Allotropie van bacteriën

Agen. 192, 1934

ALLOTROPIE VAN BACTERIËN

P. SCHLEMPER

ALLOTROPIE VAN BACTERIËN

Diss Utrecht 1934

ALLOTROPIE VAN BACTERIËN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. C. W. STAR BUSMANN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 7 MEI 1934 DES NAMIDDAGS 4 UUR

DOOR

PIETER SCHLEMPER

GEBOREN TE DORDRECHT.

DRUK UTRECHTSCHE TYPOGRAFEN ASSOCIATIE — KEIZERSTRAAT 5 UTRECHT

Aan mijn moeder.

Het voltooien van dit proefschrift biedt mij de gelegenheid om allen te danken, die bijdroegen tot mijn wetenschappelijke vorming, van wie ik niet nalaten kan enkelen met name te noemen.

Allereerst gaat mijn dank uit tot U, Hooggeleerde de Graaff, Hooggeachte promotor, voor al hetgeen ik van U heb mogen leeren en voor de voortdurende, hartelijke belangstelling en steun, bij de bewerking van dit proefschrift van U ondervonden.

Tevens dank ik U, dat gij mij Uw opbouwende critiek niet onthouden hebt, welke voor mij van onschatbare waarde geweest is en waarvoor ik mij bij voortduring bij U aanbeveel.

Het groote voorrecht Uw assistent te zijn, bood mij de gelegenheid in aanraking te komen met een studierichting, welke mij voordien van nabij onbekend was en waardoor ik in staat gesteld werd, mijn kennis te verrijken.

Hooggeleerde Cohen, het moge U niet verwonderen, dat een leerling, wiens leermeester zich bij voortduring heeft bezig gehouden met de allotropie, dezen term ook voor de levende stof heeft gebezigd.

Voor het theoretisch en practisch onderricht in de physische chemie betuig ik U mijn hartelijken dank.

Hooggeleerde Kruyt, ik acht het een voorrecht Uw heldere colleges over de heterogene evenwichtsleer te hebben mogen volgen. Tevens prijs ik mij gelukkig door U de colloïdchemie te hebben hooren doceeren, waarvan de kennis mij van veel nut is en steeds zal zijn.

Aan U, Hooggeleerde Ruzicka en Hooggeleerde Kögl, maar vooral aan U, Hooggeleerde Van Romburgh, is het te danken, dat de organische chemie steeds een mijner meest geliefde studievakken was.

Hooggeleerde Schoorl, U dank ik voor de mij verleende gastvrijheid in Uw Instituut, en voor de bereidwilligheid, waarmede gij instrumenten en localiteiten mij hebt ter beschikking gesteld.

Für die Gastfreundschaft in Ihrem Institut zu Giessen, sehr geehrten Herr Professor Kuhn, will ich Ihnen auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Zeergeleerde Schouten, een veelheid van woorden zou niet vermogen mijn gevoelens voor U weer te geven. Naast de groote belangstelling voor mijn persoon, dank ik U voor die, welke Gij steeds in mijn werk hebt gesteld. Uw uitnemend apparaat is voor het tot stand komen van dit proefschrift onmisbaar geweest.

Tenslotte dank ik allen die mij bij het bewerken van dit proefschrift behulpzaam waren, en in het bijzonder het personeel van het Pharmaceutisch Laboratorium.

INHOUD.

INLEIDING.

In den laatsten tijd vraagt het probleem der pleomorphie van bacteriën weder meer de aandacht, nu van verschillende zijden aan de mogelijkheid van het bestaan van een levenscyclus bij deze organismen wordt gedacht, van Fransche zijde het voorkomen van een filtreerbaar stadium wordt voorgestaan, maar bovendien, omdat het onrustbarend aangroeien van de soorten, welke menigmaal slechts op zéér enkele eigenschappen van elkaar blijken af te wijken, de vraag wettigt niet alleen, of al die vormen een bestaansrecht hebben, maar tevens in hoeverre men hier werkelijk van erfelijke verschillen mag spreken. Steeds ernstiger zal men zich hebben af te vragen, wat men in de bacteriologie onder een bacteriesoort heeft te verstaan.

Helaas heerscht op dit gebied geen overeenstemming en wat erger is, er kan hier van begripsverwarring worden gesproken. Dit hangt niet alleen samen met de omgrenzing van wat men onder variabiliteit en mutatie verstaat, maar mede met het feit, dat een haast grenzenlooze namengeverij vrij spel heeft gehad, waardoor steeds weer nieuwe namen en begrippen aan de oude werden toegevoegd. Wil men dan ook hier zijn gedachten en opvattingen scherp geformuleerd weergeven, dan wordt men gedwongen vooraf zijn begrippen niet alleen duidelijk te omlijnen, maar ook vast te leggen met welke termen men die begrippen wenscht aan te duiden.

Zoo dient in de eerste plaats te worden omschreven, wat wij in het volgende onder pleomorphie wenschen te verstaan.

Wat de letterlijke beteekenis van dat woord betreft, kan worden opgemerkt, dat het is afgeleid van de Grieksche woorden πλεων (= meer), de vergrootende trap van πολυς (= veel), waarvan het woord polymorphie is afgeleid, en μορφη (= vorm).

De begrippen pleomorphie en polymorphie worden, vaak door elkaar, gebruikt als tegenstellingen van het begrip monomorphie, afgeleid van μονος (= enkel); zij duiden dus beide een veelvormigheid aan.

Toch moet er onderscheid gemaakt worden tusschen poly- en pleomorphie, hetgeen ook taalkundig is te verdedigen.

Daar πλεων de vergrootende trap is van πολυς, zal de veelvormigheid, aangeduid door pleomorphie, een grootere, ruimere moeten zijn dan die, welke door het woord polymorphie tot uitdrukking wordt gebracht.

Het woord μορφη zou, wat zijn oorspronkelijke beteekenis betreft, alleen op den vorm, de gedaante, de uitwendige verschijningsvormen moeten slaan.

Onder monomorphie der bacteriën dient men dus letterlijk te verstaan, dat bacteriën van één bepaalde soort uitsluitend voorkomen in één en denzelfden, uitwendigen verschijningsvorm, welken Enderlein „Wuchsform" noemt.

Op een dergelijke beschouwing steunende, stelde Ferdinand Cohn zijn vorm-systematiek der bacteriën op en aan deze opvatting hield ook b.v. Robert Koch streng vast.

Onder poly- en pleomorphie dient men dan te verstaan, dat bacteriën van één bepaalde soort in méér dan één uitwendigen verschijningsvorm kunnen voorkomen, welke vormen bovendien in elkaar kunnen overgaan (v. Nägeli).

Echter, men heeft zich niet steeds aan die oorspronkelijke beteekenis dezer begrippen gehouden.

Zoo heeft men bij μορφη niet alleen gedacht aan den uitwendigen verschijningsvorm, doch soms ook aan de eigenschappen van het individu. Men gaf aan pleomorphie aldus de beteekenis van een verscheidenheid van vorm, van physiologische, zoowel als antigene eigenschappen, enz., zelfs meende men daarmede de mogelijkheid van omzetting van de eene soort in de andere uit te drukken. Sommigen duidden deze verscheidenheid aan met den naam pleomorphisme, in tegenstelling dan tot de pleomorphie, die alleen op den vorm betrekking zou hebben.

Naast deze opvattingen doen of deden nog vele andere opgeld; zoo b.v. sprak men van polymorphie, waar een ander van variatie sprak, van pleomorphie, waar het ging om verschillen in kultuurgroei, van polymorphie, om reversibele, al of niet erfelijke veranderingen, van pleomorphie, om irreversibele, erfelijke veranderingen, enz.

Voeg hieraan toe, dat men bovendien nog spreekt van pluriformiteit en heteromorphie, dan zal het duidelijk zijn, dat het nood-

zakelijk is van te voren vast te stellen, hoe wij deze verschijnselen willen aanduiden en definieeren.

Het lijkt ons wenschelijk, de termen pleomorphie en pleomorphisme te laten varen en daarvoor in de plaats te stellen allotropie, afgeleid van de Grieksche woorden *αλλος* (= anders) en *τρεπω*, (= wenden) hetgeen een in de chemie gebruikelijke term is voor verschillen in chemisch en physisch gedrag van in verschillende vormen voorkomende elementen, of de reeds door Aristoteles gebruikte benaming voor de primaire eigenschap van het leven, n.l. de autokinesis afgeleid van de Grieksche woorden *αὐτος κινησις*, hetgeen zelfbeweging beteekent. Dit is de eigenschap, eigen aan elk levend organisme van zich te kunnen veranderen en aanpassen naar gelang van omstandigheden.

De allotropie of autokinēsis bevat dus in zich de erfelijke veranderlijkheid en de niet erfelijke.

In den tijd, dat het woord „mutatie" nog niet gebruikt werd, koos O. Fischer hiervoor de term pleogenie, welke heel juist dezen vorm van veranderlijkheid weergeeft, daar in het genencomplex een wijziging gekomen is, waardoor deze tevens erfelijk wordt, en onveranderlijk, slechts onderworpen aan de aan elk organisme eigene veranderlijkheid, op de nakomelingschap wordt overgedragen.

Voor de „variatie" gebruikte hij echter niet het o. i. voor de hand liggende woord pleophaenie, om de veranderlijkheid aan te duiden, welke het gevolg is van een wijziging van korteren of langeren duur („Dauermodification" van Jollos, 1924) van het phaenotype.

Het volgende schema geeft het bovenstaande overzichtelijk weer:

allotropie of autokinesis	erfelijke modificatie of pleogenie of mutatie	
	niet erfelijke modificatie of pleophaenie of variatie	tijdelijke variatie
		duurzame variatie

Wij zullen ons houden aan de letterlijke beteekenis der termen monomorphie, polymorphie, allotropie en autokinēsis.

Onder monomorphie der bacteriën verstaan wij de omstandigheid, dat bacteriën van één bepaalde soort uitsluitend in één uitwendigen verschijningsvorm voorkomen (Cohn, Koch);

onder polymorphie de omstandigheid, dat bacteriën van één bepaalde soort in méér dan één uitwendigen verschijningsvorm voorkomen, b.v. de tuberkelbacil in een staafvorm, een korrelvorm en in een voor ons onzichtbaren vorm;

onder allotropie of autokinēsis der bacteriën het verschijnsel, dat bacteriën van één bepaalde soort kunnen voorkomen in vormen, welke van elkaar zoowel morphologisch, biologisch als physiologisch verschillen, b.v.

een coccoïde en een staafvormige B. coli,
een bewegelijke en een niet-bewegelijke B. coli,
een lactose-vergistende en een lactose-niet-vergistende B. coli,
een virulente en een niet-virulente B. typhi,
een agglutinabele en een niet-agglutinabele B. typhi, enz.

HOOFDSTUK I.

HISTORISCH OVERZICHT.

Van Leeuwenhoek [1]) (1675) is onbetwistbaar de eerste onderzoeker geweest, die bacteriën gezien heeft. Hij beeldde ze tevens af, zoodat er geen twijfel over behoeft te bestaan, wat hij gezien heeft. Hij zag: kogel-, staaf- en schroefvormige „animalcula". Hij nam dus waar de drie grondtypen der bacteriën. Op grond van deze vormtypen, besloot hij reeds tot het bestaan van verschillende soorten.

Deze op het oog hoogst primitieve indeeling der bacteriën, waarbij de uitwendige verschijningsvorm als grondslag werd gekozen, heeft zich merkwaardiger wijze tot op den huidigen dag gehandhaafd.

Tot aan Pasteur (1860) hield men zich in hoofdzaak bezig met de bestudeering van den vorm der bacteriën.

Naarmate de techniek, die er vooral op gericht was de verschillende soorten in reinkultuur te brengen, verbeterde, nam ook de kennis aangaande deze organismen in omvang toe en het spreekt dan ook vanzelf, dat men vanaf den eersten tijd de gevonden bacteriën tot een systeem trachtte te rangschikken.

Echter, men kan wel zeggen, dat tot op den huidigen dag de rangschikking der bacteriën tot een wetenschappelijk systeem de grootste moeilijkheden heeft opgeleverd.

Als ééncellige, uiterst kleine organismen, die zich slechts door deeling vermeerderen en zelfs bij de sterkste vergrooting geen duidelijke celstructuur vertoonen, bieden de bacteriën vooralsnog geen andere mogelijkheid dan hun uitwendige verschijningsvorm, om als grondslag bij een systematische indeeling te dienen.

De Deensche onderzoeker O. F. Müller [2]) (1786) deelde de bacteriën in bij de infusoriën of aftrekseldiertjes, een naam, die zij danken aan het voorkomen dezer organismen in planten-aftreksels.

Bij hem treffen we tevens voor het eerst de ons bekende benamingen aan van vibrio, spirillum, bacillus.

In 1838 meende Ehrenberg [3]) naast vele juiste waarnemingen nog met hoog-ontwikkelde dieren te doen te hebben, die mondwerktuigen, maag en oogen hadden.

De zoölogisch georiënteerde onderzoekers beschouwden de bacteriën als dieren, naast de protozoën en infusoriën.

De botanisch georiënteerde onderzoekers, vooral Perty [4]) (1852) en Cohn [5]) (1853), deelden de bacteriën bij de planten in.

Von Nägeli [6]) voerde in 1857 voor de bacteriën den naam splijtzwammen (schizomycetes) in, waarin de wijze van voortplanting en de met de zwammen overeenstemmende en meest op den voorgrond tredende wijze van voeding — naast anorganische tevens organische stoffen noodzakelijk door afwezigheid van chlorophyll — tot uiting komen.

Vooral F. Cohn was een voorstander van den naam bacteriën. Bij het opstellen van zijn systeem, waarbij hij den vorm als grondslag of indeelingsprincipe aannam, stelde Cohn zich (1870-1880) op het standpunt, dat deze voor elke bacteriesoort een bepaalde en standvastige was, die zich tijdens het leven en bovendien in de nakomelingschap ongewijzigd handhaaft (de zoogenaamde grondwet van Cohn).

Echter beschouwde hij andere dan morphologische eigenschappen niet van nul en geener waarde, want bij de onderkenning van nauw verwante soorten betrok hij pigmentvorming, fermentatie en virulentie.

In 1848 geloofde von Nägeli nog aan „Urzeugung".

Men stond nog voor de oplossing van het vraagstuk: komt een infectie-ziekte tot stand door bacteriën of door een rottingsferment, waarbij bacteriën iets toevalligs zijn en hoogstens door haar stofwisselingsproducten een verergering van het ziekteproces veroorzaken.

Uit het feit, dat bij de meest uiteenloopende ziekten bacteriën gevonden werden, die zich in niets — naar in dien tijd geldende — kenmerken — van elkaar en ook niet van de in de doode stof voorkomende bacteriën onderscheidden, meenden sommigen de conclusie te mogen trekken, dat de bacteriën niet de verwekkers waren van de ziekten. Want, indien de bacteriën de verwekkers van onderling zoo verschillende ziekten waren, moesten zij ook onderling duidelijke verschillen vertoonen. Daar ze echter bij al deze verschillende ziekten elkander gelijk waren — er volgens hen dan ook geen verschillende soorten bestonden — konden ze niet als de

verwekkers der ziekteprocessen worden beschouwd, maar slechts als iets bijkomstigs. De aanhangers der andere opvatting, van wie Cohn een der bekendste was, erkenden, dat de bacteriën er onderling vaak gelijk konden uitzien, hoewel elkander in uiterlijk gelijkend, toch op grond van onderling afwijkende eigenschappen, als van elkaar verschillende, echte soorten waren te beschouwen. Zij kunnen, zeide Cohn, uiterlijk elkander gelijk zijn, echter toch inwendig zóó verschillen als de bittere en de zoete amandel, of zooals Virchow het zeide, als de scheerling en de peterselie.

Ofschoon Cohn geen verschillen kende tusschen sommige bacteriën, deelde hij ze in zijn systeem van 1872 toch als verschillende soorten in, daarbij o.a. afgaande op het ziektebeeld en de vindplaats.

Toen Pasteur ontdekte, dat de verschillende wijzen van vergisting elk voor zich door een bepaald microörganisme worden tot stand gebracht, moest de gedachte wel opkomen, dat ook van elke infectie-ziekte één bepaald, specifiek microörganisme de oorzaak moest zijn.

Trachtte men zich echter op Pasteur's vondst te beroepen, dan beweerden de tegenstanders van de veelsoortigheid, dat het daarbij niet ging om verschillende soorten, maar dat men hier eenvoudig een aanpassing van den alom aanwezigen vorm der bacteriën aan het zeer bepaalde medium te zien had. Zij geloofden ook niet, dat het rood worden van spijzen, het geel of blauw worden van melk, de groenkleuring van etter en de pigmentvorming op aardappel te danken waren aan verschillende bacteriën, want, zeiden zij, de kleurstofvorming bij de planten is een zóó wisselende, physiologische functie, dat onderscheidingen daarop onmogelijk kunnen worden gebaseerd. De onkunde van in reinkultuur kweeken van bacteriën omstreeks dezen tijd maakte dan ook het bewijs der specificiteit vooralsnog onmogelijk.

Zoo was het mogelijk, dat Hallier [7]) (1866—'68) meende de oplossing van het vraagstuk van de oorzaak der infectie-ziekten gevonden te hebben in een micrococcus, die hij bij verschillende ziekten als cholera, pokken, typhus enz. vond.

Hallier zaaide dezen micrococcus uit op verschillende voedingsbodems en nam steeds waar, dat zich op die voedingsbodems schimmels ontwikkelden, waaruit hij besloot, dat de micrococci in het zieke lichaam niets anders waren dan ontwikkelingsstadia van hoogere zwammen.

Voor elk ziektebeeld moest men een bepaalde schimmel aannemen, die in de meest verschillende vormen, nu eens als Mucor, dan weer als Aspergillus enz. kon voorkomen.

De Bary [8]), Cohn, von Nägeli e.a. toonden aan, dat Hallier's media verzamelplaatsen waren van verschillende schimmels.

Voorts kon b.v. Billroth [9]) in 1874 nog schrijven, dat alle bij wondinfecties gevonden bacteriën te beschouwen waren als aan hare respectievelijke vindplaatsen aangepaste afstammelingen van één en denzelfden bacterievorm n.l. van Coccobacteria septica.

Hij schreef: „Es gibt bis jetzt keinerlei morphologische Kennzeichen irgendeiner Micrococcus oder Bacteriaform, aus welcher man schlieszen könnte, dasz sie sich nur bei einer bestimmten Krankheit im oder am lebenden Körper entwickele".

De beslissing over de beteekenis der bacteriën bij de infectieziekten hield dus nauw verband met de vraag of er werkelijk scherp gedefiniëerde, constante soorten van bacteriën bestaan, of dat slechts één enkele soort mocht worden aangenomen, die onbegrensd — of althans uiterst gemakkelijk en veelzijdig variabel is.

Het spreekt vanzelf, dat Cohn's opvattingen geen algemeenen en onverdeelden bijval vonden, niet door een ieder zonder slag of stoot onderschreven werden.

Lister [10]) (1872 en '73) was het b.v. niet eens met Cohn, hij dacht zich in den geest van Hallier de bacteriën als voort te komen uit schimmelsporen, aanvaardde, evenals bij de hoogere schimmels, verschillende soorten, die echter minder door hun morphologische, dan wel door hun physiologische eigenschappen gekenmerkt waren.

Daar echter volgens hem de physiologische kenmerken onzeker en onbestendig zijn, zag hij geen mogelijkheid de verscheidene soorten van elkaar te onderkennen. Tot deze gevolgtrekking kwam hij op grond van proeven met zure melk, waarin hij onbewegelijke bacteriën waarnam, terwijl, wanneer hij deze melk op verschillende voedingsbodems overentte, hij in bijna elken bepaalden voedingsbodem een ander organisme vond; op de gedachte, dat hij met een mengcultuur zou kunnen gewerkt hebben, kwam Lister niet, voor hem stond vast het bewijs geleverd te hebben, dat een bacterie door verandering van de uitwendige omstandigheden in alle mogelijke, morphologisch en zelfs physiologisch verschillende vormen veranderen kon. Tot gelijkluidende resultaten kwam ook Ray Lan-

k e s t e r [11]); op grond van zijn onderzoekingen aan rood gekleurde microörganismen, mede op grond van het feit, dat hij vond, dat voor een aantal verschillende bacterievormen — die hij tot de soort B. rubescens samenvoegde — het aanwezig zijn van de roode kleurstof bacteriopurpurine kenmerkend was, besloot hij, dat een indeeling naar den vorm, zooals C o h n die voorstond, niet geschikt was; het niet constant zijn der vormen werd door hem echter nog niet als zoodanig beschreven.

De meest op den voorgrond tredende tegenstander van C o h n 's opvattingen was wel C. v o n N ä g e l i (1877).

Hij nam aan, in overeenstemming met al zijn opgedane ervaringen, „dass die drei Gruppen der Schimmel-, Spross- und Spaltpilze nicht in einander übergehen".

Wat de schimmels betreft, daarvan zegt hij: „Was man (indessen) im Allgemeinen davon weisz, scheint (eher) dafür zu sprechen, dass die spezifisch verschiedenen Pilzfäden im Obst und in andern Speisen die gleiche Verderbniss herbeiführen". Hier bestaat dus hoogstwaarschijnlijk geen specificiteit.

Het zelfde geldt voor de gisten, waarvan hij zegt: „Wenn nicht alle Anzeichen trügen, so gibt es zwischen den beiden Extremen (reine Alkoholzellen und reine Kahmzellen) eine Menge von Uebergangsstufen, so dass die Annahme von eben so vielen verschiedenen Species weniger wahrscheinlich ist als die Annahme, dass eine oder einige wenige Arten verschiedene Acclimatisationszustände annehmen können, von denen jeder eine grössere oder geringere relative Constanz erlangt."

Wat de splijtzwammen (Schizomycetes) — een door v o n N ä g e l i ingevoerde benaming — aangaat, ook hier totaal geen specificiteit.

„Der nämliche Spaltpilz würde einmal in der Milch leben und Milchsäure bilden, dann auf Fleisch und hier Fäulniss bewirken, später im Wein und daselbst Gummi erzeugen, nachher in der Erde ohne Gährung hervorzubringen, endlich im menschlichen Körper um hier bei irgend einer Erkrankung sich zu betheiligen '.

„Wenn meine Ansicht über die Natur der Spaltpilze richtig ist, so nimmt die gleiche Species im Laufe der Generationen abwechselnd verschiedene, morphologisch und physiologisch ungleiche Formen an, welche im Laufe von Jahren und Jahrzehnten bald die Saüerung der Milch, bald die Buttersäurebildung im Sauerkraut, bald das Langwerden des Weins, bald die Fäulniss der Eiweiss-

stoffe, bald die Zersetzung des Harnstoffes, bald die Rothfärbung stärkemehlhaltiger Nahrungsmittel bewirken und bald Diphtherie, bald Typhus, bald recurrirendes Fieber, bald Cholera, bald Wechselfieber erzeugen".

Naar de pathogeniteit, die zij ten opzichte van den mensch vertoonen, onderscheidt von Nägeli drie soorten bacteriën te weten: de „Fäulnisspilze", de „Miasmenpilze" en de „Contagienpilze" en zegt daarvan: „Die Spaltpilzformen verwandeln sich in einander. Die Miasmenpilze entstehen unter den günstigen Bedingungen aus den Fäulnisspilzen oder andern allgemein verbreiteten Spaltpilzen und gehen unter entgegengesetzten Bedingungen wieder in diese über.

Die Contagienpilze deren Wohnstätte der Organismus ist, und die regelmässig aus dem Kranken in den Gesunden übertreten, werden, so wie sie dauernd in äusseren Medien leben und sich fortpflanzen, zu gewöhnlichen Spaltpilzen.

Es muss auch das Umgekehrte vorkommen; die Contagienpilze müssen aus den letzteren entstehen können."

Van monomorphie was volgens von Nägeli dan ook geen sprake, evenmin van specificiteit.

De eene soort kon in de andere overgaan.

De groote behoefte aan de omgrenzing van soorten doet zich echter vooral bij de practische vragen sterk gelden. Het waren dan ook voornamelijk de medisch geschoolde bacteriologen, die zich als voorstanders en aanhangers van Cohn's leer deden kennen, terwijl de botanisch onderlegden juist von Nägeli's standpunt verdedigden.

De noodzakelijkheid van een omschrijving en daarmede gepaard gaande herkenning der soorten, doet zich bij het beantwoorden van medisch-bacteriologische vraagstukken natuurlijk sterk gevoelen, omdat de aetiologie, evenals de diagnose van infectieziekten, zonder soortbegrenzing voor onoplosbare moeilijkheden zou zijn komen te staan. Het is dan ook niet te verwonderen, dat Koch [12]), die als grondlegger van de leer der pathogene kiemen is te beschouwen, zich als medestander van Cohn deed kennen, daar hij als patholoog en als epidemioloog het ontstaan der verschillende infectie-ziekten aan zéér bepaalde, voor die ziekten specifieke microörganismen toeschreef.

Waar dus von Nägeli zoo ver ging het soortbestaan te ontkennen, daar werd Koch juist tot de erkenning daarvan

gedreven; hij aarzelt dan ook niet te zeggen: „Als das wesentlichste Resultat muss indessen der Nachweis angesehen werden, dasz einer jeden der untersuchten Infectionskrankheiten eine konstante, nicht nur durch physiologische Wirkung auf den infizierten Organismus, sondern auch durch Grösze, Gestalt, Wachstum, wohlcharakterisierte Bakterienform entspricht, und dasz dadurch die Berechtigung, ja sogar die Notwendigkeit gegeben ist, ebensoviele bestimmte Arten von pathogenen Bakterien zu unterscheiden".

Wel had von Nägeli gelijk toen hij er op wees, dat elke soort de eigenschap bezit van den norm afwijkende vormen aan te nemen (allotropie of autokinesis).

Pasteur [13]) en Koch hebben beiden onweerlegbaar bewezen, dat de oorzaak van de gisting, der rotting en der infectieziekten aan zeer verschillende microörganismen moet worden toegeschreven, tevens, dat voor deze zeer verschillende processen zeer bepaalde, zelfs specifieke kiemen zijn aan te wijzen.

De vormconstantheid, door Cohn gepredikt, werd, ondanks het verzet van zekere zijden, de leidende gedachte in de bacteriologie.

Maar, al is men er heden ten dage wel bijna algemeen van overtuigd, dat een bepaalde coc of kogelbacterie zich nooit in een anderen bacil of staafbacterie, zelfs niet in een anderen coc vermag om te zetten, dat men hier met scherp omschreven, zelfstandige organismen te doen heeft, toch valt niet te loochenen, dat de meeste, zoo niet alle bacteriën bij nader onderzoek geen homogenen vorm te zien geven, maar dat er afwijkende gedaanten kunnen worden gevonden. Mede is men er van overtuigd, dat men door wijziging van de levensomstandigheden, b.v. bij het ouder worden van de kulturen, door het wijzigen van de reactie of van de samenstelling van den voedingsbodem of door verandering van temperatuur of zuurstofdruk, in staat is invloed uit te oefenen op de eigenschappen van de bacterie-cel, zoodat meer of minder gewijzigde vormen ontstaan.

Hier komt dus de allotropie of autokinesis tot uiting, de eigenschap van elk levend wezen om zich te veranderen en aan te passen, al naar de omstandigheden dit vergen. Wanneer een organisme in morphologischen of physiologischen zin een verandering ondergaat, spreekt men van een modificatie, een

wijziging, welke nu eens niet (variatie), dan weder wel erfelijk (mutatie) kan zijn.

In het laatste geval is een wijziging in het genencomplex opgetreden en is er dus iets nieuws ontstaan, — naar O. Fischer [14]) noemt men deze veranderlijkheid wel pleogenie en naar H. de Vries [15]) mutatie — in tegenstelling tot het eerste, waar geen wijziging in het genencomplex is gekomen of anders uitgedrukt, waar alleen het phaenotype is veranderd — deze veranderlijkheid noemt men variatie, doch men zou als analogon van pleogenie haar zeer terecht pleophaenie kunnen noemen, — welke verandering van korteren of langeren duur kan zijn, aldus spreekt men wel van een tijdelijke en van een duurzame variatie („Dauermodification" van Jollos [16]) (1924).

Een wijziging van de gedaante van een bacterie kan dus het gevolg zijn van variatie, dan wel van mutatie.

Op welke wijze zijn deze beide typen van modificatie te onderscheiden? Het beantwoorden van deze vraag is niet altijd eenvoudig: wèl, indien het gaat om het verschil mutatie en tijdelijke variatie, niet, indien men uit wil maken met mutatie of duurzame variatie te doen te hebben.

In het eerste geval zal bij een ééncelkultuur de nakomelingschap antwoord geven op de gestelde vraag, immers zal deze bij mutatie het beeld van de afwijkende moedercel herhalen, bij tijdelijke variatie weder tot den oorspronkelijken vorm terugvallen. In het tweede geval is het laatste niet aldus, maar doet de nakomelingschap, althans gedurende korteren of langeren tijd, zich voor als ware er mutatie in het spel, immers, zeker in de eerste tijden blijken de gewijzigde factoren ook in de nakomelingschap aanwezig, eerst later, hoe lang is niet te zeggen, treedt regressie op (b.v. gasloos tot gas).

Reeds Pasteur had ontdekt, dat het ziekmakend vermogen of de virulentie der pathogene kiemen sterk variabel is; het bleek immers mogelijk dit vermogen op te voeren, zoowel als op te heffen. Op dit feit baseerde hij zijn immunisatie-methodes b.v. tegen de hondsdolheid, op dit feit steunt dan ook de vaccinotherapie.

Dat men hier met een variatie te doen heeft wordt duidelijk, indien men bedenkt, dat het verschijnsel reversibel is, omdat het

mogelijk blijkt uit een virulenten vorm een avirulenten te maken en omgekeerd.

Toen in den loop der jaren op de broedplaten koloniën werden gevonden, die niet met den norm overeenkwamen, werd onder invloed der onderzoekingen op het gebied der erfelijkheid het begrip mutatie van de bacteriën ingevoerd (M. Neisser [17]) 1900, R. Massini [18]) 1907, R. Müller [19]) 1911, Beyerinck [20]) 1912, K. Baertlein [21]) 1912, Ph. Eisenberg [22]) 1914, e. a.).

Het is gebleken, dat de waargenomen verschijnselen niets met mutatie, met erfelijke veranderlijkheid der bacteriën te doen hebben. De meeste der onderzoekingen op het gebied der mutatie waren in hoofdzaak op den vorm der koloniën gericht. Waar ze op den vorm der bacteriën zelve gericht waren, daar rangschikken de onderzoekers de verschillende vormen meestal in een levenscyclus en viert de allotropie of autokinêsis hoogtij.

E. Almquist [23]) (1904) is wel een der eersten, die uit de verschijningsvormen der bacteriën een ontwikkelingscyclus heeft opgebouwd. Hij wees er op, dat het in kulturen van typhus-bacteriën en cholera-vibrionen gelukt, nevens den normalen vorm tevens korrel- of kogelvormen waar te nemen, welke volgens hem conidiën of fructificatie-vormen waren, waaruit zich òf weder korrels òf normale vormen ontwikkelden. Bij hem speelt de geslachtelijke vermeerdering, waarbij sporangiën ontstaan, een voorname rol, benevens de filtreerbare vormen. Vermeldenswaard is, dat hij groote (diploïde) en kleine (haploïde) kernen, tevens, dat hij kruising van bacteriën b.v. van dysenterie en typhus meent geconstateerd te hebben.

Ook F. Fuhrmann [24]) (1906) acht zich gerechtigd een regelmatige opeenvolging van verschillende stadia als een bestaanden levenscyclus te aanvaarden, welke door uitwendige omstandigheden wel gradueel, echter niet essentieel kan worden verstoord; ook in zìjn beschouwing wordt van optreden van den korrelvorm gewag gemaakt.

E. C. Hort [25]) (1917) beschreef een levenscyclus der bacteriën, waarin een onzichtbaar of bijna onzichtbaar stadium aanwezig zou zijn, in hetwelk de bacteriën door bacterie-filters heen zouden kunnen gaan. Een zeer ingewikkelden levenskringloop bij bacteriën heeft de Amerikaan Löhnis [26]) (1910, '22, '23) opgesteld op grond van de bestaande litteratuur en van eigen

onderzoekingen, voornamelijk aan Azotobacter verricht, echter volgens zijn aangifte bij alle bacteriën gezien. Alle door hem waargenomen bacteriën leven volgens hem afwisselend in een georganiseerd en in een amorph stadium (symplasma).

In het amorphe stadium is een versmelten mogelijk van celwand en celinhoud (conjugatie) of een versmelten van de celinhouden van meerdere cellen, die hun celwanden achter laten.

Daarna ontwikkelen zich in deze versmolten cellen „regeneratieve lichamen", welke later tot normale cellen kunnen uitgroeien.

Volgens Löhnis vermeerderen zich de bacteriën niet alleen door deeling, maar ook door „reproductieve organen", welke gonidiën kunnen zijn — welke ten deele filtreerbaar zijn — of regeneratieve lichamen, endosporen, arthrosporen of microcysten (afstervende cellen).

Löhnis meende voorts een vertakking van bacteriedraden gezien te hebben, tevens neemt hij filtreerbare vormen aan.

Naast Löhnis is wel Enderlein [27]) de meest bekende aanhanger der bacteriëncyclogenie.

Hij trachtte een levenscyclus samen te stellen en dezen te verduidelijken door het invoeren van tallooze, vreemde woorden, die op zich zelf reeds een speciale studie noodzakelijk maken. Ook bij hem treffen we geslachtelijk voortplanten der bacteriën aan (foecundatie van een oïet door een spermiet).

Ook in R. R. Mellon's [28]) levenscyclus treffen wij sexueele voortplanting aan benevens een onzichtbaar en filtreerbaar stadium. De virulentie zou afhangen van het stadium, waarin de bacteriën zich bevinden. Evenzoo verandert het serologisch gedrag en de gramkleuring met de verschillende stadia.

Tot de aanhangers der bacteriëncyclogenie is ook Hadley [29]) te rekenen, die tevens steunt op de onderzoekingen van Arkwright [30]) (1921) en de Kruif [31]) (1921).

Deze bacteriologen hebben het begrip dissociatie ingevoerd, waaronder zij verstaan het plotseling optreden van een afwijkend type uit den grondvorm. Dit verschijnsel is als een variatie op te vatten, omdat het steeds gelukt den eenen vorm in den anderen om te zetten.

In hoofdzaak komen de resultaten der laatste onderzoekers overeen met die verkregen door Weil-Felix [32]), n.l. dat bij het uitzaaien van oude bouillonkulturen op agar-agar- of gelatineplaten soms twee verschillende kolonie-vormen ontstaan, waar-

van de eene een verhevene, ronde, regelmatige gedaante met glad, glanzend oppervlak en een doorschijnend, zeer fijn gegranuleerd, eenigszins vochtig uiterlijk bezit, terwijl de andere meer vlak en plat groeiende uit onregelmatige, oneffene, grof gegranuleerde en droge koloniën bestaat.

Op grond van deze uiterlijke verschillen onderscheidde Arkwright het S- of „smooth" type en het R- of „rough" type.

Hij onderzocht dit verschijnsel voornamelijk aan vertegenwoordigers der Coli-typhus-dysenterie-groep, terwijl de Kruif ongeveer te zelfder tijd het zelfde verschijnsel opmerkte bij de Pasteurella-groep en Weil en Felix bij de Proteus-groep.

Dit verschijnsel is dus niet tot een bepaalde groep van bacteriën beperkt, maar schijnt van meer algemeenen aard te zijn.

Bij nader onderzoek is gebleken, dat deze in uiterlijk zoo verschillende koloniën uit organismen bestaan, welke bepaalde verschilpunten vertoonen, welke niet zoo zeer in morphologisch en physiologisch, als vooral in serologisch opzicht zich onderscheiden.

Morphologisch beschouwd, laat zich in het algemeen zeggen, dat de R-vormen doorgaans verkorte gedaante bezitten, dat bewegelijke soorten dikwijls onbewegelijk zijn, dat kapseldragende menigmaal zonder dit omhulsel uitgerust zijn.

Bovendien is gebleken, dat de S-vorm meestal virulent of toxisch is, resistent tegen de phagocytose, maar sterk onderhevig aan de inwerking van den bacteriophaag, niet auto-agglutinabel in physiologisch keukenzout is en diffuus groeit in bouillon, terwijl de R-vorm avirulent of zwak virulent is, gemakkelijk phagocyteerbaar, maar resistent tegen de inwerking van den bacteriophaag, auto-agglutinabel is in physiologisch keukenzout en korreligen groei in bouillon vertoont.

S-vormen worden in het algemeen gevonden tijdens ziekten, meest van acuten aard, R-vormen bij reconvalescenten en bacillendragers of bij ziekten met meer uitgesproken chronisch karakter.

Tevens kan men opmerken, dat in jonge kulturen, direct van den lijder afkomstig, meer S-, in oude laboratorium-kulturen meer R-vormen zijn aan te treffen.

In het algemeen maakt het den indruk, alsof de bacterie onder minder gunstige omstandigheden zich in een meer resistenten vorm terugtrekt.

De Kruif is van meening, dat de opmerkelijke virulentieverschillen, welke reeds zoolang de aandacht trokken, te verkla-

ren zouden zijn door aan te nemen, dat een bepaalde bacterie als zuivere S-vorm een bepaalde, maximale en constante virulentie bezit, in den R-vorm overgegaan, hare virulentie inboet, maar als gemengde kultuur, hetgeen de meeste onzer kulturen zijn, een uiteenloopende virulentie vertoont, afhankelijk van de onderlinge verhouding, waarin de beide vormen voorkomen: hoe meer S hoe virulenter, hoe meer R hoe minder virulent die kultuur is.

Hetgeen bij nader onderzoek wel onomstootelijk is komen vast te staan, is het feit, dat beide vormen of varianten een duidelijk verschil in antigeen-complex vertoonen; dit opvallend verschil is eigenlijk het essentiëele onderscheid, dat tusschen een S- en een R-vorm bestaat. Bij immunisatie met den S- en met den R-vorm ontstaan, ondanks het feit, dat men hier met één bepaald microorganisme te doen heeft, twee verschillende anti-sera.

Terwijl het ééne serum den S-vorm ook in hoogere verdunning agglutineert, is het andere op den R-vorm ingesteld. Bovendien is de wijze van agglutinatie verschillend, immers agglutineert het S-serum snel, maar grofkorrelig, het R-serum doet een fijnkorrelige agglutinatie totstandkomen in langeren tijd.

Bij nader onderzoek blijkt bovendien, dat het S-agglutineerend serum twee, het R-agglutineerend serum slechts één agglutinine bevat, waaruit weder volgt, dat het antigeen-complex van den eersten vorm samengestelder is, dan dat van den laatsten.

Men neemt thans aan, dat de bewegelijke of de gekapselde S-vorm een z.g. H-, nevens een O-agglutinogeen bevat, terwijl de R-vorm slechts een O-agglutinogene structuur zou bezitten.

Het H-agglutinine, dat onder invloed van het H-antigeen van den S-vorm ontstaat, schijnt in de genoemde voorbeelden in de zweepdraden respectievelijk in de kapsel gezocht te moeten worden, is op dien grond specifiek voor den bedoelden vorm. Het O-agglutinine zou dan ontstaan onder den invloed van het O-antigeen, waaronder men het lichaams- of somatische antigeen der bacterie verstaat en dus gemeenschappelijk aan den S- en R-vorm eigen zijn.

Men ziet dan ook, dat het R-agglutineerend serum niet alleen op den homologen, maar bovendien op den S-vorm een agglutineerenden invloed uitoefent, hetgeen verklaarbaar wordt, indien men overweegt, dat beide vormen een zelfde somatisch antigeen karakter, dus een overeenkomstigen bouw van het lichaamsprotoplasma

bezitten, waaruit weer hun geheel overeenstemmende biochemische eigenschappen volgen.

Het feit van het voorkomen van twee in wezen verschillende, maar oogenschijnlijk vrijwel overeenkomende vormen van één bepaalde bacteriesoort, is bewezen; men is in staat den eenen in den anderen vorm om te zetten, men heeft dus met variatie te doen en zou hier van een dimorphie kunnen spreken.

Een uitgesproken voorstander eener dimorphie der bacteriën, zij het dan ook in een geheel anderen zin, is wel Ph. Kuhn [33]) (1931), over wien in het volgende gedeelte uitvoeriger gesproken zal worden, doch van wien wij hier vermelden, dat hij bij alle bacteriën een dimorphie aanneemt, welke in een staaf- (z.g.n. B-vorm) en een coc-vorm (z.g.n. C-vorm) tot uiting komt, tevens, dat hij meent, dat bijzondere amoeboïdeachtige organismen z.g.n. pettenkoferiën met de bacteriën in symbiose leven en dat de bacteriophaag van d'Herelle met deze organismen identiek is.

De koloniën der B- en C-vormen zijn zeer verschillend.

De C-koloniën zijn zeer klein en identiek te verklaren met de door Hadley beschreven koloniën, die deze kolonievormen op gelijksoortige wijze als Kuhn wist te verkrijgen.

Het vraagstuk der allotropie of autokinesis der bacteriën zou zeker onvolledig behandeld zijn, indien niet het probleem van het filtreerbare stadium tevens werd behandeld, omdat dit eveneens tot een dimorphie zou kunnen doen besluiten.

Het ontstaan der febris exanthematicus heeft vele natuuronderzoekers bezig gehouden, totdat eindelijk bleek, dat als oorzaak dient te worden aangenomen een vertegenwoordiger uit de groep der Rickettsiae, microörganismen, waarvan het nog moeilijk valt den eigenlijken aard vast te stellen, maar welke de meeste overeenkomst vertoonen met de bacteriën.

Men heeft deze organismen voornamelijk bij insecten gevonden, zij bleken in enkele bijzondere gevallen pathogene eigenschappen voor mensch en dier te bezitten.

Het zijn in den regel kleine, elliptische staafjes, die onbewegelijk en gram-negatief zijn. De meeste soorten zijn niet op de bekende voedingsbodems te kweeken.

Als oorzaak nu van den vlektyphus heeft men ontdekt Rickettsia prowazecki, waardoor bij menschen koorts, gepaard met zenuwstoornissen en uitslag, optreedt.

Het feit echter, dat het bloed van aan vlek-typhus lijdende

patiënten in staat blijkt, ook in hoogere verdunning, agglutineerend op een bepaalden Proteus-stam te werken, was oorzaak, dat men toch aan dit organisme zijn aandacht besteedde.

Echter bleek bij dierproeven duidelijk, dat nimmer deze Proteus-bacterie in staat was het ziektebeeld te voorschijn te roepen, dat kenmerkend voor de Rickettsia-aandoening is.

Immuniteit werd slechts verkregen onder invloed van de Rickettsia, nimmer onder dien van de Proteus.

Friedberger en Schiff [34]) konden door immunisatieproeven met organen van aan vlektyphus lijdende menschen en dieren agglutininen opwekken ten opzichte van de Proteus-bacterie, terwijl bovendien bleek, dat hun proefdieren door de behandeling immuun waren geworden tegenover de infectie met den gebruikten Proteus-stam.

Zij meenden dus in de oorspronkelijke organen de aanwezigheid te moeten aannemen van een antigeen, dat met de Proteus-bacterie overeenstemt of, zooals zij meer geneigd waren te aanvaarden, daarmede identiek zou zijn. Zij verdedigden dan ook op grond hiervan de opvatting, dat het vlektyphusvirus niet anders kan zijn, dat een bijzondere vorm van den gebruikten stam (X 19) van de Proteus-bacterie.

Daar zij echter nimmer uit het bloed van de geinfecteerde caviae Proteus-bacteriën konden isoleeren, spraken zij de veronderstelling uit, dat deze organismen in een voor ons onzichtbaren vorm aanwezig waren.

Deze vorm zou niet alleen onzichtbaar, doch bovendien oncultiveerbaar zijn.

In aansluiting met deze gevolgtrekking komt Friedberger tot het besluit, dat ook andere bacteriën in dien onzichtbaren, oncultiveerbaren vorm zullen kunnen overgaan.

Friedberger en Meissner [35]) onderzochten in aansluiting met deze opvatting het voorkomen van een onzichtbaren en onkweekbaren vorm bij den typhus-bacil en meenden dezen ook na dier-passage gevonden te hebben. Naast deze meening ontstond die, welke de omzetting van bacterie tot filtreerbaar virus toeschreef aan de inwerking van den bacteriophaag.

Deze opvatting grondvestte men op het feit, dat men in het filtraat van door de inwerking van den bacteriophaag geheel gelyseerde culturen weder ontwikkeling van de oorspronkelijke bac-

terie zag, men meende dus, dat deze in filtreerbaren vorm aanwezig was.

P. Hauduroy [36]), die dit verschijnsel uitvoerig bij de dysenterie-bacterie heeft nagegaan en beschreven, denkt, dat de bacterie onder invloed van den bacteriophaag in kleine deeltjes uiteenvalt, welke het filter kunnen passeeren. Uit deze deeltjes ontwikkelen zich korrels en daaruit eindelijk weer staven.

Het zijn momenteel een groot aantal verschillende bacteriën, waarvan men meent den filtreerbaren vorm opgespoord te hebben.

Genoemd mogen worden de Coli-typhus-dysenteriegroep, meningococcus, streptococcen, staphylococcen, miltvuurbacil, diphtheriebacterie, cholera-vibrio e. a., maar het meest heeft ongetwijfeld de ontdekking van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil de aandacht getrokken.

Reeds in 1910 vestigde de Braziliaansche onderzoeker A. Fontès [37]) de meening, dat in de filtraten van tuberculeus materiaal de smetstof aanwezig moest zijn, omdat het hem gelukte door enting van deze filtraten in de organen van zijn proefdieren zuurvaste staafjes en korrels aan te toonen.

In 1925 eerst wordt zijne waarneming bevestigd door A. Vaudremer [38]), aan wien het gelukt is, in filtraten van korrelrijke kulturen de aanwezigheid te demonstreeren van atypische, niet zuurvaste vormen van den tuberkelbacil.

Het vraagstuk trad echter eerst in de volle belangstelling, toen niemand minder dan A. Calmette [39]) en zijn leerlingen zich voor het bestaan van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil uitspraken.

Fontès was op het denkbeeld gekomen tuberculeus materiaal aan een kaarsfiltratie te onderwerpen, omdat hij aan de door H. Much [40]) beschreven granula, welke voor een bijzonderen vorm van den tuberkelbacil werden gehouden, filtreerbaarheid toekende.

J. C. H. Broek [41]) gelukte het uit het met behulp van den micromanipulator van Schouten [42]) geïsoleerde granulum den zuurvasten bacil te zien ontstaan.

Het is voornamelijk J. Valtis [43]), die zich in het „Institut Pasteur" te Parijs met de studie van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil heeft bezig gehouden.

Door tuberculeus materiaal of jonge kulturen van tuberkelbacillen door Chamberland-kaarsen te filtreeren en het filtraat bij caviae

in te spuiten, constateerde hij na veertien dagen zwelling der regionaire lymphklieren, welke na eenigen tijd weder verdween. Na twee tot vier dagen of na drie weken na de inspuiting (subcutaan), slaagde hij er tevens in, om in de regionaire lymphklieren de aanwezigheid van enkele zuurvaste staafjes aan te toonen.

Het gelukte bovendien, met het filtraat van de door het filtreerbare virus besmette klieren der caviae weder andere caviae te infecteeren, waarbij wel zuurvaste staafjes, echter geen typische tuberculeuse afwijkingen der organen werden waargenomen.

Ging men aldus in serie verder, dan gelukte het ook bij latere dierpassage een weder optreden van den vol virulenten vorm van den tuberkelbacil, gepaard met de typische en kenmerkende afwijkingen in de organen, vast te stellen.

Deze onderzoekingen hebben het bestaan van een filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil in hooge mate waarschijnlijk gemaakt.

Hiermede wordt echter niet gezegd, dat daarmede nu ook het bestaan van dien vorm bij andere bacteriën bewezen zou zijn.

In 't geval van den tuberkelbacil heeft men dus met een uitgebreide allotropie autokinêsis te maken, waarbij staaf en korrel en filtreerbaar virus met elkaar kunnen afwisselen.

Het probleem van de allotropie of autokinesis speelt dus heden ten dage nog een groote rol, al heeft het onder invloed van de opvattingen van Cohn en Koch gedurende eenigen tijd aan belang en belangstelling sterk ingeboet. In het tegenwoordige stadium der bacteriologie trekt het weder de aandacht, omdat van verschillende zijden zeer uiteenloopende feiten zijn ontdekt, welke opnieuw de vraag naar de veelvormigheid der bacteriën aan de orde stellen.

HOOFDSTUK II.

METHODIEK.

Voor het aanleggen van ééncelkulturen hebben wij gebruik gemaakt van den micromanipulator volgens Schouten, welk apparaat mede door zijn eenvoud onzes inziens verre te verkiezen is boven de later in gebruik gekomen toestellen.

De micromanipulator volgens Schouten (1899) stelt ons in staat microörganismen en fragmenten daarvan te isoleeren, microoperatie's uit te voeren enz. en is in zijn huidigen vorm volmaakt te noemen. Het toestel bestaat uit een ijzeren grondplaat, op welker uiteinden twee statieven geplaatst zijn, waarin de instrumenten, welke bij het isoleeren van de bacteriën noodig zijn, bevestigd worden. Tusschen deze twee statieven plaatst men het microscoop op een zich op de grondplaat bevindende stalen plaat, welke plaat door haar veerkracht ons in staat stelt, uiterst kleine bewegingen van het microscoop gedurende den arbeid te bewerkstelligen.

Met behulp van glazen instrumenten — oogjes, puntnaalden en micro-mesjes — kan men gemakkelijk onder het microscoop alle gewenschte manipulaties verrichten als b.v. het isoleeren of het doorsnijden van bacteriën.

De glazen naalden bevinden zich in naaldhouders (M), welke, bij gebruik van hetzelfde microscoop, steeds op dezelfde hoogte in de armen (L) van de statieven kunnen bevestigd worden.

Elke aldus bevestigde naald kan nu door drie schroeven (A, B en C) — welke na eenige oefening gemakkelijk, met één hand rustend naast het apparaat, bediend kunnen worden — in elken gewenschten stand gebracht worden.

De schroef A regelt bewegingen naar links of rechts in het horizontale vlak, schroef B bewegingen in hetzelfde vlak, loodrecht op die van A.

De schroef C regelt bewegingen naar boven of naar beneden in het verticale vlak.

Plotselinge bewegingen in het verticale vlak kunnen worden uitgevoerd met behulp van het staafje F, dat door bewegen naar boven den arm L, welke zijn steunpunt heeft in K, oplicht.

Op deze wijze isoleert men b.v. snelzwemmende protozoën.

Ook voor het schoonspoelen van de glazen naalden, indien dit onder het gebruik noodig mocht zijn, maakt men gebruik van deze manipulatie.

Men brengt dan met behulp der schroeven A, B en C het uiteinde van de naald in een druppeltje steriel water, licht het staafje F op, waardoor het oogje snel uit den druppel wordt verwijderd, en laat het daarna weer zakken, zoodat het weer in den druppel komt. Deze beweging herhaalt men tot het uiteinde schoon is, wat geconstateerd kan worden o.a. door er druppeltjes mede af te zetten, welke dan volkomen helder zijn.

Alle manipulaties worden uitgevoerd in den hangenden druppel in een „vochtige kamer" — isoleerkamer — welke zich tusschen de klemmen der kruistafel op de objecttafel van het microscoop bevindt.

Deze isoleerkamer is opgebouwd uit een dik voorwerpglas, dat als bodem dienst doet, waarop twee glazen balkjes, drie m.m. hoog, gekit zijn, welke de twee zijwanden vormen. Op elk van deze balkjes zijn twee mica lamellen zoodanig vastgekit, dat deze nog ongeveer vijf m.m. ruimte aan elken kant vrij laten. Over deze vrije ruimten worden nu dwarsliggertjes van mica gelegd, welke dezelfde dikte hebben als de opgekitte lamellen. Aldus ontstaat een plat vierkant vlak, waarvan in het midden een vierkante ruimte vrijblijft van 14×14 m.m. Onder de mica dwarsliggers brengt men nu een halfvloeibaar mengsel van paraffineolie en vaseline, zóó dat deze twee zijwanden geheel dicht zijn. Ter afsluiting van de bovenzijde der kamer gebruikt men een voorwerpglaasje van 18×18×0,18 m.m., dat met een half vast mengsel van paraffine solidum en vaseline wordt vastgelegd. Men brengt eerst de naald in het kamertje, daarna kan men den dwarsligger plaatsen en de opening daaronder dichtmaken.

Wil men nu ééncelkulturen verkrijgen, dan gaat men achtereenvolgens aldus te werk:

1. Men praepareert het dekglas.
2. Men brengt de gewenschte steriel gemaakte naald in de isoleerkamer.
3. Men sluit de kamer aan de zijkanten af op de hierboven aangegeven wijze, en legt het gepraepareerde dekglas er op.
4. Men isoleert de bacteriën.
5. Men kweekt daarna in een broedkamertje.

6. Men ent de ontstane kultuur af in macro.

1. Het praepareeren van het dekglas.

Volkomen gave en vlakke dekglaasjes, welke een dikte hebben van niet meer dan 0,18 m.m. worden ontvet door ze in een bekerglas met zeepoplossing te koken, daarna af te spoelen achtereenvolgens met sterk salpeterzuur, water en gedestilleerd water, om ze ten slotte te bewaren in alcohol.

Het dekglaasje wordt gedroogd, op een donkeren ondergrond gelegd, ingewreven met een kleine hoeveelheid trilaurine, daarna ontdaan van het overtollige trilaurine en schoon gepoetst met een driedubbel gevouwen linnen doekje, en vervolgens in een vijf c.m. hooge, alleen aan den top lichtgevende vlam van een Bunsenbrander geflambeerd.

Nu wordt het dekglaasje, met de ingevette zijde naar beneden gekeerd, gelegd op een metalen prepareer-tafeltje, waarin zich in het midden een vierkant gat (14×14 m.m.) bevindt, en dat van onder wordt afgesloten door een met vet bestreken glazen plaatje. Tegen de onderzijde van het dekglaasje zet men nu met een geflambeerd platina oogje van pl.m. 1,5 m.m. diameter negen druppeltjes af in drie rijen van drie, b.v. zes druppeltjes steriele alkalische bouillon-gelatine, twee druppeltjes steriele physiologische keukenzout-oplossing en één druppeltje van een zoo jong mogelijke meestal vier tot zestien uur oude-bacterie-kultuur in alkalischen bouillon of peptonwater. Na het plaatsen der druppeltjes brengt men vlug weer het glazen afsluitplaatje onder tegen het tafeltje om verdamping der druppeltjes tegen te gaan.

2. Het steriliseeren en plaatsen van de naald.

Na het praepareeren van het dekglas gaat men over tot het plaatsen der naald.

De isoleerkamer is reeds tusschen de klemmen der kruistafel geplaatst en in het midden van de objecttafel gebracht. Eèn zijde, b.v. de rechterzijde der isoleerkamer, is reeds voorzien van een dwarsligger en de opening daaronder dichtgemaakt.

Het uiterste einde van de glazen oognaald wordt nu in geconcentreerd zwavelzuur gedompeld, daarna in sterke ammonia en ten slotte in steriele physiologische keukenzout-oplossing.

Direct daarna wordt het steriele instrument in de isoleerkamer

gebracht en met zwakke vergrooting (80 ×) in het midden van het gezichtsveld geplaatst.

3. Het sluiten der isoleerkamer.

Het nog ontbrekende dwarsliggertje wordt nu aan de linkerzijde geplaatst en de ontstane opening dicht gemaakt. De steel der naald bevindt zich dus in het afsluitmiddel onder den dwarsligger en kan dus daardoorheen naar alle zijden bewogen worden, zonder dat er een opening ontstaat. De bewegingen der naald worden, door de half-vloeibare olie niet geremd; ongewenschte trillingen worden erdoor gedempt.

Het oogje der naald wordt nu zoover mogelijk naar beneden gedraaid, waarna men het gepraepareerde dekglaasje van het praepareer-tafeltje neemt en op de isoleerkamer brengt, waarvan de bovenranden van te voren reeds voorzien zijn van vaseline.

Het dekglaasje wordt nu voorzichtig aangedrukt, tot er geen luchtblaasjes in de vaseline meer te zien zijn en het dus luchtdicht is afgesloten van de omgeving.

4. Het isoleeren van een bacterie.

Door verschuiven van het microscoop op de bovengenoemde metalen plaat en daarna met behulp der schroeven A, B en C wordt de naald (met zwakke vergrooting) dicht bij een druppeltje physiologische keukenzout-oplossing gebracht, waarvan de rand ongeveer in het midden van het gezichtsveld is geplaatst.

Met behulp der schroef A, draait men nu de naald in dezen druppel, den „spoeldruppel", en spoelt haar nogmaals schoon door gebruik te maken van de snelle bewegingen, die door middel van het staafje F verricht kunnen worden. De naald wordt dan weer terug gedraaid met schroef A en nu bijna tegen het glas geplaatst, in het midden van het gezichtsveld. De zwakke vergrooting wordt nu verwisseld voor 1/16 olieimmersie (pl.m. 1000 vergrooting).

Het gezichtsveld ziet er nu uit als bezaaid met heele kleine condensdruppeltjes, welke alle, doordat ze zich bevinden op een zeer dun laagje trilaurine, scherp omrand zijn en goede diensten verrichten bij het bepalen der ligging van het dekglas.

Zonder trilaurine zouden ook de afgezette druppeltjes uitvloeien en dan geen scherpen rand meer hebben, wat het manipuleeren zeer zou bemoeilijken, daar het dan heel moeilijk is deze druppels terug te vinden.

Indien het diafragma bijna dicht is, ziet men nu, indien de naald werkelijk in het midden van het gezichtsveld is geplaatst, de donkere schaduw der naald. Men kan haar plaats desgewenscht nog corrigeeren. Nu opent men het diafragma en draait de schroef C naar beneden, waardoor het oogje naar boven komt en ten slotte juist het glas raakt. Men draait nu de schroef C naar boven, waardoor het oogje het glas zal loslaten en een druppeltje zal achter laten.

Dit druppeltje behoort, indien de naald en de physiologische keukenzout-oplossing steriel waren, leeg te zijn!

Door verschuiven der isoleerkamer met behulp der kruistafel kan men deze manipulaties op andere plaatsen nog eenige malen herhalen tot het oogje geen druppeltjes meer achterlaat. Het oogje is dan leeg. Het leege oogje brengt men nu naar het druppeltje, waarin zich de bacteriën bevinden en dompelt het met behulp van de schroef C er even in; daarna zet men op de juist beschrevene wijze een reeks druppeltjes af, totdat het oogje leeg is.

Het eerst afgezette druppeltje zal, indien we van een vollen vischdruppel zijn uitgegaan, vele bacteriën bevatten b.v. dertig. Het volgende echter reeds minder, totdat er zich in het laatste druppeltje slechts weinige zullen bevinden. Indien men gelukkig is, of ook indien men van een tamelijk leegen vischdruppel is uitgegaan, zal men druppeltjes met een enkele bacterie afzetten.

Heeft men echter meerdere bacteriën in één druppeltje, dan beschouwt men dit druppeltje weer als vischdruppel en gaat men als boven te werk, na echter eerst de oognaald goed gespoeld te hebben in den spoeldruppel, zoodat ze geen bacteriën meer bevat, en haar gevuld te hebben met psysiologische keukenzout-oplossing.

Heeft men een druppeltje, waarin zich slechts één enkele bacterie bevindt, dan neemt men deze in het opnieuw gespoelde en gevulde oogje op en zet haar af vlak bij den rand van een alkalische-bouillon-gelatine druppeltje.

Met behulp van een glazen puntnaald kan men nu een verbindingskanaaltje tusschen de gelatine en het druppeltje maken, waardoor het druppeltje met zijn inhoud door de gelatine druppel wordt opgezogen. De bacterie bevindt zich dan op den rand van den gelatinedruppel.

Óók kan men met de puntnaald de bacterie er uit visschen, die door adhaesie aan de naald blijft plakken, en haar overbrengen naar een plaats op de gelatine, welke men wenscht.

Een andere methode is deze, dat men het oogje, waarin zich de bacterie bevindt, plaatst tegen het dekglas, daarna iets naar beneden brengt zoodat zich een vloeistof-zuil bevindt tusschen het oogje en het dekglas, waarna men door draaien aan de schroef A het vloeistofzuiltje, waarin zich de bacterie bevindt, schuift over de gelatine, of door verschuiven van de kruistafel den gelatinedruppel door het vloeistofzuiltje schuift tusschen het oogje en het dekglas.

De gelatine zal dan de vloeistof opzuigen en de bacterie zal dan op den gelatinedruppel nabij den rand komen te liggen.

5. Het kweeken.

Heeft men alle druppels op deze wijze voorzien van één bacterie, dan brengt men het dekglaasje over op een broedkamertje, dat bestaat uit een dik voorwerpglaasje, waarop een vernikkeld koperen vierkant blokje van 20×20×4 m.m. gekit is waarin een vierkantje van 14×14 m.m. is uitgespaard.

In een der zijwanden van dit kamertje bevindt zich een klein kanaaltje (0,5 m.m.), dat door paraffine liquidum aan beide zijden is afgesloten en dienst doet als druk-regulator.

Het dekglaasje wordt op dezelfde wijze als op de isoleerkamer geschiedde, bevestigd en bij de gewenschte temperatuur bebroed.

6. De ééncelkultuur in macro.

Is de ééncel aangeslagen en uitgegroeid tot een kolonie, dan kan men van haar een kultuur in macro aanleggen.

Men neemt het dekglaasje dan van het broedkamertje af en plaatst dit op het praepareertafeltje met de druppeltjes naar beneden, waarna men met behulp van een platina schepje den gelatinedruppel met de kolonie er op, van het dekglaasje neemt en in een kultuurbuis overbrengt of men vult een klein platina oogje (0,5 m.m. diameter) met steriele physiologische keukenzout-oplossing of peptonwater en stipt hiermede de kolonie aan, waardoor in het oogje bacteriën komen.

Met dit oogje ent men nu in een gewone kultuurbuis.

De glazen naalden kunnen jaren lang dienst doen, dit is een belangrijk voordeel van den micromanipulator van Schouten in vergelijking met de micromanipulatoren, die later gebouwd zijn en die pipetten noodig hebben, die bij elke proef vernieuwd moeten worden.

Gebruikt men een naald niet langer, dan kan men de isoleerkamer, waarin zij zich nog onder het microscoop bevindt afsluiten met een dekglaasje, dat van te voren geflambeerd is, en aldus de naald steriel bewaren.

Behoeft men langeren tijd niet te manipuleeren of heeft men een andere naald noodig, dan neemt men na het wegnemen van den dwarsligger de naald uit den arm van het statief en veegt met een watje de grootste hoeveelheid olie van den steel der naald af.

Daarna dompelt men de naald in aether, waarin de olie oplost en plaatst men haar in de daarvoor bestemde naalddoos.

Het snijden van een bacterie geschiedt met een micromesje, dat bestaat uit een glazen puntnaald, welke aan het uiteinde een scherpen kant heeft, welke ontstaat door de naald na verwarming plotseling af te koelen, waardoor zij springt, zoodat aan het uiteinde een scherpe kant ontstaat, welke ons in staat stelt de naald te gebruiken als mes.

Het micromesje wordt precies onder de bacterie gebracht op de plaats waar men haar wil doorsnijden; door even zacht te drukken tegen de micrometerschroef van het microscoop (dat immers op een veerende metalen plaat staat, welke slechts enkele μ 's doorbuigt) drukt men de bacterie op het mesje; heft men den druk op, dan gaat de bacterie weer naar boven en blijkt doorgesneden te zijn.

Als lichtbron gebruiken wij een Philips Argenta lamp van 200 kaars. Tusschen den spiegel van het microscoop en de lamp plaatst men den bekenden glazen bol van 3½ L. inhoud gevuld met verdunde kaliumbichromaat-oplossing, 1 gr. op 3½ L., welke de warmte- en ultraviolette stralen absorbeert en een voor het oog prettig, geel licht doorlaat.

Voor het rustig manipuleeren is het zeer aan te bevelen gebruik te maken van een binoculair microscoop.

De voedingsbodems te gebruiken voor het afzetten van de druppeltjes, moeten glashelder zijn, zoo noodig door kaars gefiltreerd.

HOOFDSTUK III.

DE HOMOGENITEIT DER REINKULTUREN.

Van het allergrootste belang voor de bacteriologie is het, te weten of men werkelijk met een reinkultuur te doen heeft. De plaatmethode volgens Koch voor het verkrijgen van reinkulturen schijnt niet steeds gunstig te dien opzichte beoordeeld te worden. Als voorbeeld moge dienen, dat het Ph. Lasseur eerst na dertien overentingen gelukte B. Le Monnieri zuiver te krijgen of, dat het M. Bidzinsky eerst na twaalf overentingen gelukte een coc van een pigmentvormende bacterie te scheiden.

Slechts indien men van één enkele cel uitgaat, zal men in staat zijn een werkelijke reinkultuur te verkrijgen.

Alleen onderzoekingen aan absolute reinkulturen, zooals O. Richter [50]) ze noemt, hebben waarde bij de bestudeering der veranderlijkheid (allotropie) van bacteriën.

Wil men nagaan hoe een bepaalde bacterie zich in een kultuur onder bepaalde omstandigheden gedraagt, of zij eigenschappen verliest of er bij krijgt, of haar vorm zich al of niet verandert enz., dan is het vooraf noodig te weten of alle in die kultuur aanwezige bacteriën, voordat zich die bepaalde omstandigheden voordeden, gelijk in vorm en eigenschappen waren, daar, indien dit niet het geval mocht zijn, de interpretatie der gevonden feiten op groote moeilijkheden zou kunnen stuiten.

Met andere woorden: men zou zich kunnen afvragen, is een reinkultuur een populatie of een zuivere lijn, in de populatie aannemend nevens een op den voorgrond tredend gemiddeld type (grondtype) meer of minder daarvan afwijkende — en + varianten; in de zuivere lijn zouden alle organismen elkander gelijk zijn.

Vele onderzoekers zijn van meening, dat een reinkultuur een mengsel is van verschillende zuivere lijnen, een populatie, dat zij dus niet als volkomen homogeen zou zijn te beschouwen.

Tot degenen, die haar als niet homogeen beschouwen, behooren

	B. coli 1.	B. coli 12.	B. coli 19.	B. coli 24.	B. coli 32.	B. coli 65.	B. coli J.	B. coli Pat.	B. coli B.	B. coli C.	B. dys. Shiga.	B. paratyphus B.	B. proteus B.	B. pneumoniae S.	B. pneumoniae R.
Arabinose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	z		+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	—	z		+	+
Rhammose . . .											~			+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	z	+	+	+
Fructose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	z	+	+	+
Mannose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	z		+	+
Galactose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	z		+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	z	+	z	z	z	—	+	+
Saccharose . . .	~	~	—	—	—	—	z	—	—	z	—	—	—	+	+
Lactose	+	+	+	—	+	~	+	—	+	z	—	—	—	+	+
Trehalose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+		z			—	+
Raffinose . . .	—	—	—	—	—	~	+	—	—	—	—	—		+	+
Glycerine . . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+	z	z	z		+	+
Erythriet . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	~		—	~
Adoniet										—	—			+	+
Manniet. . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	—	z	—	+	+
Dulciet	+	—	—	~	+	—	+	+	+	~	—	z	—	—	—
Sorbiet	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	—	z	—	+	+
Pyrodruivenz. .	+	+	+	+	+	~	+	+	+	z	—	–			
Salicine		—	—	+		+	+	+	+		—				
Citraat (Koser) .			+	—		+	—	—	~		—			+	+
Urinezuur (Koser)			+	+		+	+	+	+		+				
Indol			—	+		+	+	+	+				—	—	—
V.P. methylrood			+	+		+	+	+	+					+	+
V.P. Eosine . .			—	—		—	—	—	—					+	+
Gelatine . . .			~	—		—	—	~	—				+	—	—

natuurlijk alle onderzoekers, die een of anderen levenscyclus aanvaarden.

Om nu na te gaan, of een kultuur al dan niet homogeen is, werd als volgt te werk gegaan.

Een op agarplaat geheel geïsoleerd liggende kolonie werd geënt in alkalischen bouillon of peptonwater.

Uit deze kultuur, welke een ouderdom had van 4—16 uur, werden 25 cellen geïsoleerd, welke op de gelatinedruppeltjes bij 22 graden Celsius tot koloniën werden gekweekt, welke koloniën daarna afgeënt werden in alkalischen bouillon of peptonwater.

Van deze laatste kulturen — alle dus absolute reinkulturen in den zin van O. Richter — werd daarna bestudeerd het fermentatief vermogen ten opzichte van verschillende stoffen zooals pentieten, hexieten, pentosen, hexosen, glucosiden enz. en voorts eenige andere eigenschappen, zooals indolvorming uit peptonwater, stremming van melk, de vorming van methylacetylcarbinol uit glucose en de vervloeiïng van gelatine.

In tabel I zijn deze eigenschappen verzameld.

Het bleek nu, dat al deze eigenschappen bij alle onderzochte bacteriesoorten en voor alle 25 ééncelkulturen volkomen gelijk waren en tevens gelijk aan die der oorspronkelijke uitgangskultuur.

Wij zijn ons wel bewust, dat 25 cellen ten opzichte van het aantal in een 4—16 uur oude kultuur voorkomende een klein aantal is, echter dient men niet te vergeten, dat het experiment nauwelijks zal toelaten, dat één persoon over een grooter aantal zal kunnen beschikken. Niet elke cel slaat aan en ten slotte zal het menschelijk oog de groote inspanning hierbij vereischt niet langer kunnen verdragen. Wanneer men echter telkens weer 25 ééncelkulturen aanlegt zouden, indien er verschillen bestonden, deze te eeniger tijd moeten optreden.

Tot dat doel heb ik een bepaalden stam uitgekozen n.l. B. coli 65, waaruit 25 cellen werden geïsoleerd; na tot in macro te zijn gekweekt, werden uit 3 op deze wijze verkregen ééncelkulturen elk weer 25 cellen gevischt, die na tot in macro te zijn gekweekt dus 75 ééncelkulturen gaven; uit elke serie van 25 werden nu willekeurig 3 ééncelkulturen genomen en uit elke dezer weder 3 ééncelkulturen aangelegd.

Uit één van deze laatste werden nog eens 25 ééncelkulturen aangelegd en uit 2 dezer serie elk acht, uit één negen.

Paratyphus Kultuur No.	Na 2 uur op 37° C		Na 24 uur.	
	à Vue	Met de loupe	à Vue	Met de loupe
1	1 : 400	1 : 1600	1 : 12800	1 : 12800
2	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400
3	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
4	1 : 1000	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800
5	1 : 200	1 : 400	1 : 12800	1 : 12800
6	1 : —	1 : 200	1 : 6400	1 : 12800
7	1 : —	1 : 3200	1 : 12800	1 : 12800
8	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
9	1 : 1600	1 : 3200	1 : 12800	1 : 12800
10	1 : 3200	1 : 12800	1 ; 6400	1 : 12800
11	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
12	1 : 3200	1 : 3200	1 : 12800	1 : 12800
13	1 : 1500	1 : 1600	1 : 12800	1 : 12800
14	1 : —	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
15	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400
16	1 : 3200	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800
17	1 : —	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
18	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
19	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
20	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
21	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400
22	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400
23	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
24	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
25	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
26	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
27	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
28	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
29	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
30	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 6400
31	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
32	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800
33	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
34	1 : 6400	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800
Uitgangskultuur	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 12800

Uit elke serie dezer laatste drie series werden nu 2 ééncelkulturen uitgekozen om hieruit 3, en een derde ééncelkultuur uitgekozen, om hieruit 4 ééncelkulturen aan te leggen.

1

1 . . . . . 13 25

1 . . . 13 . . . 25 . . . 1 . . . 13 . . . 25 . . . 1 . . . 13 . . . 25

1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3

1 . . . . . 13 15

1 . . . 4 . . . 8 . . . 1 . . . 4 . . . 9 . . . 1 . . . 4 . . . 8

1 2 3 1 2 3 4 1 2 3 1 2 3 1 2 3 4 1 2 3 1 2 3 1 2 3 4 1 2 3

In het geheel verkreeg ik op deze wijze 207 ééncelkulturen, die op de eigenschappen als in tabel I voor B. coli 65 vermeld nagegaan, volkomen gelijk bleken te zijn met die van den uitgangsstam.

Dr. A. W. P o t, die mij zijn tijd en het vereischte serum welwillend afstond, waarvoor ik hem ook te dezer plaatse hartelijk dank zeg, maakte het mij mogelijk ook de antigene eigenschappen bij ééncelkulturen na te gaan. Tot dat doel heb ik 34 ééncelkulturen aangelegd van een paratyphusstam en wel een, die uit geen der suikers of meerwaardige alkoholen gas vormt.

Na bestudeering der biochemische eigenschappen, welke voor alle ééncelkulturen volkomen gelijk bleken te zijn, werden deze geagglutineerd door het homologe serum.

De agglutinatie werd bekeken na 2 en 24 uur, zoowel à vue als met de loupe.

De resultaten vindt men in tabel II, waaruit duidelijk blijkt, dat deze kulturen wat betreft hare antigene eigenschappen volkomen gelijk zijn.

Uit het volkomen gelijk zijn der biochemische en antigene eigenschappen meenen wij te mogen concludeeren, dat de reinkulturen, als door ons verkregen, homogeen te beschouwen zijn.

Tevens zou men de gevolgtrekking kunnen maken, dat de op agarplaten losliggende koloniën als volkomen reine koloniën zijn te beschouwen.

Voor bestudeering der veranderlijkheid van bacteriën komt het mij vooralsnog wenschelijk voor gebruik te maken van ééncelkulturen.

Uit den aard der zaak bracht de micromanipulatormethode met zich mede, dat ik tallooze malen in staat was de groei van een bacterie tot een kolonie en dus ook de deeling der bacteriën waar te nemen.

Van de door mij onderzochte bacteriën is er niet één, die zich niet deelt in een richting loodrecht op hare lengteas.

Gaat men uit van een staafvormige bacterie, dan zal deze, zoodra een bepaalde rustperiode van ongeveer twee tot acht uur, de zoogenaamde lagtime, voorbij is, gaan groeien. De bacterie wordt langer en dikker en na eenigen tijd neemt men ongeveer in het midden een streepje waar, dat door zijn grootere brekingsindex tegen de rest van de bacterie afsteekt. Dit is het tusschenschot, dat men eigenlijk eerst goed waarneemt, wanneer het reeds geheel gevormd is.

Dat een bacterie zich aan het deelen is, kan men naast het grooter worden der bacterie vaak vermoeden, doordat men op twee elkaar tegenoverliggende plaatsen ongeveer in het midden der bacterie kleine inbochtingen kan waarnemen.

Is de vorming der dochtercel tot stand gekomen, dan behoeft zij zich nog niet van de moedercel af te snoeren. Meestal ziet men, dat de twee bacteriën aan elkaar gehecht blijven. Bij het verdere verloop van het groeiproces is het meestal slechts één der beide bacteriën, welke zich verder gaat deelen; wanneer eenige deelingen van deze zijde tot stand zijn gekomen vangt ook de andere cel aan zich te deelen en heeft eerst dan de vermeerdering in twee richtingen plaats. Echter alle bacteriën blijven niet netjes achter elkaar gerangschikt. Door den groei in de lengterichting worden vele cellen van elkaar afgeschoven en komen steeds na eenigen tijd naast elkaar te liggen.

Waarschijnlijk speelt hierbij de vochtigheid der gelatine een rol en kunnen de bacteriën, vooral indien zij in het bezit van ciliën zijn, zich eenigszins verplaatsen. Op deze wijze ontstaan op vele plaatsen de mogelijkheid zich voort te planten. Zoo is het dan ook verklaarbaar, dat een kolonie zich na de eerste deelingen zoo ontzettend snel vermag uit te breiden. (Logarithmische phase).

Indien bij het verder groeien van het centrum der kolonie de nieuw ontstane bacteriën geen plaats meer kunnen vinden, doordat de oppervlakte reeds geheel bedekt is met bacteriën, worden zij uit de op het platte vlak liggende aaneengesloten bacteriemassa geschoven, hetgeen wij weten doordat zich op de reeds bestaande

laag een nieuwe laag bacteriën vormt. De kolonie kan zich op deze wijze pyramideachtig vergrooten.

Hoogstwaarschijnlijk door de vermeerdering der stofwisselingsproducten wordt de bacteriegroei geremd en de kolonie breidt zich niet verder uit.

Beschouwen wij één enkele bacterie, dan zien wij, uitgaande van den normalen staafvorm, dat deze in haar bestaan allereerst een vergrooten staafvorm doet zien en daarna bij deeling twee deelstukken, welke kleiner zijn dan de normale vorm. Deze vaak coccoïde vormen groeien dan weer uit tot de normale.

De opéénvolging dezer vormen noemt Lasseur „cycle evolutif" en zeer terecht; echter mag men deze opeenvolging niet verwarren met een levenscyclus, welke op de autokinêsis of allotropie berust. Het zijn niet anders dan groeiphasen der bacteriecel en dus niets bijzonders.

Deze verschillende vormen geven na isoleeren weer het aanschijn aan de „cycle evolutif" en welken vorm men ook uitvischt, biochemische en antigene eigenschappen blijken steeds gelijk te zijn.

Anders is het echter, wanneer een kultuur oud wordt, de concentratie der stofwisselingsproducten dus verhoogd wordt (een abnormale toestand dus), of indien kunstmatig het milieu veranderd wordt.

In dat geval kunnen er degeneratie- of involutievormen van de meest verschillende gedaante ontstaan, waarover in het volgende hoofdstuk gesproken zal worden.

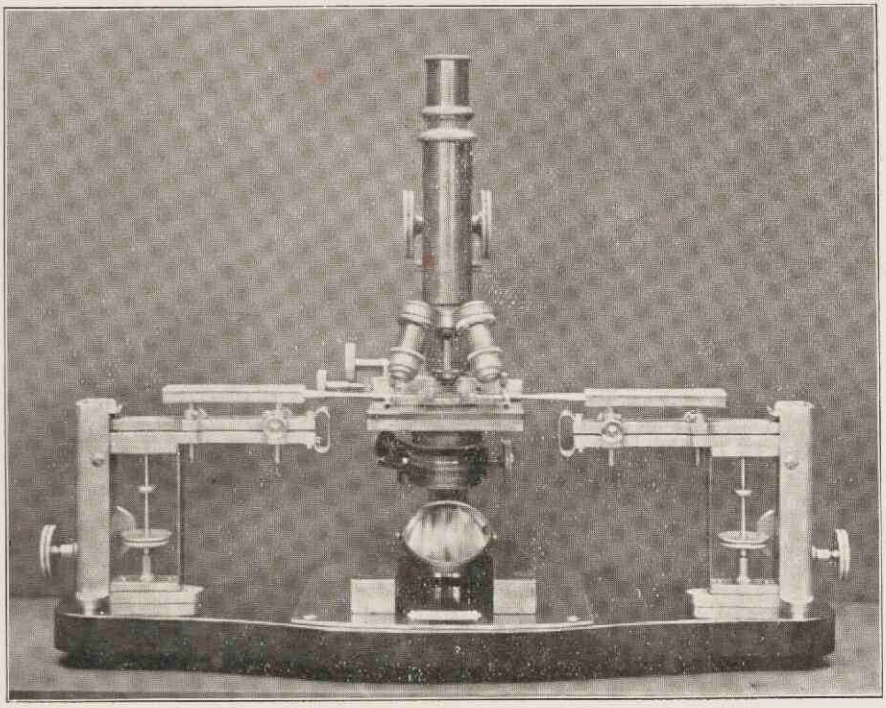

Fig. 1

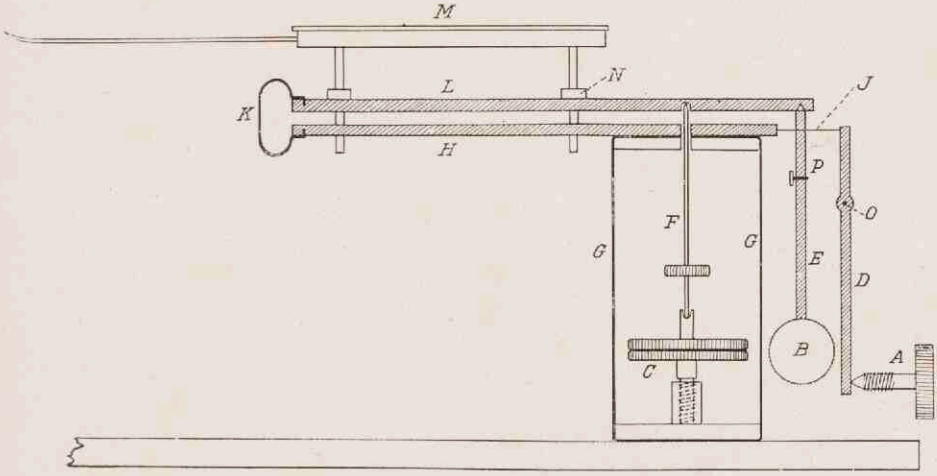

Fig. 2

HOOFDSTUK IV.

DE C-VORMEN EN PETTENKOFERIËN VAN PH. KUHN.

Van de verhandelingen, waarin de reinkulturen niet als zuiver beschouwd worden, troffen ons in het bijzonder die, welke Ph. Kuhn het licht deed zien.

Na afwijzing van de opvattingen van Cohn, Koch, von Nägeli, Almquist, Löhnis, Enderlein, Hadley, Arkwright en vele anderen, komt hij op grond van zijn onderzoekingen tot de conclusie, dat in onze reinkulturen nog andere organismen voorkomen, die echter geheel verschillend daarvan zijn, doch wier vormen tot nu toe tot de bacteriën gerekend werden. Voorts geeft hij aan, dat bij de bacteriën zelf een dimorphie voorkomt.

De ons bekende, normale staaf- en schroefvormen, welke door Kuhn B-vormen genoemd worden en welke vaak tot lange draden, F-vormen, soms ook tot schijnbare vertakkingen of dendritische D-vormen kunnen uitgroeien, zouden in cocvormen kunnen overgaan, welke in vele opzichten zeer resistent zijn en C-vormen genoemd worden.

Daar Kuhn in zijn laatste publicatie zegt: „Es sollte nicht bedeuten, dass die B-Form sich einfach abkugelt. Es tritt also keine Umwandlung eines Stäbchens in eine C-Form ein, es schnürt sich auch kein Teil eines Stäbchens als C-Form ab, ..." is het wel duidelijk, dat de C-vormen niet identiek zijn met de coccoïde vormen, welke in de „cycle évolutif" voorkomen. Kuhn verklaart de C-vormen identiek met de in de literatuur als metachromatische korrels, korrels van Ernst-Babes, poolkorrels en volutinekorrels beschreven vormen, terwijl bij den tuberkelbacil de C-vorm identiek is met het granulum van Much.

De C-vormen komen vooral tot stand, wanneer men kulturen in bepaalde, ongunstige omstandigheden brengt, voorts wanneer bacteriën met pettenkoferiën op agar-platen met lithiumchloridetoevoeging groeien, eveneens op platen, waarop zich het phenomeen van d'Herelle (bacteriophagie) afspeelt. Door afenten van los-

liggende koloniën verkrijgt men reinkulturen der C-vormen. Sporendragers zijn in staat om naast sporen nog C-vormen voort te brengen. Het gemakkelijkst verkrijgt men C-vormen, indien men aan bacteriënkulturen chemicaliën toevoegt, vooral ammoniak en phenol.

Om de C-vormen door middel van ammoniak te verkrijgen gaat men als volgt te werk: drie buisjes elk met vijf cm^3 sterielen bouillon worden met weinig bacteriemateriaal geënt en in de broedstoof geplaatst. Reeds na drie uur voegt men aan het eerste buisje toe 0,1 cm^3 ammoniak van 1 %, aan het tweede buisje ½ cm^3 0,1 % ammoniak en aan het derde buisje 1 cm^3 0,01 % ammoniak. Daarna worden de kulturen weer in de broedstoof geplaatst en voor de eerste maal op agar-platen uitgestreken na 24 uur.

Naast de zich normaal ontwikkelende koloniën vindt men ook kleine, bleek blauwachtige, gekorrelde koloniën, welke korreltjes opeenhoopingen van C-vormen in de kolonie zijn. Zelden vertoonen zich zulke koloniën reeds bij den eersten uitstrijk op agar en het zal op den tweeden en derden dag nogmaals noodig zijn uitstrijken te maken op agar uit dezelfde bouillonkulturen, die bij kamertemperatuur bewaard worden. Gelukt het dan nog niet C-koloniën te vinden, dan moet men de geheele behandeling nogmaals herhalen. Kuhn vermeldt, dat het vaak voorkomt, dat deze proef drie tot viermaal herhaald moet worden. Ook door toevoeging van phenol in verdunningen 1 : 100, 1 : 200, 1 : 300 gelukte het hem C-vormen te isoleeren. In steriele buizen elk met 1 cm^3 der phenolverdunningen verwreef bij een klein oogje eener agarkultuur en streek na ½—2 minuten uit elk der verdunningen één oogje op agarplaten uit. Volgens zijn opgave gelukte het hem uit de meest verscheidene bacteriesoorten C-vormen te verkrijgen, welke alle steeds in kleine, kleurlooze, gladde koloniën, die niet porceleinachtig zijn, groeien en veel gelijkenis hebben met streptococcen-koloniën.

De C-vormen der verschillende bacteriën vertoonen onderling duidelijke verschillen zoowel in grootte als in vorm. Zoo komen diplococcen, kaarsvlamvormige coccen, sarcinen en streptococcen voor, benevens coccoïde vormen en heel kleine coccen, zoodat het Kuhn niet verwondert, dat de C-vormen door bacteriefilters heen kunnen gaan. Inderdaad vermeldt hij, dat het hem gelukt is, C-vormen van B. typhi, B. diphtheriae, B. coli en B. suipestifer door Berkefeldfilter (N) te filtreeren.

Ent men het filtraat in bouillon, dan vindt men steeds weer C-vormen, waaruit Kuhn besluit, dat bacteriën in den B-vorm door Berkefeldfilter tegengehouden worden, in den C-vorm echter doorgelaten worden en dat dus een of ander geheimzinnig, filtreerbaar en onzichtbaar stadium niet bestaat.

Het filtreeren blijkt dus mede een goed middel te zijn om C-vormen te isoleeren.

De grootte der C-vormen wisselt zeer. Er zouden coccen voorkomen, welke een doorsnede hebben gelijk aan de lengte van een Coli-staafje en zulke, welke uiterst klein zijn, en zich tot de eerste verhouden als een speldeknop tot een kers.

De C-vorm der tuberkelbacil is volgens Ziehl-Neelsen gekleurd blauw en is volgens Much gekleurd positief. De meening, dat de C-vormen van den tuberkelbacil identiek zijn met de granula van Much is niet juist, daar deze granula, gekleurd volgens Ziehl-Neelsen, rood zijn en de C-vormen, zooals Kuhn aangeeft, blauw gekleurd worden. Bij de bestudeering der levende kolonie bleek, dat er regelmatig een overgang van C-vormen in B-vormen plaats heeft, welke op hun beurt weer in C-vormen overgaan kunnen. De C-koloniën zijn evenals de B-kulturen besmet met pettenkoferiën, waardoor zij in haar gedrag ten opzichte van verschillende voedingsbodems niet geheel constant zouden zijn.

In bouillon vormen zij aanvankelijk vlokkige troebeling, later echter sedimentgroei, waarbij de bovenstaande vloeistof tenslotte helder wordt. Aangegeven wordt, dat de C-vormen gelatine niet vervloeien, steeds onbewegelijk zijn, ook wanneer de uitgangsstammen wel bewegelijk zijn. Rood groeien op Endo-agar de C-vormen van b.v. B. coli, Vibrio metchnikovii, B. typhi murium, B. dysenteriae Shiga Kruse, B. proteus, B. diphtheriae.

In lakmoeswei groeien ze in het algemeen rood; vele roepen haemolyse te voorschijn, zij vormen echter nooit gas uit suikers, ook niet wanneer de uitgangsstam wel gas vormde.

Versch geïsoleerd zijn ze volgens Gram gekleurd +, later ± tot gram —. In suiker- of serumhoudende voedingsbodems groeien ze weelderig. In vergelijking met de uitgangsstammen zijn de C-vormen avirulent. Door dierpassage gelukte het Kuhn den C-vorm in den B-vorm over te voeren, echter geschiedt dit nooit voor honderd procent.

De C-vormen van B coli heeft Kuhn naast de B-vormen uit het menschelijk lichaam geïsoleerd, b.v. uit de galblaas, verder uit

urine van cystitispatienten en uit carcinoomgezwellen.

Een verrassende gelijkenis met de C-vormen vertoonen de enterococcen, zoodat Kuhn vermoedt, dat vele van de in het laboratorium geïsoleerde enterococcenstammen de C-vormen van een of andere bacterie zijn; verder zegt hij:

„Weiterhin wird es umfassender Untersuchungen bedürfen, um fest zu stellen, ob etwa alle in der Natur vorkommenden Kokkenstämme in eine B-Form übergeführt werden können".

De B-vorm wordt niet door het C-serum, de C-vorm niet door het B-serum geagglutineerd.

Uit bovenstaande feiten besluit Kuhn, dat elke bacterie in een staafvorm (B) en in een cocvorm (C) kan voorkomen, dat bij de bacteriën dus sprake is van dimorphie.

Fig. I.

Zooals reeds vermeld, zouden volgens Ph. Kuhn in onze reinkulturen naast de bacteriën nog organismen voorkomen, die geheel daarvan verschillen.

Hij noemt ze pettenkoferiën, een hulde aan Pettenkofer, mede, omdat hij in deze organismen het „substraat y" ziet, dat volgens Pettenkofer bij het bacteriegif X moest komen, om het ziekmakende agens te doen ontstaan.

Het zijn amoeboïdeachtige organismen, welke waarschijnlijk tot de protozoën zijn te rekenen; zij groeien op gewone voedingsbodems veel langzamer dan de bacteriën.

Meestal zijn de pettenkoferiën in een bacteriekultuur op gewone agar verborgen, doordat de bacteriën er bovenop liggen.

Hun optreden wordt begunstigd door toevoeging van zouten, speciaal LiCl, verder door toevoeging van desinfectantia (phenol) of desinfecteerende kleurstoffen, zooals b.v. kristal-violet of fuchsine.

De werking van zulke toevoegsels, b.v. LiCl, kan berusten op remming of beschadiging der bacteriën óf op begunstiging van den pettenkoferiegroei. Het is ook mogelijk, dat beide het geval is.

Dat het zout in de geringe concentratie (2,5 %) een zwelling der bacteriën bewerkstelligen kan (zooals vaak aangenomen wordt) wordt door Kuhn betwijfeld, omdat hij op LiCl-agar koloniën waarnam, die uit gewone staafjes bestonden, indien ze niet met pettenkoferiesporen geïnfecteerd waren. Hier zou dus sprake zijn

van werkelijke reinkulturen der bacteriën. Voorts gaf het Kuhn te denken, dat de C-vormen weliswaar op LiCl-agar slecht groeien, echter er precies eender uitzien als gegroeid op gewone agar.

Kuhn neemt nu aan, dat de C-vormen daarom hun vorm bewaren, omdat ze niet door de pettenkoferiesporen aangevallen worden. Ze zijn echter eerst door deze sporen te infecteeren, wanneer ze in staafjes (B-vorm) zijn overgegaan.

Ook de lage temperatuur begunstigt den groei van de pettenkoferiën; kweekt men bij 37 graden C. dan overgroeien de bacteriën de pettenkoferiën.

De p_H is ook van belang voor den groei der pettenkoferiën, een zure agar is gunstig (p_H 6,6.)

Bij hooge p_H neemt de pettenkoferiegroei af.

Bij $p_H = 7{,}6 - 8$ is er op LiCl haast geen pettenkoferiegroei meer. De pettenkoferiën zijn in staat sporen te vormen, welke in de staaf- of draadvormige bacteriën tot pettenkoferiën uitgroeien. Kuhn toont door kleuring de binnengedrongen pettenkoferiesporen aan (met agar-fixeering door middel van sublimaat en bichromaat-azijnzuur, gevolgd door Giemsa-kleuring; sporen zijn dan zwart en bacteriën geel). Groeien de pettenkoferiesporen in de bacteriën uit, dan worden de bacteriën grooter en worden ziek. Zij zien er bleek uit, zoowel in het levende, als in het gekleurde praeparaat.

Daar, waar pettenkoferiën zich tegen bacteriën aanleggen, verdwijnt de inhoud der bacteriën. Het is jammer, dat Kuhn dit juist bestudeerd heeft aan een praeparaat van muizentyphusbacteriën, dat van een bacterieophaagproef stamt, zoodat het verdwijnen van den celinhoud tot de lyse door bacterieophaagwerking is terug te voeren.

De pettenkoferiën verteeren zoowel de B- als C-vormen, ook bacteriesporen.

Onder gunstige omstandigheden ontwikkelen zich reusachtige vormen. Hun gestalte wisselt zeer; op LiCl houdenden voedingsbodem gekweekt, komen meest kogelvormige, echter vaak ook langgestrekte vormen voor als b.v. in den vorm van een flesch, pompoen, visch, zwanenhals of luchtballon; tevens zeer grillige vormen.

Op weeke voedingsbodems met 1 % agar vertoonen zich amoeboïdeachtige uitloopers, die zich vaak naar de bacteriën uitstrekken.

Karakteristiek zijn de zwellingen van bacteriedraden, die door de pettenkoferiën ontstaan.

Het is volgens Kuhn zeer moeilijk, de uitgroeiende pettenkoferiën, die zich aansluiten aan den draadvorm der bacteriën, van de draden te onderscheiden.

Met anilinekleurstoffen gaat dit niet, wel met de Giemsa- en de nucleaalkleuring volgens Feulgen. [44])

De pettenkoferiën bezitten een slijmerig omhulsel, dat met Giemsa rood gekleurd wordt; daarom zien de meeste pettenkoferiën er roodachtig gekleurd uit. Is het slijmerig omhulsel bij de fixatie of kleuring verschoven, dan zijn ze blauw gekleurd.

Een kultuur, welke veel pettenkoferiën bevat, is slijmerig. Vandaar, dat een gelyseerde kultuur zoo strooperig kan zijn. Vooral op Endoagar ontstaan zeer slijmerige koloniën, bijv. van B. coli.

Voegt men een voedingsbodem $CaCl_2$ toe, dan vormt zich om de pettenkoferiën een kalkmantel, die door zuur te verwijderen is.

Zeer groote pettenkoferiën verdwijnen op de agar; ze schijnen af te sterven; andere zijn door de sterke slijmvorming aan de aandacht onttrokken.

Naast de pettenkoferiën komen steeds C-vormen voor.

„Dauerkulturen" krijgt men het beste op LiCl-agar, waaraan schapenbloed is toegevoegd.

De overenting van plaat op plaat moet zeer voorzichtig gebeuren, om de pettenkoferiën niet te beschadigen. Pettenkoferiënkulturen, waarin de bacteriën niet meer door overenting op gewone agar zijn aan te toonen, zijn bij Kuhn tot nu toe steeds te gronde gegaan.

De pettenkoferiën groeien door volumenvergrooting, ten gevolge van opneming van stoffen, vaak tot zeer groote vormen uit, die na eenigen tijd weer verdwijnen.

De vermeerdering geschiedt door deeling.

Dikwijls heeft er deeling plaats in ongelijke stukken.

Tot multiple deeling kon Kuhn niet besluiten, ofschoon vaak tot acht deelstukken werden waargenomen.

Bij pettenkoferiën, die vrij van bacteriën schijnen te zijn, ziet men in het levende praeparaat, in het inwendige, bepaalde vormen, welke, volgens Giemsa gekleurd, rood zijn. Ook met de nucleaalkleuring vertoonen de pettenkoferiën inwendige structuren (blauw rood) van verschillenden vorm.

Kuhn meent gerechtigd te zijn, deze thymonucleïnezuurhoudende elementen voor kernen te houden.

Wanneer de pettenkoferiekultuur ouder wordt, ziet men in

verschillende levende vormen glanzende elementen b.v. ronde kogels van verschillende grootte, staafjes of sikkels, die volgens Feulgen gekleurd, zwart-rood zijn; Kuhn weet hierover echter niets positiefs te zeggen.

Uit verschillende pettenkoferiën ontwikkelen zich cysten, die een slijmerigen mantel hebben en die inwendig vol sporen zitten; dit zijn kleine korreltjes, die, na hun vrijkomen, in de bacteriën dringen. Deze sporen kunnen met den slijmmantel, die zich langs de bacteriedraden uitstrekt, meegenomen worden en op deze wijze geheele draden van bacteriën met sporen infecteeren en ziek maken. Liggen zulke cysten temidden van bacteriën, dan komen de pettenkoferiesporen in de onmiddellijke omgeving vrij, dringen in de daar liggende bacteriën binnen, groeien uit tot pettenkoferiën, waarbij de bacteriën te gronde gaan; er vormt zich op die plaats een „plage" van d'Herelle.

De vorm der sporen is rond, vaak langwerpig; haar grootte uiterst klein, zoodat ze door bacteriefilters kunnen gaan.

Kuhn houdt het voor mogelijk, dat deze cysten door sexueele versmelting van twee individuen ontstaan.

Zijn praeparaten ondersteunen dit vermoeden.

Uit emulsies, verkregen door afslibbing van LiCl-agarkulturen, kon Kuhn bacteriophaag verkrijgen, hetgeen hem nog in zijn opvatting over de samenhang tusschen pettenkoferiën en bacteriophaag versterkte. Vele bacteriesoorten groeien goed op 2,5 % LiCl-agar, andere weer niet; of dit aan de soortverscheidenheid der pettenkoferiën ligt, weet Kuhn nog niet.

De pettenkoferiën zouden behooren tot de protozoo-achtige individuen, dicht bij de myxomyceten staand.

Volgens Kuhn bestaat er verband tusschen pettenkoferiën en carcinoom.

Ondanks de vele pogingen, die ik aangewend heb om uit B-vormen C-vormen te krijgen, is mij dit niet mogen gelukken. Ook niet uit een B-stam, welken Kuhn mij toezond en waaruit het hem wel gelukt was.

Deze stam werd eerst op een agar-plaat gezet en uit een losliggende kolonie, die op alkalischen bouillon verder werd gekweekt, 25 ééncelkulturen aangelegd. Uit deze kulturen gelukte het niet, noch met ammoniak, noch met phenol, C-vormen te verkrijgen.

Ofschoon door Ph. Kuhn in de gelegenheid gesteld om in het hygiënisch instituut te Giessen deze transmutatie te zien en zelf

te bewerkstelligen, was het mij niet mogelijk zelfs onder zijn leiding deze tot stand te brengen. Vermeldenswaard is tevens, dat het aan Kuhn zelf ook in dien tijd niet gelukte uit B-vormen van ééncelkulturen, door mij mede gebracht, C-vormen te verkrijgen.

Ik geloof wel te mogen zeggen, dat ginds aan steriel werken te weinig aandacht werd besteed.

Van 32 B-kulturen en de daaruit door Kuhn verkregen 32 C-kulturen, welke C-kulturen alle gram + bleken te zijn, te weten van B. coli, B. proteus, B. suipestifer, B. antracis, B. suisepticus, B. diphtheriae, B. dysenteriae, Spir. volutans en Vibrio metchnikovii, B. typhi murium, B. typhi werd een vergistingsspectrum opgemaakt, tevens enkele andere eigenschappen nagegaan, welke men overzichtelijk gerangschikt vindt in tabel III.

Uit dit onderzoek blijkt, dat wij bij de C-vormen te doen hebben met micrococcen, welke in hoofdzaak slechts in hun gedrag ten opzichte van gelatine verschillen, bovendien is het onwaarschijnlijk te achten, dat uit verschillende organismen dezelfde C-vormen zouden ontstaan.

De meening van Kuhn, dat de C-vormen van verschillende stammen identiek zouden zijn met den enterococ, schijnt mij toe evenmin juist te zijn. Ik grond deze meening op een onderzoek, hetwelk ik verrichtte met achttien enterococcen-stammen, mij welwillend door M. Gundel uit Heidelberg ter beschikking gesteld, waarvoor ik hem nogmaals dank zeg.

Ik heb vergeleken dezelfde eigenschappen als van de C-vormen, waarbij bleek, dat alle achttien onderling verschillend waren, ook dat geen enkele met één der C-stammen van Kuhn overeenkwam.

Ware de enterococ een juist omschreven begrip, hetgeen ik in verband met mijn verkregen resultaten (zie tabel III) meen te mogen betwijfelen, dan zou men mogen verwachten, dat uit de verschillende stammen een C-vorm ontstaat, welke althans met één der 18 verschillende enterococcenstammen identiek zou zijn; dit is nochtans niet het geval.

Wij gelooven dus beter te doen, de enterococcenhypothese als niet juist te beschouwen.

Wanneer wij nog vermelden, dat Kuhn en Hadley het er beiden over eens zijn, dat hun C- en G-vorm identiek zijn en dat Flu [49]) voor de G-vormen heeft bewezen, dat deze verontreini-

	B 1 Vibrio metchnikovii.	10 B. typhi murium.	13 B. coli.	14 „	20 „	21 „	22 „	24 „	25 „	28 „	29 „	30 „	35 „	37 „	40 „	41 „	43 „	45 „	47 „	48 „	50 B proteus.	52 B. suisepticus.	55 B. pseudo-anthracis.	56 B. proteus X 19.	58 B. coli.	59 B. anthracis	60 B. coli.	62 B. typhi.	65 „	68 B. suipestifer.	69 Spir. volutans.	70 B. diphtheriae.
Gelatine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	—
Arabinose	+	z	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	—	+	+	—	+	z	z	—	z	—
Xylose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	—	+	—	—	+	z	z	+	—	—
Rhamnose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	z	—
Glucose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	+	z	—
Fructose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	z	z	+	z	+	z	z	+	z	—
Mannose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	—	—	+	—	+	z	z	+	z	—
Galactose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	—	+	+	—	+	z	z	z	z	—
Maltose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	z	+	+	z	+	z	z	z	z	—
Saccharose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	z	+	—	z	—	—	—	—	z	—
Lactose	—	—	+	+	+	z	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	z	—
Trehalose	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	z	z	+	z	+	z	z	—	z	—
Raffinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycerine	—	—	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	—	z	+	—	+	z	z	z	z	—
Erythriet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adoniet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Manniet	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	—	—	+	—	+	z	z	+	z	—
Dulciet	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	z	—	—
Sorbiet	+	+	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	—	+	—	—	+	—	+	z	z	z	z	—
Salicine	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	z	+	+	—	+	z	+	+	—	+	—	—	—	z	—
Aesculine	—	z	+	z	+	—	+	—	+	+	—	z	+	+	z	—	+	z	z	—	—	+	z	+	z	z	+	—	—	—	z	—
Melk	S	—	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	—	S	—
Indol	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—
Pyrodruivenz.	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	—
Methylrood (V.P.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eosine (V.P.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—
Citraat (Koser)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+	—	+
Urinezuur (Koser)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	C 1	10	13	14	20	21	22	24	25	28	29	30	35	37	40	41	43	45	47	48	50	52	55	56	58	59	60	62	65	68	69	70
Gelatine	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Arabinose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Xylose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Rhamnose	—	z	—	—	z	z	z	z	—	z	z	z	—	z	z	z	z	—	z	z	—	z	—	z	z	z	—	—	z	z	z	z
Glucose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Fructose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Mannose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Galactose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Maltose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Saccharose	z	z	—	—	z	z	z	z	—	z	z	z	—	z	z	z	z	—	z	z	—	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	z
Lactose	z	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Trehalose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Raffinose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycerine	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	z	—	z	z	z
Erythriet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adoniet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Manniet	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	—	—	z	z	z
Dulciet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	z	—	—
Sorbiet	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	—	—	z	z	z
Salicine	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Aesculine	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Melk	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pyrodruivenz.	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—	z	—	z	z	z	z	—	—	z	z	z
Methylrood (V.P.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eosine (V.P.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
Citraat (Koser)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Urinezuur (Koser)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	E 1	2	3	6	7	8	9	10	b1	b2	11	12	13	14	15	16	17	18
Gelatine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arabinose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Xylose	z	z	—	z	z	—	—	—	—	—	z	—	z	—	z	—	—	—
Rhamnose	z	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	z	—	—	—	z	—	—
Glucose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Fructose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Mannose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Galactose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Maltose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Saccharose	z	z	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—
Lactose	z	z	z	z	z	—	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Trehalose	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	—	z	—	z	z	z
Raffinose	z	z	z	z	z	—	z	—	—	—	—	—	z	—	—	—	—	—
Glycerine	z	—	—	z	—	—	—	—	—	z	z	z	—	—	—	z	z	z
Erythriet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adoniet	z	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Manniet	z	—	—	z	—	z	z	z	—	z	—	z	—	z	—	z	z	z
Dulciet	z	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sorbiet	z	—	—	z	—	—	—	—	—	—	—	z	—	z	—	z	z	z
Salicine	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Aesculine	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
Melk	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pyrodruivenz.	—	z	—	z	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	z	z
Methylrood (V.P.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eosine (V.P.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
Citraat (Koser)	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Urinezuur (Koser)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+

Van de suikers en alcoholen is 0.5% opgelost in 0.5% peptonwater, waaraan tevens 10% gevoelige lakmoesoplossing, volgens Kubel-Tiemann, is toegevoegd.

B 1-70 = B-vormen van Kuhn.
C 1-70 = C-vormen van Kuhn.
E 1-18 = Enterococcen.
z = zuur.
\+ = zuur en gas.

gingen zijn, dan zal het duidelijk zijn, dat wij ook de C-vormen als verontreinigingen beschouwen.

De wijze, waarop deze verontreinigingen tot stand zijn gekomen, doet eigenlijk niets ter zake, of de beginkultuur reeds besmet was, dan wel, of de verontreiniging eerst later op de agarplaten heeft plaats gevonden.

Wat de pettenkoferiën betreft: daarvan kunnen wij zeggen, dat Kuhn juist heeft waargenomen, doch dat zijn conclusies niet juist zijn.

Een op mijn verzoek, door Kuhn zelf aangewezen pettenkoferie, welke zich bevond in een hangenden druppel onder den micromanipulator volgens Schouten, en die afkomstig was van een vijf uur oude coli-kultuur op 2,5 % LiCl. houdend bouillon-agar, werd met behulp van dit toestel geïsoleerd en geënt op een druppeltje 1,25 % LiCl. bevattende bouillongelatine. Ik had daarbij het geluk dezen gezwollen kogelvorm, in tegenstelling tot hetgeen Pietschmann [45]) en Braulke [46]) vermelden, tot deeling te zien overgaan.

De wijze van deeling was geheel gelijk aan die, welke ik tallooze malen had waargenomen bij de meest verschillende bacteriën en óók bij de bacteriën van den oorspronkelijken Coli-stam. Er vormde zich dan ook een normale bacterie-kolonie, zij het van iets gezwollen staafjes.

Klieneberger [47]), die van LiCl bevattende voedingsbodem in macro afentte op voedingsbodems zonder LiCl, vond hierop koloniën, die dus uit nog kweekbare, gezwollen vormen gegroeid kunnen zijn, echter ook uit LiCl resistente vormen.

Kuhn leverde op de proef, zooals Klieneberger haar deed, de critiek, dat de jonge pettenkoferiën bezet zijn met bacterie-vormen, welke deels nog kweekbaar zijn.

Ik meen, dat deze kritiek niet kan gelden op de proef in micro, zooals ik haar uitvoerde. Men is wel degelijk in staat bij duizendmalige vergrooting waar te nemen of men met een gezwollen bacterie te doen heeft, of met zulk een vorm, waaraan nog eenige bacteriën kleven. Later heb ik deze proef nog vaak herhaald, steeds met hetzelfde resultaat. Daartoe heb ik op een steriel dekglaasje geplaatst:

twee alkalische bouillon-gelatinedruppeltjes,
twee „ „ „ „ 2,5 % LiCl bevattend,
twee „ „ „ „ 1,25 % LiCl bevattend,

twee steriele druppeltjes physiologische keukenzout-oplossing en één druppeltje eener twaalf uur oude, alkalische bouillon-kultuur van B. coli.

Op één der beide gelatinedruppeltjes met 2,5 % LiCl en op dat met 1,25 % LiCl entte ik nu elk 1 bacterie.

Op het andere druppeltje gelatine, met 2,5 % LiCl, en op dat met 1,25 % LiCl, werden vele bacteriën op bepaalde afstanden van elkaar geplaatst.

Alleen de bacteriën op de 1,25 % LiCl houdende gelatine gingen tot vermeerdering over. Ik liet ze deelen, tot er vier groote, ronde kogels ontstaan waren, die een diameter hadden van 1,5—2,5 × de lengte der geïsoleerde bacterie en er evenzoo uitzagen als de vorm, mij door Kuhn aangewezen.

Van deze vier cellen isoleerde ik er vervolgens één en entte deze op een druppeltje gewone, alkalische bouillon-gelatine, een tweede maakte ik stuk, terwijl de derde en vierde met hun scheidingswand aan elkaar bleven gehecht.

Deze laatste twee cellen groeiden hoe langer hoe meer uit, tot na twee dagen van één dier twee de contouren niet meer te zien waren, wel eenige resten. Deze was dus gebarsten.

De op alkalische bouillon-gelatine afgeënte cel deelde zich eerst in zeer abnormale vormen, die echter bij verdere deelingen hoe langer hoe meer normale vormen te zien gaven, totdat tenslotte weder de gewone staafvormen van B. coli te voorschijn kwamen, welke het aanschijn gaven aan een normale kolonie.

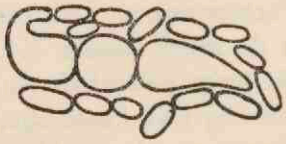

Fig. 2

De kultuur werd daarna in macro afgeënt, en evenals de uitgangsstam, dus vóór kweeken op LiCl houdende gelatine, onderzocht op de eigenschappen als in de tabel III zijn aangegeven.

Voor deze proef werd gebruikt de stam B. coli 22.

Geen der eigenschappen bleek door den groei op LiCl houdende gelatine veranderd te zijn.

Ik meen dus te hebben bewezen, dat de pettenkoferiën geen zelfstandige individuën zijn, doch niets anders dan de reeds lang bekende, zoogenaamde degeneratie- of involutievormen.

Tenslotte heb ik nogmaals deze pettenkoferiën geïsoleerd en ze geplaatst op jonge, nog uitgroeiende koloniën, van het ontstaan van cysten was echter nimmer sprake, evenmin van het ontstaan van „plages" of van het ontstaan van C-vormen.

Ook was van een vermeerderen der pettenkoferiën geen sprake, ofschoon Kuhn vermeldt, dat pettenkoferiën slechts bij aanwezigheid van bacteriën zich vermogen te vermeerderen.

Van het binnendringen van pettenkoferiesporen, in het algemeen van korreltjes in bacteriën, is door mij nooit iets waargenomen. Dat Kuhn op grond van kleuring kernen aanneemt in de pettenkoferiën, is te begrijpen.

Het colloïdale milieu zooals dit aanwezig is in deze cellen, evenals in normale bacteriën, is zeker niet bestand tegen de floculeerende werking van zwaarmetaal-ionen zooals aanwezig in sublimaat en dehydrateerende middelen als alcohol, zooals bij de agarfixatie en in het algemeen bij vele andere fixatie-methoden gebruikelijk.

Nog afgezien van de behandeling met normaal zoutzuur, waarin het protoplasma der cel, ware het niet reeds bij de fixatie gefloculeerd en gecoaguleerd, zeker coaguleert, heeft men hier ideale voorwaarden voor floculatie en coagulatie van den colloïalen inhoud van de bacteriecel, zoodat het voorkomen van inwendige strukturen niets verwonderlijks heeft. Men mag echter uit de structuren in de involutievormen niet besluiten tot het voorkomen van kernen bij bacteriën.

Dat de pettenkoferiesporen het verschijnsel van d'Herelle niet vermogen te voorschijn te roepen, zal in het licht van onze onderzoekingen geen naderen uitleg behoeven.

Bij bacteriophaagproeven bleek het ons echter wel, dat er soortgelijke gezwollen cellen optreden, als die, welke ontstaan op LiCl bevattende voedingsbodems. Daar wij er echter nooit in geslaagd zijn, om een bacterie, die stamde uit een kultuur, waaraan een zeer virulente bacterieophaag was toegevoegd, tot groei te krijgen, komen wij tot hetzelfde besluit als waartoe Drenth [48]) kwam, dat de bacteriën door de bacterieophaag spontaan gedood worden. Bij zwak virulente phaag zal men echter in staat zijn nog levensvatbare kiemen te vinden, die dan later de phaag-vaste, secundaire koloniën kunnen vormen.

De lyse van een pettenkoferie, waarbij deze uiteenvalt in kleine korreltjes en in een ongedefinieerde rest is precies gelijk aan die, welke men waarneemt bij door bacterieophaag gezwollen bacteriën.

Ook deze barsten na verloop van tijd en geven het aanschijn aan tallooze kleine korreltjes, die men wel heeft aangezien voor den bacteriophaag zelve. Echter werd door ons nooit een binnendringen dezer korreltjes in de bacteriën waargenomen, evenmin als de korreltjes ontstaan uit de pettenkoferiën, hetgeen ook door Klieneberger nimmer werd geconstateerd.

Wel mogen wij één feit niet onvermeld laten n.l. dat door ons werd waargenomen, dat deze korreltjes in staat waren zich tot één groot druppeltje te vereenigen.

Langs mechanischen weg deden wij dit ook nog tot stand komen. In een klein druppeltje brachten wij een sterk gezwollen bacterie, die wij daarna met een fijne puntnaald aanprikten, zoodat deze haar inhoud aan de druppel afgaf. De ontstane korreltjes zijn eerst in levendige Brownsche beweging, na eenigen tijd echter plakten zij tegen het dekglas vast en nu werden met de schoongespoelde naald twee van deze korreltjes, die reeds vlak bij elkaar lagen, tegen elkaar gedrukt, met het merkwaardig gevolg, dat deze als vloeistofdruppeltjes zich vereenigden, hetgeen ons aanleiding geeft inderdaad aan te nemen, dat deze korreltjes vloeistofdruppeltjes zijn en wel coacervaat-druppeltjes. Indien men deze korreltjes of druppeltjes na eenigen tijd bekijkt, blijken er amorphe subsanties aanwezig te zijn. Het coacervaat is dan uitgevlokt.

Wij kunnen dus zeggen, dat in de involutievormen een phasenscheiding optreedt, die zich uit door het optreden van coacervaten.

Het is niet onmogelijk, dat zich reeds in normale bacteriën coacervaten bevinden en dat, hetgeen men in de literatuur aangegeven vindt als volutine-korrels, metachromatische korrels of korrels van Ernst-Babes, niets anders zijn dan deze coacervaatdruppeltjes, die men vooral in donker veld goed kan waarnemen.

HOOFDSTUK V.

ALGEMEENE BESCHOUWINGEN.

De gevonden feiten geven ons aanleiding nog eenige beschouwingen daaraan vast te knoopen.

Allereerst aangaande de homogeniteit der reinkulturen.

De homogeniteit der reinkulturen werd bewezen aan ééncelkulturen, verkregen uit cellen geïsoleerd uit hoogstens zestien uur oude alkalische bouillonkulturen.

De kritiek, welke Enderlein op het werk van aanhangers der monotropie geeft, n.l.: „Der methodische Hauptfehler der Monomorphisten war anfangs im Hinblick auf die Cyclogenie der Mangel einer methodischen Beobachtung der Veränderungen den Reinkulturen im Laufe der Zeit; meist wurde nur mit jungen Kulturen gearbeitet," behoeft men niet ernstig te nemen, zooals uit het navolgende blijken zal.

In den bovenstaanden zin van Enderlein behoeft men slechts „jungen" in „alten" te veranderen, om kritiek op den arbeid van de aanhangers der cyclogenie te leveren.

Bij de bestudeering der veranderlijkheid der bacteriën heeft men meestal geen voortdurende waarneming aan dezelfde cel toegepast, maar heeft men aan verschillende cellen en vaak in hetzelfde praeparaat de veranderlijkheid bestudeerd, waardoor een mogelijkheid tot dwaling geschapen werd.

Practisch zijn alle waargenomen morphologische veranderingen in een bacteriekultuur geconstateerd in oude kulturen en vooral in voor de bacteriën ongewone of ongunstige media, welke aanleiding kunnen geven tot zoogenaamde involutie- of degeneratievormen of doode cellen.

Slechts nauwkeurige waarnemingen aan morphologisch verschillende cellen of aan ééncellen, geplaatst in verschillende media, of voortdurende waarneming van, van verschillende media geïsoleerde ééncellen zullen in staat zijn ons een zuiver inzicht te geven in de veranderlijkheid der bacteriën.

Vaak zullen slechts quantitatieve verschillen bij overigens gelijke

cellen optreden; zooals b.v. het vormen van meer of minder zuur of gas en het meer of minder virulent zijn eener bacterie.

Dergelijke uitingen van veranderlijkheid zouden wij echter van de allotropie uit willen sluiten, evenzoo de evolutie-vormen der „cycle évolutif".

Afgezien van de zooeven vermelde veranderlijkheid is op grond onzer bevindingen de homogeniteit eener kultuur begrijpelijk, ofschoon er onderzoekers geweest zijn — en dit zijn dan vooral diegenen, die een levenscyclus der bacteriën aanvaarden — die deze homogeniteit in twijfel trekken. Aangezien echter ons onderzoek in het allerminst aanleiding geeft het bestaan van een levenscyclus te aanvaarden, behoeven wij geen rekening te houden met de heterogeniteit als gevolg van een levenscyclus.

Bij het aanleggen der voor dit onderzoek gebezigde ééncelkulturen, zijn wij uitgegaan van de morphologisch meest verschillende cellen, die in een hoogstens zestien uur oude kultuur te vinden waren, n.l. coccoïde- en staafvormen, lange en korte, dunne en dikke.

Vaak vindt men in de literatuur vermeld, zoo b.v. bij Kuhn, dat in een kultuur draadvormige bacteriën optreden; ook zulke vormen isoleerden wij, echter wanneer men deze vormen voorzichtig aanraakt met de naald, blijken deze draden, waarin geen tusschenschotten zijn waar te nemen, te bestaan uit aan elkaar vastzittende bacteriën, die elk afzonderlijk tot groei te brengen zijn.

De snelle groei of misschien de bijzondere toestand tengevolge van het ongunstige milieu zullen oorzaken kunnen zijn, dat deze bacteriën het vermogen missen zich van elkaar vrij te maken. In vloeibaar milieu namen wij dit zich van elkaar losmaken waar; wij zagen de beide bacteriën wrikkende bewegingen uitvoeren en zich op deze wijze loswringen.

Bij sommige bacteriën vindt men in het bacterielichaam sterk lichtbrekende korreltjes, die aanleiding hebben gegeven tot het doen van allerlei veronderstellingen omtrent de natuur dezer bestanddeelen. Onder benamingen als metachromatische korrels, korrels van Ernst-Babes, korrels van Neisser, volutine-korrels en poolkorrels zijn zij in de literatuur beschreven. Soms worden zij beschouwd als ophoopingen van reservevoedsel, soms als kernen, soms als regeneratieve lichamen. Om te zien, of deze bestanddeelen levensvatbaarheid bezaten, sneden wij de levende cel doormidden en entten wij beide deelen af op gelatine. Nooit werd groei

waargenomen, hetgeen reeds vóór ons door J. C. H. Broek was geconstateerd. Bij de beoordeeling der levensvatbaarheid moet men echter zeer voorzichtig zijn. Al zijn wij van meening, dat slechts de ééncelmethode in staat is hier een onaanvechtbaar bewijs te leveren, er doen zich bij deze methode moeilijkheden voor. In de eerste plaats is het mogelijk, dat de korrel nog niet rijp genoeg is, om zich verder te kunnen ontwikkelen, voorts, dat de bacterie bij het doorsnijden gedood is. Ten slotte is het mogelijk, dat wij niet de gunstige omstandigheden van de samenstelling van het milieu, zuurstofdruk in de broedkamer, waterstofionenconcentratie en oppervlaktespanning van spoel- en kweekdruppel enz. kennen, waaronder één enkele cel zich vermag te vermeerderen. Zoo gelukt het vaak niet cellen van een bepaalde soort tot vermeerdering te krijgen, wanneer men deze eerst in een druppeltje physiologische keukenzout-oplossing gebracht heeft, om te constateeren of men werkelijk met één enkel individu te doen heeft, terwijl men individuen van dezelfde bacteriesoort wèl tot vermeerdering kan brengen, indien zij van tevoren in gewoon water waren gebracht. Omgekeerde gevallen komen óók voor.

Dat ook het licht (mitogenetische straling) zijn invloed zal kunnen doen gelden, spreekt vanzelf. Een negatief resultaat is dus nog niet een absoluut bewijs van géén levensvatbaarheid, echter zullen wij ons met de uitkomsten van deze methode voorloopig tevreden moeten stellen.

Werd door ons de homogeniteit van reinkulturen bewezen, anders wordt het, wanneer een kultuur in een phase van sterke modificatie komt, dan kan men zich afvragen of alle individuën in zulk een kultuur al dan niet aan elkaar gelijk zijn, ook, of een modificatie geleidelijk dan wel sprongsgewijs tot stand komt. Ons streven was om deze verschillen door middel van de ééncelmethode aan den dag te brengen, hetgeen ons echter niet gelukt is. Evenwel zal hier de plaatmethode een veel eenvoudiger wijze zijn om deze verschillen aan te toonen, aangezien ons onderzoek wel bewezen heeft, dat koloniën, die volkomen geïsoleerd liggen op agar- of gelatineplaten, als absoluut rein te beschouwen zijn en men tevens op veel gemakkelijker wijze tot een grooter aantal kulturen zal kunnen komen, waardoor verschillen dus eerder worden opgemerkt. Dit is reeds tallooze malen gedaan, wij willen slechts vermelden, dat het A. W. Pot gelukt is een gaslooze paratyphus-stam, welke ook wij in ons onderzoek betrokken, door voortkweeken op calcium-

formiaat-voedingsbodem weer gas te doen vormen.

Door tusschentijds afenten van de op agarplaten ontwikkelde koloniën, welke ontstonden na uitzaaien der gasvormende calciumformiaat-kulturen, gelukte het hem varianten te vinden, waarvan sommige gas, andere géén gas gaven.

Bij de bestudeering der allotropie blijft het steeds gewenscht van ééncelkulturen uit te gaan, aangezien men dan niet het argument zal kunnen aanvoeren, dat men van een mengsel van verschillende varianten is uitgegaan. Voorts dient men bij het toepassen der plaatmethode de noodige voorzichtigheid te betrachten, omdat hierbij infectie niet steeds in voldoende mate is uit te sluiten. Deze onaangename ervaring deden wij bij ons onderzoek op, want het bleek, dat tallooze malen infectie van luchtkiemen optrad, wanneer men volgens de gewone wijze te werk ging, n.l. door de plaat in het laboratorium te gieten, daarna te beënten en vervolgens in de stoof te plaatsen, om haar den volgenden dag en nog eenige dagen daarna uit de stoof te halen en te bekijken; indien wij echter dezelfde manipulaties verrichtten in een broedkamer, de platen op deze wijze steeds op dezelfde temperatuur hielden, waardoor dus luchtstroomingen, welke deze infecties veroorzaken, uitgesloten waren, dan traden geen infecties meer op.

Op het gevaar van infectie van uitstrijkplaten heeft ook E. Klieneberger gewezen, die vond, dat 30 tot 50 % van onder bijzondere voorzorg behandelde platen niet steriel waren.

Wanneer men dus een jonge kultuur heeft in een bepaald medium, dan zijn alle cellen daarin aanwezig gelijkwaardig. Voegt men echter chemicaliën toe of verandert men den zuurstofdruk of de oppervlaktespanning of brengt men andere wijzigingen in of van het medium aan, in het algemeen verandert men haar in- of uitwendige omstandigheden, dan bestaat er theoretisch de mogelijkheid, dat de kultuur zich anders zal gaan gedragen, dan zulks vroeger het geval was. Men moet zich daarvan echter geen al te groote voorstellingen maken.

Indien b.v. aan kulturen van B. pyocyaneum of van B. pneumoniae S en R werd toegevoegd, in verschillende concentraties, kaliumbichromaat, boorzuur, phenol, piperazine, fuchsine, methyleenblauw, pancreatine, ureum, urotropine, formaline, thyroïdine of kreosoot, dan trad als algemeen verschijnsel op een verkorting van den vorm naast draadvorming.

Al deze stoffen zijn in de literatuur vermeld als in staat modificaties tot stand te brengen. Bij het controleeren der biochemische eigenschappen bleken deze echter in geen enke lopzicht veranderd te zijn, evenmin bleek de vorm inconstant, waarmede wij slechts willen zeggen, dat de gemakkelijkheid van het tot stand komen van een modificatie vaak overdreven wordt.

De meest geliefde studieobjecten voor de aanhangers eener cyclogenie zijn de oude kulturen.

Let men daarbij op de morphologische veranderingen, allicht vermag men dan succes te hebben. Immers, men treft naast de normale evolutievormen der levende cellen, allerlei doode individuën aan.

Is zoo'n oude kultuur echter essentieel veranderd? Neen; haar biochemische, zoowel als haar morphologische eigenschappen blijken bij overenting gelijk gebleven. Hoe de meest cocvormige individuën in deze oude kulturen ontstaan, is vaak niet moeilijk te verklaren. Naast verontreinigingen (Kuhn en Hadley) heeft men hier meestal te doen met afgestorven individuën, welke geringere afmetingen bezitten dan de levende cellen, hetgeen duidelijk blijkt, indien men deze vormen met methyleenblauw of neutraalrood kleurt of indien men deze cellen isoleert met den micromanipulator. Dit laatste heeft echter bezwaren, want al de tallooze pogingen door ons gedaan, om in oude kulturen voorkomende coccoïdevormen en korrels of uitgegroeide staafvormige bacteriën tot groei te brengen, hebben steeds gefaald. Naast het feit, dat misschien niet alle gunstige factoren, waaronder één enkele cel tot vermeerdering is te brengen, aanwezig zijn, zal men uit oude kulturen een zóó groot aantal cellen moeten isoleeren om een indruk te krijgen van de verhouding van levende en doode cellen, dat dit voor één persoon wel niet te doen is.

In de bacteriologie speelt de korrel- en de involutievorm een groote rol. Overal in de literatuur komen wij deze vormen tegen, in jonge zoowel als in oude kulturen en in kulturen, die onder invloed staan van bacterieophaag of chemicaliën.

Wanneer wij over korrels spreken, dienen wij ons echter vooraf af te vragen, wat onder een korrel is te verstaan.

Het voortdurend namen geven aan al de in de literatuur beschreven korrels en structuren, welke in het bacterielichaam of in kulturen voorkomen, met namen gedeeltelijk ontleend aan de mycologie, gedeeltelijk aan de cytologie, of met zelf gemaakte namen,

zooals dit vooral bij Enderlein het geval is, is slechts in staat het probleem te vertroebelen en het voor den lezer nog moeilijker te maken, den schrijver te volgen.

De noodzakelijkheid, om een nieuwe terminologie in te voeren, heeft voornamelijk zijn oorsprong in de onduidelijkheid, waarmede sommige schrijvers hun gedachten trachten uit te drukken. De verwarring, door dit namen geven gesticht, is nog grooter, doordat dezelfde zaken door onderscheidene schrijvers verschillend worden betiteld en dezelfde namen vaak zeer verschillende zaken aanduiden. Zoo geven b.v. bij Mellon de termen chlamydosporen, arthrosporen, Dauerzellen, gonidium en zygosporen alle in wezen hetzelfde weer („They may be viewed as branches of the same reorganisationtree"), maar in de mycologie hebben deze termen zeer bepaalde, zoowel physiologisch als morphologisch verschillende beteekenis.

Naast het woord korrel spreekt men ook van granulum, b.v. de granula van Much, uit het korrelstadium van het B. tuberculosum.

Onder korrels verstaan wij kogelvormige lichamen, welke in het bacterielichaam ontstaan en die bij onderzoek blijken niet levensvatbaar te zijn. Onder granula verstaan wij kogelvormige lichamen, welke door afsnoering van het bacterielichaam tot stand komen. Vaak zullen deze vormen coccoïd kunnen zijn. Zij blijken bij nader onderzoek levensvatbaar.

Aangezien wij heden nog niet weten, of de granula van Much door afsnoering eener tuberkelbacil tot stand komen of in het bacterielichaam gevormd worden, kunnen wij voorshands aan deze benaming vasthouden, temeer, daar het onderzoek van J. C. H. Broek bewezen heeft, dat kogelvormige lichamen uit kulturen van B. tuberculosum levensvatbaarheid bezitten.

In aansluiting hiermede willen wij nu reeds vermelden, dat het onze meening is, dat het voorkomen van korrels in de bacteriën niet een normaal verschijnsel is; eveneens, dat het voorkomen van kogelvormige lichamen, behalve dan de coccoïde-vormen der „cycle évolutif", dus zooals de granula van Much, niet een algemeen verschijnsel bij bacteriën is. Het is echter mogelijk dat B. tuberculosum met misschien B. diphtheriae en nog eenige andere bacteriën in een afzonderlijke groep van bacteriën gerangschikt moeten worden, welke het korrelstadium als een der kenmerken bezitten.

Dat er in oude kulturen korrels voorkomen, namen ook wij waar, in jonge kulturen echter werden deze door mij nooit waargenomen.

Dat sommige onderzoekers korrels waarnamen in gekleurde praeparaten, trekken wij niet in twijfel. De herkomst dezer korrels dient echter nagegaan te worden, want meestal zal men te doen hebben met artefacten.

Tot welke foutieve conclusies men op grond van gekleurde praeparaten kan komen, leeren ons, naast de verhandelingen van Kuhn, nog vele andere.

Indien men zich een goede voorstelling maakt van een levende bacteriecel, — tevens geldt dit voor elke levende cel — dan zal het aan een ieder duidelijk zijn, dat men deze niet met krachtdadige middelen kan behandelen zonder dat zij verandert.

Zonder twijfel bezit elke cel een colloïdalen inhoud en zal deze als zoodanig onderworpen zijn aan physisch-chemische wetten.

De bacteriecel als zoodanig is reeds als een colloïdaal deeltje te beschouwen, dat een negatieve lading bezit en, zooals aangenomen wordt, tevens een watermantel.

Wat gebeurt er nu, wanneer men een uitstrijkpraeparaat maakt?

De bacterie wordt bij fixatie door de vlam of bij fixatie door middel van methylalkohol gedehydrateerd, waardoor een uitvlokking of floculatie van den colloïdalen inhoud tot stand komt. Past men andere fixatiemethoden toe, zooals de agarfixatiemethode, waarvan b.v. Kuhn gebruik maakt, dan treedt eveneens floculatie en coagulatie op door den ontladenden invloed van zwaarmetaalionen, zooals aanwezig in sublimaat, benevens een dehydrateerende werking door de bij deze fixatie gebruikten alkohol. Bij deze fixatiemethode zijn wel de meest ideale voorwaarden aanwezig voor floculatie en coagulatie van den colloïdalen inhoud. En dat deze gecoaguleerde celinhoud zich ten opzichte van kleurstoffen verschillend zal kunnen gedragen, is evenmin verwonderlijk, indien men zich b.v. de proef van Fischer (1895—1897) in herinnering roept, waarin hij eiwit-deeltjes van verschillende grootte, echter van hetzelfde eiwit, kleurde met safranine-gentiaanoplossing volgens Flemming en waarbij hem bleek, dat de kleur varieerde van rood tot paars, afhankelijk van de grootte van het deeltje.

Op grond der verstoring van den colloïdalen toestand van den celinhoud moeten wij alle fixatiemethoden afkeuren en dus zullen uit dergelijke gekleurde praeparaten, onzes inziens geen conclusies getrokken mogen worden over het al dan niet aanwezig zijn van

een kern of van bepaalde bestanddeelen in de cel. Alle onderzoekingen behooren zooveel mogelijk te geschieden aan de levende, ongekleurde cel.

Een afzonderlijke plaats onder de kleuringsmethoden neemt de kleuring volgens F e u l g e n in.

Deze kleuring heet te zijn een micro-chemische reactie op thymonucleïnezuren, aangezien deze verbindingen plegen voor te komen in de kernen van cellen van hoogere organismen en tevens eenzelfde kleur geven als deze kernen, indien behandeld op gelijke wijze als bij deze kleuringsmethode gebruikelijk is. Op grond hiervan besluiten sommige onderzoekers tot het bestaan van een kern bij de bacteriën.

Wanneer men over een kern spreekt, dient men eigenlijk weer van tevoren vast te leggen, wat men hieronder te verstaan heeft, aangezien ook aan dit begrip verschillende beteekenissen worden toegekend.

In het geheele rijk der natuur is een differentiatie der cel in kern en celplasma verbreid, slechts bij de Cyanophyceën en de bacteriën kennen wij geen morphologische afscheiding van kern en celplasma. De kern is een morphologisch begrip. Men kan haar definieeren als een in elke tot deeling in staat zijnde cel aanwezige constellatie, welke morphologisch van het haar omringende plasma verschilt en zich in haar chemische samenstelling en tegenover bepaalde kleurstoffen anders gedraagt dan het celplasma. Voorts schrijven wij haar invloed toe op stofwisseling, groei en deeling der cel en zien in haar chromosomen de dragers der erfelijke eigenschappen, die bij de kerndeeling volgens bepaalde wetten op de dochtercellen overgedragen worden. De kern is dus bepaald door de som harer morphologische, chemische en physiologische eigenschappen.

Bij de bacteriën treffen wij echter deze morphologisch omschreven kern niet aan. Als het essentieele van de kern is niet aan te zien de morphologische begrenzing in het plasma, doch de werking van de in de chromosomen gelegen genen, zoodat men zich gewend heeft te spreken van een genencomplex bij bacteriën. Dat deze genen nu homogeen verdeeld zijn in den celinhoud, dus practisch gesproken de bacteriecel geheel kern is, is een voorloopig te aanvaarden waarschijnlijkheid. Het begrip kern in den ouden vorm heeft dan echter afgedaan.

Vele onderzoekers, die de celkern diffuus verdeeld denken over den celinhoud, steunen deze bewering op het feit, dat de nucleaal-

kleuring volgens Feulgen de cel gelijkmatig kleurt, de thymonucleïnezuren dus homogeen verdeeld zouden zijn in de cel. Is echter een positieve nucleaalkleuring, ook al is ze niet diffuus, bewijzend voor de aanwezigheid van kernsubstantie, in casu thymonucleïnezuren?

Tot de aanwezigheid van thymonucleïnezuren of een gemengd nucleïnezuur van het type der thymonucleïnezuren kan men slechts dàn besluiten, indien men zeker is, dat er nog niet andere onbekende stoffen zijn, die onder dezelfde omstandigheden deze reactie geven.

Deze reactie is tevens zoo gecompliceerd en de constitutie van het thymonucleïnezuur nog zoo weinig zeker, dat het voor ons nog niet mogelijk is, daaruit conclusies te trekken. Eerst bewijzend, dat een kern bij bacteriën voorkomt, zou het zijn, indien men chromosomen of kerndeelingsfiguren waarnam. Indien men de grootte eener kern aanneemt op 0,3 μ dan is het duidelijk, dat de chromosomen ver beneden de grens van het oplossend vermogen onzer microscopen ligt en wij deze dus nooit op deze wijze zullen kunnen waarnemen.

Het gekleurde, evenmin als het ongekleurde praeparaat kan dus het bestaan van een kern in de bacteriën bewijzen, zelfs niet met de nucleaalkleuring volgens Feulgen, omdat in het gekleurde praeparaat de inwendige structuren gedeformeerd zijn, in het ongekleurde praeparaat chromosomen of kerndeelingsfiguren niet zijn waar te nemen.

Wat nu weder de korrels in de bacteriën betreft, de jongste opvattingen der colloidchemie, vooral die, welke betrekking hebben op de coacervatie (= ontmenging in den soltoestand), stellen ons in staat een verklaring te geven van het ontstaan dezer korrels, eveneens van vacuolen, die veelvuldig beschreven zijn als voor te komen in bacteriecellen.

Het optreden van coacervaten in een bacteriecel zal den colloidchemisch onderlegden onderzoeker niet verwonderen; geven toch reeds colloïdale oplossingen in vitro coacervatieverschijnselen. En waar uit de onderzoekingen over deze verschijnselen door H. R. Kruyt en H. G. Bungenberg de Jong blijkt, dat men met een tamelijk algemeen verschijnsel te doen heeft, daar ligt het voor de hand, dat wij onze verklaring voor het optreden van korrels, korreltjes, druppeltjes (microcöacervatie) of vacuolen in het ontstaan van coacervaten in de cel zoeken. Zeer waarschijnlijk

hebben vroegere onderzoekers volkomen juist geobserveerd, waar zij vacuolen in de bacteriecel vermelden, daar het optreden van vacuolen bij coacervaten een reeds waargenomen verschijnsel is.

Daar men in jonge individuen over het algemeen een homogenen, bij oudere en natuurlijk vooral bij involutievormen een gekorrelden celinhoud waarneemt, waarin nog vacuolen kunnen liggen, ligt het onzes inziens voor de hand, mede omdat het optreden van coacervatie een stap is op den weg der uitvlokking van colloïdale deeltjes, aan te nemen, dat korrels in bacteriën worden aangetroffen kort voor haar afsterven.

Pietschmann en Rippel gaan onzes inziens iets te ver, wanneer zij zeggen: „Das Aufhören der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien fällt nach diesen Versuchen mit dem Beginn der Entmischung der nuclealpositiven Substanz zusammen", en wel op grond van het feit, dat de involutievormen, waarin deze ontmenging reeds aanwezig was, bij mij wel tot vermeerdering te brengen waren.

Zooals wij reeds vermeldden, achten wij het mogelijk, dat B. diphtheriae met B. tuberculosum en nog eenige andere bacteriën op grond van haar korrelstructuur tot een afzonderlijke klasse van bacteriën te rangschikken zouden zijn. Aangezien de korrels in B. diphtheriae reeds na acht tot zestien uur ontstaan, in B. pseudodiphtheriae eerst na vierentwintig tot achtenveertig uur, meenen wij gerechtigd te zijn aan te nemen, dat de korrels in B. diphtheriae iets bijzonders zijn, de korrels in B. pseudo-diphtheriae coacervaatdruppeltjes, zooals die in vele andere oude bacteriën voorkomen.

Aangezien bij het ontstaan van involutievormen op LiCl-houdende voedingsbodems ongetwijfeld de electrolytconcentratie binnen de cel hooger is, dan zulks onder normale omstandigheden het geval is, vinden wij hierin mede een argument, om het ontstaan van een gekorrelden celinhoud bij dergelijke vormen te verklaren. Het aanwezig zijn van zulke korrels in de cel zal echter nog geen bewijs kunnen zijn voor het bestaan eener kern, zooals Kuhn aanneemt, vooral niet, zooals reeds vermeld is, indien deze korrels in gekleurde praeparaten aangetoond worden.

Om op grond van inwendige structuren in gekleurde praeparaten een levenscyclus op te bouwen, schijnt mij eveneens verwerpelijk toe. Ook in de verhandeling van Pietschmann en Rippel over het kernvraagstuk bij de bacteriën komen onder vele in denzelfden geest luidende zinsneden, die wijzen op coacervatie, deze

voor: „Diese Entmischung beginnt mit dem Auftreten feinster, noch kaum wahrnehmbarer Körnchen und endet mit einem oder mehreren gröszeren Körnchen,....." en: „Man hat den Eindruck, dasz der Vorgang der Entmischung ein ganz ähnlicher ist, wie er normal-physiologisch beim Auftreten kleiner und gröszerer Fettropfen zu beobacten ist,.....".

Stapp en Zycha zijn eveneens van meening, dat de diffuse verdeeling van het protoplasma in de cel de normale toestand is. De involutievormen werden door hen met den micromanipulator geïsoleerd en onder het microscoop vervolgden zij hun verder lot. Zij vonden echter, in tegenstelling met wat ik waar nam, dat deze involutievormen geen levensvatbaarheid bezaten, zelfs niet, zooals zij vermelden, wanneer de brekingsindex van de cel slechts weinig van dien der normale cellen verschilde. Wel werd door mij geen levensvatbaarheid geconstateerd bij door bacteriophaag gezwollen vormen.

Ons onderzoek geeft ons nog aanleiding tot een beschouwing over den bacteriophaag.

Afgezien, of men in den bacteriophaag een levend organisme ziet, dan wel een ferment, men dient zich wel rekenschap te geven, dat de bacteriophaag zich gedraagt als een negatief geladen colloïdaal deeltje.

Men zal vele verschijnselen, die men bij bacteriophaagproeven waarnam, dan ook gemakkelijk kunnen verklaren, indien men slechts let op zijn colloïdale natuur.

Zonder verder hierop in te gaan, zal het voor een ieder, die eenigszins met de colloïdchemie op de hoogte is, mogelijk zijn, voor de tientallen proeven, die d'Herelle op dit gebied deed, een afdoende verklaring te vinden, daarbij slechts lettend op de colloïdale natuur van het phaagdeeltje.

LITERATUUR.

1) Antoni van Leeuwenhoeck, Arcana naturae detecta, Lugduni Batavorum, 1772.

2) O. F. Müller, Animalcula infusoria, fluviatilia et terestria, Hauniae 1786.

3) C. G. Ehrenberg, Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen, Leipzig, 1838.

C. G. Ehrenberg, Ueber die seit 17 Jahren noch wohlerhaltenen Organisationspräparate des mikroskopischen Lebens, Abhandl. der K. Akad. der Wissensch. zu Berlin 1862.

4) M. Perty, Zur Kenntnis kleinster Lebensformen, Bonn 1852.

5) F. Cohn, Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte mikroskopischer Algen und Pilze, Nova Acta Acad. Caes. Leop. Carol. Nat. Cur. Vol. XXIV, P. I.

F. Cohn, Ueber den Brunnenfaden (Crenothrix polyspora-; Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I. Heft 1, 1870.

F. Cohn, Untersuchungen über Bakterien; Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. I, Heft 2, 1872.

F. Cohn, Untersuchungen über Bakterien II; Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. I, Heft 2, 1875.

F. Cohn, Untersuchungen über Bakterien IV; Beiträge zur Biologie der Bacillen, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft 2, 1876.

6) C. v. Nägeli, Die niederen Pilze in ihren Beziehung zu den Infektionskrankheiten, München 1877.

C. v. Nägeli, Gattungen einzelliger Algen, 1848.

7) E. Hallier, Parasitologische Untersuchungen, Leipzig 1868.

E. Hallier, Die pflanzlichen Parasiten des menschlichen Körpers, u.s.w. Leipzig 1866.

8) de Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakteria, 1884.

de Bary, Vorlesungen über Bakterien, II Aufl. 1887.

9) Th. Billroth, Untersuchungen über die vegetationsformen von Coccobacteria septica, Berlin 1874.

10) J. Lister, On the germ theory of putrefaction and other fermentative changes, Nature, July 10 and 17, 1872.

J. Lister, A further contribution to the natural history of Bacteria and the germ theory of fermentative changes, Quarterly Journal of microscopical science V, XIII, New Series 1873, p. 380.

11) Ray, Lankester, On a peach-coloured Bacterium, Bacterium rubescens n. sp., Quarterly Journal of microscopical science V, XIII, New Series 1873.

12) R. Koch, Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte der Bacillus anthracis, Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. II, 1876, Heft 2, p. 277.
R. Koch, Dtsch. med. Wschr. 1878, Nr. 1, 2 u. 43.
13) L. Pasteur, Die Alkohol-Gährung, Augsburg 1871.
L. Pasteur, Etudes sur le vin, Paris 1875.
L. Pasteur, Etudes sur la bière, Paris 1876.
14) A. Fischer, Vorlesungen über Bakterien, Jena, 1903.
A. Fischer, Untersuchungen über Bakterien, Pringsheim's Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik Bd. XXVII, Heft 1, 1895.
15) H. de Vries, Die Mutationstheorie I (1901), II (1903) Leipzig.
16) V. Jollos, Zbl. Bakt. I Orig., **93**, 22 (1924).
17) M. Neisser, Zbl. Bakt. I Ref., **38**, Beih., 98 (1906).
18) R. Massini, Arch. Hyg., Berin, **61**, 250 (1907).
19) R. Müller, Zbl. Bakt. I Orig. **52**, Beih. 57 (1908) en **58**, 97 (1911).
R. Müller, Dtsch. med. Wschr. **36**, 2387 (1910).
20) M. W. Beyerinck, Folia microbiolog. Holländ. Beitr. z. gesamt. Microbiolog. Jg. **1**, 1912, p. 2—100.
21) K. Baerthlein, Arb. Gesundh. Amt., Berlin **40**, 433 (1912); Zbl. Bakt. Abt. I Orig., **81**, 369 (1918).
22) P. Eisenberg, Zbl. Bakt. I Orig. **40**, 188 (1906); Ergebn. Hyg. **1**, 28 (1914).
23) E. Almquist, Zbl. Bakt. Abt. I, Orig. **37**, 18 (1904); Z. Hyg. Infekt. Kr. **83**, 1.
E. Almquist, Biologische Forschungen über die Bakterien, Stockholm 1925.
24) F. Fahrmann, Verhdlg. d. Ges. Dtsch. Naturforscher u. Aerzte. 78. Versammlung Stuttgart 1906.
25) E. C. Hort, Proc. roy. Soc. Lond. Ser. B **89**, 468 (1917).
26) F. Löhnis, National Academy of Sciences, Memoirs **16** (1922).
F. Löhnis & N. R. Smith, J. Agric. Res., **23**, 401 (1923) **6**, 676 (1916).
27) G. Enderlein, Bakterien-Cyklogenie, Berlin-Leipzig 1925.
G. Enderlein, Med. Welt 1930 No. 43.
28) R. R. Mellon, Studies in Microbic Heredity, 1925/26.
29) Ph. Hadley, J. inf. Dis. **40**, 1 (1927); **42**, 263 (1928).
Science. Vol. **75**, (1932), p. 665—666.
30) J. A. Arkwright, J. of Path. **24**, 36 (1921).
J. A. Arkwright, A System of Bacteriology, Medical Research Council 1930 Bd. **9**, p. 311.
31) P. De Kruif, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **19**, 34 (1921); J. Exper. Med. **33**, 773 (1921).
32) E. Weil & R. Felix, Wien. Klin. Wschr. **30**, 1509 (1917); Z. Immun. Forsch., Tl. I, Orig. **29**, 24.
33) Ph. Kuhn, Münch. med. Wschr. 1919 No. 46; 1926 No. 35; 1927 No. 15.
Ph. Kuhn, Berl. Klin. Wschr. 1921 No. 13.
Ph. Kuhn, Zbl. Bakt. I, Orig. **89**, Beih. 199 (1922); 93 Beih. 280 (1924).
Ph. Kuhn, Arch. J. Schiffs- u. Tropenhyg., Beih. 1926, 134.
Ph. Kuhn, Med. Klin. 1929. No. 35; 1930, No. 20.

Ph. Kuhn u. K. Sternberg, Z. Mikrosk. **38**, 369 (1921).
Ph. Kuhn u. K. Sternberg, Med. Klin. 1927, No. 43.
Ph. Kuhn u. K. Sternberg, Zbl. Bakt. I Orig. **121** (1931).
34) E. Friedberger & F. Schiff, Z. Immun. forschung **35**, Tl. I, Orig. 268 (1922).
35) R. Friedberger & G. Meissner, Klin. Wschr., **2**, 449, (1923).
36) P. Hauduroy, C. R. Soc. Biol., Paris, **91**, 1209, 1325 (1924).
37) A. Fontes, Mem. Inst. Ostwaldo Cruz, **2**, 141 (1910).
38) A. Vaudremer, C. R. Soc. Biol., Paris, **89**, 80 (1923).
39) A. Calmette, „L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux", Paris 1922. Bull. Inst. Pasteur **26**, 889. (1928).
A. Calmette et J. Valtis, Ann. Inst. Pasteur **44**, 629 (1927).
40) H. Much, Zeitr. z. Klinik d. Tuberk. **8** (1907).
41) J. C. H. Broek, Diss. Utrecht 1931.
42) S. L. Schouten, Handel. Natuur- en Geneesk. Congres Haarlem 1899 Z. wiss. microsc. u. f. microsc. Technik, Bd. **22**, 10 (1905).
43) J. Valtis, C. T. Soc. Biol. Paris **90**, 17 en 74, (1924).
44) R. Feulgen, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Abt. V, **2**, 1055—1073 (1926).
45) K. Pietschmann, Archiv f. Mikrobiol. Bd. II, Heft 2, p. 310 (1931).
K. Pietschmann & A. Rippel, Arch. f. Mikrobiol. Bd. III, Heft 3 p. 422 (1932).
46) H. Braulke, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **115**, 25 (1933).
47) E. Klieneberger, Zbl. Bakt. I, Orig. **126**, 278 (1932).
Ergebn. d. Hyg. Bakt., Imm. forsch. u. Exp. Therapie Bd. XI, p. 499 (1930).
48) J. R. Drenth, Diss. Groningen 1926.
49) P. C. Flu, Ned. tijdschr. v. Hyg. Microbiol. en Serol. VIII p. 102, (1934).
50) O. Richter, Handworterbuch der Naturwissenschaften 2e Aufl. Fischer, Jena, 1933.

STELLINGEN

I

Pettenkoferiën zijn degeneratievormen van bacteriën.

PH. KUHN en K. STERNBERG.
Zbl. Bakt. I. Orig. Bd. 121, p. 1.

II

Het is niet bewezen, dat Sarcina gigantea een kern heeft.

H. F. M. PETTER. Ann. Inst. Past. 51, 742 (1933).

III

De „calorimetrische analyse" kan niet met zekerheid de onzuiverheid van stoffen aantoonen.

J. STRAUB en R. N. M. A. MALOTAUX.
Recueil 52. p. 275 (1433).

IV

Voor de waardebepaling van gelatine is de viscositeitsmeting niet van waarde.

V

De formuleering der structuur van het prodigiosine, zooals gegeven door F. WREDE is aanvechtbaar.

H.S. 215, 67 (1933); 219, 207 (1933); 220, 203 (1933).

VI

Bij de destructie, noodig bij de stikstofbepaling volgens KJELDAHL, verdient het aanbeveling Se als katalysator te gebruiken.

M. P. LAURO, J. Ind. Eng. Ann. 3. 401. (1931).

VII

De pentosaanbepaling als barbituurzuurverbinding verdient de voorkeur boven andere methoden.

W. GIERISCH, Cellulose chemie 1925 6, 61, 81.

VIII

Het verdient aanbeveling de grensreactie op arseen in de Pharmacopee uit te breiden tot de organische verbindingen.