvaarden van het ambt van gewoon Hoogleraar aan de Rijks Universiteit te Leiden. M. Nijhoff, 's-Gravenhage.
- , (1932), Over zoutbereiding en zoutbiologie. Chem. Weekbl. Jaarg. 29. No. 7.
- BARANIK-PIKOWSKY, (1927), Ueber den Einfluss hoher Salzkonzentration auf die Limanbakterien. Centralbl. f. Bakt. II. 70.
- BECKWITH, (1911), The bacterial cause of the reddening of cod and other allied fish. Centralbl. f. Bakt. I. 60.
- BERGEY, (1930), Manual of Determinative bacteriology. III Edition. Baltimore.
- BEYERINCK, (1889), Le photobacterium *luminosum*, bactérie lumineuse de la mer du nord. Archiv Néerl. 23.
- BOONE and BAAS-BECKING, (1931), Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina* L. Journ. of Gen. Physiol. 14.
- BRAND, (1901), Bemerkungen über Grenzzellen und über spontane rote Inhaltskörper der Cyanophyceen. Ber. D. Bot. Ges. 19.
- BUDER, (1919), Zur Biologie des Bakteriopurpurins und der Purpurbakterien. Jahrb. f. wiss. Bot. 58.
- CANABAEUS, (1929), Ueber die Heterocysten und Gasvakuolen der Blaualgen. Kolkwitz' Pflanzenforschung 13.
- CITTERT, VAN (1923), Un monochromateur de grande luminosité et avec peu de lumière diffuse. Revue d'optique théorique et instrumentale 2.
- CLOAKE, (1923), Red discolouration (so-called „Pink” or „Pink Eye”). Dep. of Scientific and Ind. Research. Food Investigation board 18.
- COHN, (1875), Untersuchungen über Bakterien II. Beitr. z. Biol. d. Pfl. I.

- COWARD, (1924), Some observations on the extraction and estimation of lipochromes from animal and plant tissues. *Bioch. Journ.* vol. 18.
- DEVENTER, VAN, (1930), De kleurstoffen van *Neurospora* (*Monilia*) *sitophila* Shear et Dodge. Diss. Utrecht.
- EDINGTON, (1887), An investigation into the nature of the organisms present in „red” cod, and as to the cause of the red coloration. VI Annual report of the fishery board of Scotland P.III Edingburgh 1888 (naar Klebahn).
- EYKMAN, (1904), Ueber thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. *Centralbl. f. Bakt.* I 37. Originale.
- FALKENHEIM, (1885), Ueber Sarcine. *Arch. f. exper. Pathologie und Pharmacologie* 19.
- FARLOW, (1880), On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season. U.S. comm. of fish and fisheries. Washington (naar Klebahn).
- FISCHER, (1900), Die Empfindlichkeit der Bakterienzelle und das baktericide Serum. *Ztschr. f. Hygiene.* 35.
- , (1903), Vorlesungen über Bakterien. 2e Aufl. Jena.
- , (1905), Die Zelle der Cyanophyceen. *Bot. Ztg.* 63.
- GAYON et CARLES, (1885), Société d'hygiène publique de Bordeaux. (naar Le Dantec).
- GOLIKOWA, (1930), Eine Gruppe von obligat halophilen Bakterien, gezüchtet in Substraten mit hohem NaCl Gehalt. *Centralbl. f. Bakt.* II. 80.
- GOOR, VAN, (1925), Contribution à la physiologie des Cyanophycées. *La revue algologique* No. 1.
- GOPPELSROEDER, (1901), Capillaranalyse, beruhend auf Capillaritäts- und Adsorptionserscheinungen. *Verh. der Naturf. Gesellschaft.* Basel. 14.
- HANZAWA and TAKEDA, (1930), On the reddening of Boned Codfish. *Archiv f. Mikrobiol.* 2.
- HARRISON and KENNEDY, (1922), The Red Discolouration of Cured Codfish. *Royal Soc. of Canada. Proc. and Trans.* 3 series. vol. 16.
- HYLKEMA, (1916), De permeabiliteitsverhoudingen bij gistcellen en bacteriën. Diss. Utrecht.
- JANSSSEN, (1931), De photochemische reactie der aromatische nitroaldehyden. Diss. Utrecht.
- JOHAN-OLSEN, (1887), *Christiania Vidensk. Selsk. Forhandlinger.* (naar Klebahn).
- KATZ, (1918), Die Gesetze der Quellung. *Kolloidchem. Beih.* 9.
- KELLERMAN, (1914), Micrococci causing red Deterioration of salted Codfish. *Centralbl. f. Bakt.* II. 42.
- KLEBAHN, (1895), Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der Wasserblüte bildenden *Phycochromaceen*. *Flora.* 80.

- , (1896), Ueber Wasserblüthebildende Algen und über das Vorkommen von Gasvacuolen bei den Phycchromaceen. Forschungsber. a. d. Biol. Stat. zu Plön. 4.
- , (1919), Die Schädlinge des Klippfisches. Mitteilungen a. d. Inst. f. Alg. Bot. in Hamburg. 4.
- , (1922), Neue Untersuchungen über die Gasvacuolen. Jahrb. f. Wiss. Bot. 61.
- , (1925), Weitere Untersuchungen über die Gasvacuolen. Ber. D. Bot. Ges. 43.
- KLINCKSIECK et VALETTE, (1908), Code des Couleurs. Paris.
- KOLKWITZ, (1928), Ueber Gasvacuolen bei Bakterien. Ber. D. Bot. Ges. 46.
- KRAUSE, in FLUEGGE (1896), Die Mikroorganismen. 3 Aufl. Bd. II. (naar Klebahn).
- KRAFT, (1902), Beiträge zur Biologie des Bacterium prodigiosum und zum chemischen Verhalten seines Pigmentes. Diss. Würzburg.
- KUHN und LEDERER, (1931), Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. Ber. D. Chem. Ges. 64.
- KUHN und WINTERSTEIN, (1931), Viola-xanthin, das xanthophyll des gelben Stiefmütterchen (Viola tricolor). Ber. D. Chem. Ges. 64.
- KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER, (1931), Zur Kenntnis der Xanthophylle. Hoppe-S. Ztschr. f. Physiol. Chem. 197.
- LAUTERBORN, (1914—'17), Die sapropelische Lebewelt. Ein Beitrag zur Biologie des Faulschlammes natürlicher Gewässer. Verh. des Naturhist.-med. Vereins z. Heidelberg N. F. 13.
- LE DANTEC, (1891), Etude de la morue rouge. Ann. de l'Inst. Pasteur. 5.
- , (1906), Le microbe du rouge de morue. Compt. rend. hebd. d. séances et mém. d. l. Soc. de Biol. 61.
- LIEBERT, (1924), Die Grundlagen der Bereitung von Pökelhering auf holländische Art. Der Fisch. 2.
- , (1930), Ueber die Ursache des „Rotwerdens“ von Pökelhering. Centralbl. f. Bakt. II. 80.
- LIPPMAA, (1925), Das Rhodoxanthin, seine Eigenschaften, Bildungsbedingungen und seine Funktion in der Pflanze. Naturf. Ges. b. d. Univ. Tartu. 24.
- LUDWIG, (1849), Ztschr. rationelle Med. 8. (Naar Baas-Becking).
- MARTEL et GERMAIN, (1921), Sur le rouge des salaisons. Isolement de l'agent spécifique. C. R. Ac. Médecine. (Naar Tattevin).
- MARTIN and WILBUR, (1921), Salt antagonism in Artemia. Am. Journ. of Physiol. Vol. 55.
- MAURIAC, (1886—'89), Causes of poisoning, caused by spoiled codfish. Rep. of the Fish Comm. Part. 14. (Naar Hanzawa en Takeda).
- MATZUSCHITA, (1900), Die Einwirkung des Kochsalzgehaltes des Nährbodens auf die Wuchsform der Mikroorganismen. Ztschr. f. Hygiene 35.
- METZNER, (1928), Das Mikroskop. Leipz. u. Wien.

- MEYER, (1905), Ueber Kugelbildung und Plasmoptyse der Bakterien. Ber. D. Bot. Ges. 23.
- MOLISCH, (1896), Die Krystallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte. Ber. D. Bot. Ges. 14.
- , (1903), Die sogenannten Gasvacuolen und das Schweben gewisser Phycochromaceen. Bot. Ztg. 61.
- , (1904), Leuchtende Pflanzen. Jena.
- , (1906), Zwei neue Purpurbakterien mit Schwebekörperchen. Bot. Ztg. 64.
- , (1907), Die Purpurbakterien. Jena.
- MOLL and BURGER, (1925), The sensitivity of a galvanometer and its amplification. Philos. Mag. Vol. 1.
- NIEL, VAN, (1931), On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. Archiv. f. Mikrobiol. Bd. 3.
- OESTERLE und STAHL, (1929), Untersuchungen über den Formenwechsel und die Entwicklungsformen bei *Bacillus mycoides*. Centralbl. f. Bakt. II. 79.
- PALMER, (1922), Carotinoids and related pigments. New York.
- PALMER and ECKLES, (1914), Carotin. The principal natural yellow pigment of milkfat. Part. II. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 10. (Naar Palmer).
- PATOUILLARD, (1885), In Roumeguère, Les Microphytes de la morue rouge et du porc rouge, récemment observés au Havre et à Bordeaux. Revue Mycol. 7. 69. (Naar Klebahn).
- PEIRCE, (1914), The Behavior of Certain Micro-organisms in Brine. „The Salton Sea“. Carnegie Inst. of Washington. Publ. 193.
- PETTER, (1931), On Bacteria of Salted Fish. Proc. Kon. Acad. v. Wetensch. Amsterdam. Vol. 34. No. 10.
- POULSEN, (1879-'80), Om nogle mikroskopiske Planteorganismer. Vidensk. Meddel. fra den naturk. Foren. Kjobenhavn. (Naar Klebahn).
- PLOWE, (1931), Membranes in the plant cell. 1. Morphological membranes at protoplasmatic surfaces. 2. Localization of differential permeability in the plant protoplast. Protopl. 12. 2.
- RAICHEL, (1928), Ueber den Einfluss osmotisch wirksamer Mittel auf die Bacterienzelle. Archiv f. Protistenk. 63.
- RICHTER, (1894), *Gloietrichia echinulata*, eine Wasserblüte des Gr. und Kl. Plöner Sees. Forschungsber. a. d. Biol. Stat. zu Plön. 2.
- RUHLAND und HOFFMANN, (1925), Die Permeabilität von *Beggiatoa mirabilis*. Archiv f. Wiss. Bot. I.
- SASLAWSKY und HARZSTEIN, (1930), Ueber die Einwirkung gewisser Salze auf obligat halophile Thionsäure-bakterien. Centralbl. f. Bakt. II. 80.
- STRODTMANN, (1895(a)), Bemerkungen über die Lebensverhältnisse des Süßwasserplankton. Forschungsber. a. d. Biol. Stat. zu Plön. 3.
- , (1895(b)), Die Ursache des Schwebvermögens bei den Cyanophyceen. Biol. Centralbl. 15.
- TATTEVIN, (1927), Le sel et les microbes. Diss. Nancy.

- TRESSLER, (1923), Marine products of Commerce. Chem. Catal. Co. New-York.
- TSWETT, (1906(a)), Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. D. Bot. Ges. 24.
- , (1906(b)), Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. Ber. D. Bot. Ges. 24.
- , (1911), Ueber den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. Ber. D. Bot. Ges. 29.
- USIGLIO, (1849), Analyse de l'eau de la Méditerranée sur les côtes de France. Ann. chim. et phys. 27, série 3. (Naar Baas-Becking).
- VERMAST, (1931), Over carotine. Diss. Utrecht.
- WALTER, (1923), Protoplasma- und Membranquellung bei Plasmolyse. Jahrb. f. wiss. Bot. 62.
- WEHMER, (1897), Centralbl. f. Bakt. II. 3. (Naar Golikowa).
- WILLE, (1902), Ueber Gasvakuolen bei einer Bakterie. Biol. Centralbl. 22.
- WILLSTÄTTER und ESCHER, (1910), Ueber den Farbstoff der Tomate. Ztschr. f. physiol. Chemie. 64.
- WILLSTÄTTER und PAGE, (1914), Chlorophyll 24. Ueber die Pigmente der Braunalgen. Ann. 404.
- WILLSTÄTTER und STOLL, (1913), Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin.
- WINOGRADSKY, (1887), Ueber Schwefelbakterien. Bot. Ztg. 45.
- WISSELINGH, VAN, (1915), Ueber die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze. Flora 107.
- WREDE, (1930), Ueber das Prodigiosin, den Farbstoff des Bacillus prodigiosus. Ztschr. f. Hygiene Bd. 111.
- ZECHMEISTER und CHOLNOKY, (1927), Ueber Paprika-Farbst. I. Ann. 454.
- ZOPF, (1891), Ueber Ausscheidung von Fettfarbstoffe seitens gewisser Spaltpilze. Ber. D. Bot. Ges. 9.

STELLINGEN

I

Het is zeer waarschijnlijk, dat de bacterien, die in de literatuur als veroorzakers van het rood worden van gezouten visch beschreven zijn, alle behooren tot *Sarcina morrhuae* Kl. of *Bacterium halobium*.

II

In de verschillend gekleurde stammen van *Bacterium halobium* komen dezelfde carotinoïden in dezelfde quantitatieve verhouding voor.

III

KLEBAHN heeft bewezen, dat de z.g. gasvacuolen werkelijk gas bevatten.

Jahrb. f. Wiss. Bot. 61, Ber. D. B. Ges. 43.

IV

Het al of niet plasmolyseeren van zoetwaterbacterien in osmotisch werkzame oplossingen berust op het al of niet voorkomen van een vacuole.

HYLKEMA diss. Utrecht 1916.

V

De bacteriophagaag is een product van de levende bacterie-cel.

Den DOOREN DE JONG. Proc. Kon. Akad. v. Wetensch. Amst. 33 en 35

VI

Het is gewenscht voor het xanthophyl uit groene bladeren ($C_{40}H_{56}O_2$, smeltp. 193° (gecorr.)) de naam luteïne te gebruiken.

KUHN, WINTERSTEIN en LEDERER. Ztschr. f. Physiol. Chem. 197, 141.

VII

Het is zeer waarschijnlijk, dat alle chemische veranderingen, die worden teweggebracht door levende cellen (dus zoowel assimilatie- als dissimilatieprocessen), teruggebracht kunnen worden tot een keten van reacties, waarvan elk bestaat uit een katalytische overdracht van H_2 . Dit sluit in geen geval uit, dat ook een activatie van de H_2 -acceptoren noodzakelijk kan zijn.

VIII

In vele gevallen berust de z.g. stimuleerende werking van zaadbeitsmiddelen op desinfectie.

IX

Ten onrechte meent STAPP te hebben aangetoond, dat de Europeesche bladplekkenziekte, de „wildfire” en de hoekige bladplekkenziekte van de tabak door dezelfde bacterien worden veroorzaakt.

Angew. Bot. 12.

X

De erfelijke endo-symbionten (bacterien en gisten), die bij insecten voorkomen, leveren geen enzymen, die noodzakelijk zijn voor de voedselvertering van de gastheer. Bij bepaalde voedingsspecialisten kunnen deze symbionten van beteekenis voor de gastheer zijn, doordat zij stoffen vormen, die noodzakelijk zijn voor deze.

XI

Bij het onderzoek naar het verband tusschen de pH, waarbij optimale werking van een enzym plaats heeft en de toestand van het substraat moet men rekening houden met de invloed, die het buffermengsel op het substraat uitoefent.

VONK, Ztschr. f. Physiol. Chem. 198.

III

XII

In het plantenrijk kunnen nieuwe soorten ontstaan tengevolge van entreme uitwendige omstandigheden, wanneer deze polyploidie veroorzaken.

HAGERUP, Hereditas 16.

XIII

Men kan in het algemeen niet spreken van kalkplanten en kalkschuwe planten, daar het gedrag ten opzichte van kalk afhankelijk kan zijn van andere in de bodem aanwezige kationen, waarop Ca voor de plant een antagonistische werking uitoefent.

XIV

Het voorkomen van gasvacuolen bij Schizophyceae en Schizomycetes is een argument voor de verwantschap tusschen deze groepen van planten.

