ONDERZOEKINGEN OVER DE AËROBE CELLULOSEONTLEDING IN DEN GROND

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS, DR. S. C. J. OLIVIER, HOOGLEERAAR IN DE SCHEIKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN EEN COMMISSIE UIT DEN SENAAT DER LANDBOUWHOOGESCHOOL TE WAGENINGEN TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 26 JUNI 1946 DES NAMIDDAGS TE 15 UUR

DOOR

GEORG WILHELM HARMSEN
LANDBOUWKUNDIG INGENIEUR
GEBOREN TE ST. PETERSBURG

BIJ J. B. WOLTERS' UITGEVERS-MAATSCHAPPIJ N.V.
GRONINGEN — BATAVIA — 1946

Het voltooien van dit proefstuk biedt mij de gelegenheid een woord van dank te richten tot degenen, die het meest hebben bijgedragen tot mijn vorming en tot het tot stand komen van deze studie.

Allereerst gaan mijn gedachten dan terug naar den tijd, toen ik mocht werken aan het Microbiologisch Laboratorium te Wageningen, onder leiding van Prof. SÖHNGEN. Het werken naast en met Söhngen was een voortdurend genot en een openbaring. Zijn steeds origineele en fascineerende visie op de in studie zijnde problemen wees mij vanaf de eerste dagen van mijn verblijf op zijn laboratorium den principieel juisten weg bij het wetenschappelijke onderzoek. Maar ook later, na het voltooien mijner studie, bleef Söhngen steeds mijn vanzelfsprekende raadsman, die echter nooit het initiatief zoodanig in eigen handen nam, dat hij het daardoor bij zijn leerling zou dooven. In overleg met hem is ook reeds de grondslag gelegd voor deze studie van de cellulose-ontleding.

Doch niet alleen als microbioloog en wetenschappelijk werker wist Söhngen een grooten invloed op zijn leerlingen uit te oefenen. Even groot was de bezielende invloed, die van hem als mensch uitging. Naast mijn ouders was Söhngen dan ook degene, die mij het meest geboden heeft voor mijn geestelijke vorming. Na zijn vroegtijdig heengaan behield ik langen tijd het gevoel van vereenzaming.

Mij nu richtende tot de latere jaren, kan ik niet nalaten U, Hooggeleerde SMIT, mijn dank te betuigen voor al het, U zoo weinig bevrediging gevende, werk, verbonden aan het voltooien van deze studie. Het is stellig een zeer weinig animeerende taak om een U geheel vreemd werk te moeten bekritiseeren en zoodanig wijzigen, dat het een ook U bevredigend geheel wordt. Dat U zich hieraan niet hebt willen onttrekken, doch in tegendeel Uw volle aandacht aan mijn werk hebt willen wijden en dat in een, op het laatst, voor U zoo zwaren tijd, heb ik ten zeerste gewaardeerd.

De tijd op Uw laboratorium doorgebracht, Hooggeleerde QUANJER, heeft mij reeds in een vroeg stadium van mijn studie getoond hoe boeiend de wereld der microörganismen is.

Aan U, Hooggeleerde OLIVIER, zal ik steeds dank verschuldigd

blijven voor Uw bezielende en heldere colleges en voor de hulp, die ik in latere jaren van U mocht ondervinden, als ik in chemische problemen verstrikt raakte.

Een zeer speciaal woord van dank wil ik tot U richten, Hooggeleerde TENDELOO. Nooit klopte ik bij U tevergeefs aan om raad en hulp, niettegenstaande ik mij niet tot Uw leerlingen mag rekenen.

De beschikbare ruimte verbiedt het mij helaas U allen, Hooggeleerde VAN UVEN, ROEPKE, BAKKER, MAYER-GMELIN, HONING en REINDERS ieder persoonlijk mijn dank te brengen voor Uw colleges en voor de verdere leiding die ik van U mocht ondervinden. De veelzijdigheid van mijn landbouwkundige en wetenschappelijke vorming is slechts mogelijk geweest door Uw aller bijdragen.

Evenveel dank ben ik verschuldigd ook aan de nagedachtenis dergenen van mijn leermeesters, die helaas reeds zijn heengegaan. Ik denk daarbij vooral aan de eminente persoonlijkheid van ABERSON en aan het onvermurwbare enthousiasme van BROEKEMA.

Een zeer grooten steun heb ik tijdens mijn studie te Wageningen, maar ook later, ondervonden van U, zeergeleerde WIERINGA, als mijn leermeester en oudere collega. Wees overtuigd van mijn diepgevoelden dank daarvoor.

Daarnaast moet ik er nog op wijzen, dat de voltooiing van deze studie steeds zeer veel steun heeft ondervonden van de grif geboden hulp van den helaas veel te vroeg overleden Dr. VERWEEL en in de laatste jaren van U, zeergeleerde QUISPEL. Geen moeite was U beiden te veel om mij met raad en daad ter zijde te staan.

Ook aan U, waarde SLAGTER, LINDENBERGH, SCHUUR, OTZEN en Mevr. QUISPEL-MÖRZER BRUYNS, ben ik zeer veel dank verschuldigd voor het vele en vaak zeer eentonige werk, dat U hebt moeten verrichten bij de ontelbare analyses, overentingen en fotografische opnamen, die noodzakelijk waren.

Zeer veel moreelen steun heb ik ook ondervonden van U, waarde FEEKES, ZUUR, BOSMA, KALISVAART en DOMINGO.

Voor de hulp bij het taaie vertalen en de taalkundige correctie van het oorspronkelijke manuscript ben ik ook U, hooggeachte VAN HOUTEN en U Mevr. PLAAT-VISSCHER, mijn welgemeenden dank verschuldigd.

Ten slotte wil ik U, hooggeachte SMEDING, mijn diep gevoelden dank betuigen voor de gelegenheid die U mij hebt geboden om mijn practische werk zoodanig uit te breiden, dat het een afgerond geheel is kunnen worden van voldoende algemeen belang om als proefschrift te kunnen dienen.

Al het bovenstaande had echter niet geschreven kunnen worden, als ik geen hulp had gehad, die mij de materieele mogelijkheid had

gegeven mijn studie te voltooien. In dankbare herinnering gedenk ik dan U, Hooggeachte TER HORST, doch niet alleen en zelfs niet in de eerste plaats voor deze hulp, maar nog meer voor den voortdurenden steun en zelfs vriendschap, die ik van U mocht ondervinden. Hoe zeer had ik er dan ook op gerekend, dat ook U de voltooiing van deze studie nog zou meemaken. Door de vertraging der afwerking, als gevolg van de oorlogsomstandigheden, mocht dat echter niet meer zoo zijn.

En dan ten slotte de alles overheerschende invloed van mijn vader. Hij was het immers, die bij mij reeds als kind de belangstelling voor de levende natuur wakker riep en hij was het ook, die mij de grondprincipes van wetenschappelijk werk inprentte.

Het experimenteele werk en de litteratuurstudie, die aan dit werk ten grondslag liggen waren reeds voltooid in 1939. Ook het oorspronkelijke manuscript was toen gereed. De oorlogsomstandigheden — mijn mobilisatie in Aug. 1939, de daaropvolgende overplaatsing van het laboratorium der Wieringermeerdirectie van Medemblik naar Kampen in 1940, de noodzaak het manuscript te vertalen en ten slotte de onmogelijkheid van drukken en promoveeren gedurende de laatste bezettingsjaren — hebben het nú pas mogelijk gemaakt deze studie in druk te doen verschijnen. Op het allerlaatste oogenblik zijn mij nu overdrukken van enkele gedurende de oorlogsjaren in Amerika, Rusland en Zweden verschenen publicaties onder oogen gekomen, die enkele onderwerpen van mijn studie behandelen en die daarbij vaak zelfs verder zijn doorgedrongen, dan ik het heb gedaan. Helaas was het in het gegeven stadium van het publiceeren niet meer mogelijk hun uitkomsten — die grootendeels met de mijne overeenkomen — in den tekst te vermelden. Ik heb mij er dan ook toe moeten beperken deze moderne, gedurende den oorlog voor ons ontoegankelijke, werken achter aan de litteratuurlijst toe te voegen en op de belangrijkste plaatsen in den tekst door middel van voetnoten er naar te verwijzen (zie pag. 91 en 97).

INHOUD.

Pag.

Inleiding 1

HOOFDSTUK I.

Overzicht der vroegere werken 5

§ 1. De oudere onderzoekingen 5
§ 2. De moderne litteratuur 15
1. *Cytophaga* 15
2. De overige myxobacteriën 24
3. Bakteriën en pseudomonadaceën 26
4. Bacillen 31
5. Schimmels en actinomyceten 33
6. Protozoën 34
§ 3. Werken van geringe beteekenis 35
§ 4. Bepaling van cellulose in den grond 36

HOOFDSTUK II.

De Methodiek 37

§ 1. Overzicht der meest gebruikelijke isoleeringsmethoden 37
§ 2. Overzicht der eigen isoleeringsmethoden 39
§ 3. Bereiding en gebruik van de celluloseagar 44
§ 4. Gebruik en bereiding van kiezelzuurplaten 49
§ 5. De chemische samenstelling der voedingsbodems 50
§ 6. Bepaling van het kiemgetal 52
§ 7. Kwantitatieve bepaling der celluloseontleding 53

HOOFDSTUK III.

Beschrijving der celluloseontledende organismen 55

§ 1. *Eubacteriales* 55
a. Vibrionen 56
Morphologische kenmerken 56
Voedingsphysiologische kenmerken 61
b. Sporenvormers (bacillen) 70
Morphologische eigenschappen 71
Voedingseischen der sporenvormers 77

§ 2. *Myxobacteriaceae* 85
a. *Cytophaga* 85
Morphologische byzonderheden 85
Physiologische byzonderheden 90
Systematische indeeling 91
Cytophaga-soorten, die geen cellulose splitsen 95
b. Polyangiden 97
Systematiek 98
Morphologische kenmerken 99
Voedingsphysiologische eigenschappen 104

Pag.
§ 3. *Actinomycetales* 106
a. Actinomyces 109
b. Micromonospora 114
c. Proactinomycetaceae 115
Proactinomyces 116
Mycobakteriën 117
§ 4. Eumyceten 119

HOOFDSTUK IV.

Het aantal en de beteekenis der cellulose ontledende microben in den grond 123
Inleiding 123
§ 1. Overzicht der litteratuurgegevens 123
§ 2. De toegepaste methoden 126
§ 3. Voorbeelden van enkele cultuurgronden 129
§ 4. Voorbeelden van enkele blijvend met water verzadigde gronden . 136
§ 5. Voorbeelden van zouthoudende mariene gronden 138
§ 6. Celluloseontleding in een tuincompost 142
§ 7. Verloop der celluloseontleding in grondmonsters met sterk gewijzigd vochtgehalte 144
§ 8. De invloed der temperatuur op de celluloseontleding 145
§ 9. „Hoofd"-soorten bij de celluloseontleding 146
§ 10. Beteekenis van de specificiteit der cellulosesplitsers 150
§ 11. Resumé 153

HOOFDSTUK V.

Groeistofwerking bij de celluloseontleding 155
Inleiding 155
§ 1. De waargenomen typen van symbiose door groeibevordering . . . 160
§ 2. Keuze van den voedingsbodem 163
§ 3. De aard der bevorderende agentia 164
a. Diffusievermogen en diffusiesnelheid 165
b. Gevoeligheid voor warmte 167
c. Resistentie tegen uitdrogen 168
d. Bewaarbaarheid 168
e. Invloed der reactie 169
§ 4. De specificiteit der groeistoffen 170
a. Indeeling der microben 171
b. Specificiteit der microbenerginen 172
c. Specificiteit der extracten van plantaardige en dierlijke weefsels 174
d. Werking van gronddecoct 176
§ 5. Enkele voorbeelden van groeibevordering 179
§ 6. „Coöperatie-groepen" van microben in den grond 189
§ 7. Methodiek van het kweeken van cellulose splitsende microben, die groeistoffen vereischen 193
Samenvatting 197
Summary 206
Alphabetisch register der litteratuur over aërobe celluloseaantasting 215
Afbeeldingen.

INLEIDING.

De rechtstreeksche aanleiding tot het instellen van een nader onderzoek naar de aërobe celluloseontleding in den grond is gelegen in het besef, dat de hedendaagsche kennis van dit proces nog té gebrekkig is om het met vrucht te kunnen gebruiken voor de karakteriseering van gronden met behulp van serieonderzoekingen. Het onderzoek der drooggelegde gronden in de Zuiderzeepolders — in eerste instantie van de Wieringermeer — maakte het n.l. noodzakelijk het geheele rijpingsproces dezer gronden ook microbiologisch te kunnen vervolgen. Men moest daarvoor dus beschikken over betrouwbare en tevens eenvoudige methodes voor serieanalyses. Bij de keus van de hiervoor het meest in aanmerking komende grootheden, werd al spoedig ook aan de aërobe celluloseontleding gedacht, daar dit één der belangrijkste dissimilatieprocessen is, waarop de mineralisatie van de organische stoffen in den grond berust. De meeste plantaardige afvalstoffen bestaan immers voor het grootste deel uit cellulose, zoodat men de celluloseafbraak met recht als de spil van alle mineralisatieprocessen in den grond kan beschouwen.

Al spoedig rezen bij het uitwerken van voor serieanalyse geschikte methodes ter bepaling van de celluloseontleding en voor het vaststellen van het aantal cellulose ontledende microben talrijke en — naar het aanvankelijk leek — onoverkomelijke moeilijkheden. Telkens kwam ik voor onaangename verrassingen te staan en verkreeg ik volkomen onbegrijpelijke uitkomsten, die alle daarop wezen, dat de cellulose ontledende bodemmicroben nog onvoldoende bekend en onderzocht zijn.

Een uitgebreide litteratuurstudie bracht hierin ook al geen uitkomst. Integendeel zag ik daardoor pas duidelijk in, dat de celluloseontleding nog slechts bij wijze van steekproeven onderzocht is; er zijn wel vele gegevens over verzameld, maar een volledig overzicht ontbreekt nog ten éénen male. Het gevolg hiervan is een verbijsterende verscheidenheid in de zienswijzen en opvattingen der verschillende onderzoekers.

De opzet van het onderstaande werk moest toen dus sterk uitgebreid worden, zoodat het al ras ver buiten den oorspronkelijken omvang uitgroeide. Ten slotte werd zelfs de meest radicale consequentie getrokken en stelde ik mij als einddoel voor oogen een afgerond alzijdig onderzoek naar de bacterieele celluloseontleding, waardoor

het mogelijk zou zijn in den chaos van meeningen en opvattingen een zekere ordening aan te brengen en de leemten in onze kennis aan te vullen. Uit den aard der zaak was dit doel in zijn algemeenheid te breed om binnen een redelijk tijdsbestek tot vruchtbare resultaten te leiden; daarom werd van den beginne af aan een beperking aanvaard tot slechts een deel van alle mogelijkheden, nl. tot de *aërobe* cellulose-ontleding, en dan ook nog alleen *in den grond*. Hiermede werd dus alleen datgene in het onderzoek betrokken, wat van direct belang is voor de behandeling van landbouwkundig bruikbare gronden, waarin de anaërobe cellulosevergisting nauwelijks een rol speelt.

Maar ook in dezen besnoeiden vorm bleek het probleem nog een onverteerbaar groot brok te zijn, zoodat het niet van alle kanten tegelijk aangevat kon worden, doch in onderdeelen verdeeld moest worden. Men kan, zooals dat bij elk physiologisch begrensd microbiologisch onderwerp het geval is, ook de celluloseontleding zoowel van systematisch-morphologisch standpunt bekijken — daarbij voornamelijk de erbij betrokken organismen analyseerende — als ook van physiologisch standpunt — waarbij de afbraak der cellulose kwalitatief en kwantitatief in het middelpunt van de belangstelling staat. Hoewel de tweede weg de aangewezene is voor het verkrijgen van voor de practijk van den landbouw onmiddellijk bruikbare methodes en gegevens, is voor een grondiger opgezet onderzoek een voorafgaande systematisch-morphologische oriënteering toch onontbeerlijk. Vandaar dan ook, dat ik, na het uitwerken van zuiver empirische methodes voor het bepalen van de sterkte der celluloseontleding in den grond, deze werkwijze niet nader ging kritiseeren en vervolmaken, maar haar vooreerst in dezen voorloopig bruikbaren vorm voor het routinewerk in de Wieringermeer aanvaardde en mij ondertusschen toelegde op een analyse van de geheele physiologische groep der cellulose splitsende microben, en pas daarna, langs den weg van het onderzoek van reine cultures, over symbiosen en „coöperatiegroepen", tot populaties en dus wederom tot het probleem der celluloseontleding in den grond in haar geheél terugkeerde. Het onderhavige werk omvat alleen de eerste phase in den bovengeschetsten gang van zaken, dus het onderzoek naar de cellulosesplitsers in den grond, terwijl het biochemische proces der celluloseontleding en de consequenties daarvan voor bodemvorming, plantengroei en landbouw voor een later onderzoek gereserveerd moeten blijven.

In den loop van het onderzoek bleek het noodzakelijk te zijn nog meer beperkingen aan te brengen om met den beschikbaren tijd en middelen uit te komen. Zoo moest o. a. afgezien worden van een regionaal onderzoek, en werden slechts enkele representatieve grond-

soorten nader bekeken, hoe wenschelijk het voor het algemeene inzicht ook moge zijn meer grondsoorten en ook andere klimaten in het onderzoek op te nemen. Bovendien werden de schimmels slechts zeer oppervlakkig bestudeerd; niet wegens miskenning van hun groote beteekenis voor de celluloseontleding in den grond, doch omdat ten opzichte van de schimmels na de onderzoekingen van OTTO (129), WAKSMAN (191, 194, 205) en anderen weinig verschil van meening bestaat. De bacteriën daarentegen zijn nog zeer onvoldoende bekend en de opvattingen der verschillende onderzoekers spreken elkaar daarbij vaak volkomen tegen. De bacteriën moesten dus allereerst onder de loupe genomen worden.

Zoo is dus het geheele werk gaandeweg ingekrompen tot slechts een fractie van den oorspronkelijken opzet, welke fractie bovendien nog niet altijd met de gewenschte grondigheid en veelzijdigheid verricht kon worden. Het resultaat moet dan ook niet als een fundamenteele oplossing der gestelde vragen gezien worden, doch slechts als een eerste poging daartoe. Toch moet er hier terstond op gewezen worden, dat — hoewel van het voorgenomen breede onderzoek veel noodgedwongen prijsgegeven moest worden — ik steeds bleef streven naar een alzijdige behandeling van de stof al was het dan ook binnen bepaalde nauwe perken. Het doel was niet een gedetailleerd onderzoek van enkele cellulosesplitsers, maar een opzoeken van zooveel mogelijk soorten en slechts een orienteerend bestudeeren van dezen.

Mijn poging was dus vooral gericht op een zóódanig volledige exploratie en catalogiseering van de aërophiele cellulose ontledende microben in den grond, dat men haar als vrijwel compleet zou kunnen beschouwen. Daardoor werd immers pas de mogelijkheid geopend om ook het sociologische element in de bodemmicrobiologie te betrekken. Het wil mij n.l. voorkomen, dat de tijd rijp is voor dezen stap. De hoeveelheid losse waarnemingen en gegevens is in den loop der tijden voldoende aangegroeid om nu met kans op succes de noodzakelijke completeering in het echte „floristische zoeken" te kunnen aanbrengen en dan ook de eerste pogingen te doen voor het vaststellen der voornaamste sociologische wetmatigheden in de heterogene populatie der microörganismen in den grond.

Voor het bereiken van het boven uiteengezette doel bij de studie van de aërophiele cellulose ontledende microben moest een weg worden ingeslagen, die lang en tijdroovend is; maar hij bleek wel begaanbaar te zijn. Daardoor ben ik gesterkt in mijn overtuiging, dat in de microbiologie, naast een verder voortgezette analyse, ook plaats is voor een synthese, dus voor het opbouwen van een volledig beeld der

microbensamenlevingen en voor de vergelijkende studie van de rol der verschillende leden dezer samenlevingen in hun natuurlijk milieu. Ik steun daarbij niet in de laatste plaats op het gelijksoortige streven van WINOGRADSKY, zooals hij dat geformuleerd heeft in zijn werken van de laatste 15 jaren (216, 217). Met de door hem daarbij gevolgde methodiek kan ik mij echter niet vereenigen.

OVERZICHT DER VROEGERE WERKEN.

§ 1. DE OUDERE ONDERZOEKINGEN.

De alleroudste onderzoekingen over de celluloseontleding kunnen hier zoo goed als onbesproken blijven, aangezien zij voor ons nog maar een historische waarde hebben.

De eerste berichten over celluloseafbraak door microben dateeren reeds uit de jaren 1850 tot 1860. In het begin spitste het geheele probleem zich toe op de vraag óf er in 't algemeen een afbraak van zuivere cellulose door microorganismen mogelijk is. Tot deze periode behooren de publicaties van MITSCHERLICH, HAUBNER, HENNEBERG, STOHMAN, DE BARY, MARSHALL-WARD, BEHRENS en anderen. Vrij langen tijd, tot ca. 1895, werd in navolging van VAN TIEGHEM (183) de bekende *Bacillus amylobacter* voor de voornaamste of zelfs de eenige cellulose aantastende bacterie aangezien. Deze zienswijze was vermoedelijk een gevolg daarvan, dat dit opvallend groote organisme in vrijwel alle ontledende plantaardige stoffen aanwezig was, terwijl de eigenlijke cellulosesplitsers veel kleiner zijn, zoodat zij langen tijd over het hoofd gezien werden. Bovendien was de autoriteit van VAN TIEGHEM zoo groot, dat een tegenovergestelde meening niet gemakkelijk ingang vond. Op dit standpunt staan dan ook vrijwel alle mededeelingen uit dien tijd, zoo o. a. die van REINKE en BERTHOLD (146), POPOFF (134), HOPPE-SEYLER (58, 59), ZUNTZ (220) en zelfs van VAN SENUS (186). Alleen PRAZMOWSKI huldigde een afwijkend standpunt (135, 136).

Een tweede bijzonderheid van het onderzoek uit die dagen is de groote voorkeur voor de anaërobe gisting. Dit met gasontwikkeling gepaard gaande proces trok toen veel meer de aandacht dan de onopvallende, maar overigens veel belangrijkere aërobe ontleding van de celstof. Het was dan ook pas in 1903, dat de aërobe celluloseontleding definitief aangetoond en beschreven werd (VAN ITERSON 66, 67), terwijl de anaërobe cellulosegisting reeds omstreeks 1875 door POPOFF (134) en HOPPE-SEYLER (58, 59) definitief aangetoond was.

Naast de eigenlijke celluloseontleding interesseerde men zich toen ook voor de vraag, hoe de vertering van de cellulose in den darm der herkauwers geschiedde. Aanvankelijk zocht men naar een door de darmwand afgescheiden enzym; maar de onderzoekingen van

TAPPEINER (175, 176) toonden omstreeks 1880 aan, dat deze vertering op rekening van de gisting door microben gezet moest worden.

Aanzienlijk moderner van opzet en uitvoering waren reeds de mooie onderzoekingen van VAN SENUS (166) uit het jaar 1890, die onbewust vermoedelijk reeds zuivere cultures van cellvibrionen in handen gehad heeft. Hij heeft ook al aangetoond, dat *Bac. amylobacter* alléén niet in staat is cellulose af te breken en daarvoor op symbiose met andere organismen aangewezen is. Hiermede was al twijfel aan de beteekenis van *Bac. amylobacter* gewekt, zoodat eenigen tijd later (± 1902) OMELIANSKI (123, 124, 125) gemakkelijk aantoonen kon, dat de rollen eigenlijk omgedraaid moesten worden en juist de onopvallende organismen de cellulose afbreken, terwijl *B. amylobacter* slechts een begeleidend organisme is. OMELIANSKI onderzocht en beschreef voor 't eerst echte cellulose ontledende bacteriën, n.l. anaërobe sporenvormers. Dit klassieke werk heeft voor vele andere onderzoekingen als grondslag gediend, niettegenstaande OMELIANSKI er nog niet in geslaagd was, werkelijk reine cultures te winnen en hij dus ook het chemisme van de celluloseafbraak door zijn organismen niet juist kon leeren kennen, daar hij steeds alleen het eindresultaat van de werking van de eigenlijke celluloseontleders én van de hen begeleidende organismen bestudeeren kon.

De volgende belangrijke bijdrage tot onze kennis van de celluloseontleding werd in 1903 geleverd door VAN ITERSON (66, 67), die verscheidene aërobe cellulose splitsende organismen naast de anaërobe en semi-anaërobe beschreef. Vermoedelijk heeft VAN ITERSON reeds *Cytophaga*-cysten en ook cellvibrionen onder oogen gehad. Daar hij echter ook alleen met ruwe cultures werkte en den levenscyclus van zijn organismen niet nader onderzocht, is het naderhand niet mogelijk met zekerheid na te gaan, welke organismen hij vóór zich had. Het belangrijkste van zijn onderzoekingen is trouwens niet de beschrijving der betreffende microben, maar de verbeterde inzichten in de chemische processen tijdens de ontleding der cellulose. VAN ITERSON deelt ook duidelijk en systematisch de mogelijkheden in, waaronder de celluloseaantasting kan plaats hebben en onderscheidt daarbij:

1. De volkomen anaërobe vergisting met vorming van CO_2 en CH_4 of H_2 naast vluchtige zuren; 2. de aërobe ontleding der cellulose in anaërobe omgeving bij aanwezigheid van zuurstof-leverende stoffen, zooals nitraten, zoodat CO_2 en N_2 als gasvormige producten ontstaan en 3. de volkomen aërobe ontleding zonder vorming van gasvormige producten. Naast de bacteriën heeft VAN ITERSON ook talrijke cellulose verterende schimmels geïsoleerd en beschreven.

Ook daarmede heeft hij een belangrijke stap voorwaarts gedaan, aangezien vóór dien slechts aanvechtbare, gebrekkig opgezette onderzoekingen over de celluloseontleding door schimmels verricht waren (DE BARY, MARSHALL-WARD, BEHRENS en enkele anderen).

Op de periode van snellen vooruitgang in de dagen van OMELIANSKI en VAN ITERSON volgden bijna 10 jaren, waarin geen noemenswaardige publicaties over celluloseontleding verschenen. Slechts enkele speciale gevallen werden beschreven (DISTASO 41; MERKER 117; MÜTTERLEIN 120). Alleen het methodische werk van CHRISTENSEN uit het jaar 1910 verdient vermeld te worden (27). Deze heeft n.l. een methode uitgewerkt, waardoor het mogelijk werd de celluloseontleding in den grond kwantitatief te bepalen, door in den te onderzoeken grond papierschijven te leggen en de mate van hun ontleding na verloop van tijd te beoordeelen. Hierdoor was een zeer belangrijke completeering van de grondonderzoekmethode van REMY tot stand gebracht.

Pas in 1912 verschijnt wederom een belangrijke bijdrage tot de studie der bacteriëele celluloseontleding in den grond, n.l. de eerste publicatie van KELLERMAN en zijn medewerkers (84, 85). Al gauw werd deze eerste mededeeling gevolgd door verscheidene andere (86, 115, 116). In deze reeks van publicaties berichten zij over het isoleeren van verscheiden cellulose splitsende bacteriën uit verschillende gronden. Verreweg de meeste hunner stammen behooren, volgens hun beschrijving, tot de kleine, sporenlooze staafjes, met peritrich ingeplante zweepdraden. Toch deelen zij ze in de meeste gevallen in bij het geslacht *Bacillus*; sommige soorten echter noemen zij *Bacterium*. Naast al de kleine staafjes hebben zij trouwens ook een grooten sporenvormer geïsoleerd. Ook enkele kleine staafjes met lophotrich geplaatste zweepdraden — die zij *Pseudomonas* noemen — kwamen onder hun cultures voor.

Hoewel hun beschrijving van de geïsoleerde microben buitengewoon uitvoerig is en zij zich zelfs aan de opstelling van een voorloopige determinatietabel wagen, is het in de meeste gevallen toch bijna onmogelijk om achteraf uit te maken, welke bacteriesoorten bedoeld zijn. De gegevens hebben n.l. hoofdzakelijk betrekking op macroscopisch waarneembare kenmerken van de koloniën in en op verschillende voedingsbodems, terwijl de microben zelf slechts heel oppervlakkig beschreven worden. Het eigenaardige hierbij is, dat KELLERMAN c.s., evenals enkele andere onderzoekers uit dien tijd de meeste cellulose oplossende bacteriën onder de sporenlooze vormen, met peritriche ciliën, vinden, terwijl latere onderzoekers zulke vormen veel minder waarnamen. Ik vond eveneens de meeste cellulosesplitsers in heel andere groepen: bacillen, vibrionen, proactinomyceten, cyto-

phagen en myxobacteriën. En toch hebben KELLERMAN en zijn medewerkers dezelfde isoleerings-techniek gevolgd, die ook later vaak toegepast werd. Op deze wijze te werk gaande, vond ik bijna uitsluitend de karakteristieke vibrionen, die later door WINOGRADSKY (214) tot de groep „*Cellvibrio*" vereenigd werden. Zij kwamen echter zeer vaak voor, samen met andere, cellulose niet ontledende bacteriën van het door KELLERMAN beschreven type. Dit wekt het vermoeden, dat hij in de meeste gevallen niet met zuivere cultures werkte, maar met gemengde cultures van kleine cellulosesplitsende vibrionen en begeleidende bacteriën. Dit vermoeden wordt nog waarschijnlijker, doordat KELLERMAN zelf er over klaagt, dat zijn organismen na overenting op de gebruikelijke voedingsbodems het vermogen om cellulose te splitsen verloren en dan ook niet meer op celluloseagar teruggeënt konden worden. Uit eigen ervaring weet ik, hoe gemakkelijk men zich in dit opzicht kan vergissen, daar de begeleidende bacteriën vaak morphologisch zeer veel gelijken op de cellulosesplitsende. Het is daarom niet uitgesloten, dat van alle organismen van KELLERMAN slechts de als *Pseudomonas* beschreven soorten, de eene groote bacil (*B. amylolyticus* KELL. et all.) en misschien nog enkele van de overige stammen werkelijk cellulose spitsende bacteriën zijn, terwijl de meeste andere cultures symbiosen voorstellen, waarvan slechts de begeleidende bacterie morphologisch door KELLERMAN beschreven werd. Hij gebruikte n.l. voor zijn diagnose steeds de welig groeiende cultures op suiker- of aardappelagar, terwijl een werkelijk verlies van een zoo specifieke physiologische eigenschap als de cellulosesplitsing slechts zeer langzaam kan plaats hebben. Mij is het in elk geval niet gelukt dit verschijnsel ooit waar te nemen. In onberispelijk zuivere cultures bleek het vermogen om de cellulose aan te tasten altijd constant en ook na jarenlang bewaren op cellulosevrije voedingsbodems nog in onverzwakte mate aanwezig te zijn. Ook moet men er zich niet over verbazen, dat KELLERMAN zooveel gevallen van symbiose heeft waargenomen, daar onder de cellulose splitsende microben inderdaad zeer veel soorten worden aangetroffen, die slechts in symbiose met andere organismen tot ontwikkeling kunnen worden gebracht. (Zie hoofdstuk V).

De isoleeringstechniek van KELLERMAN c.s. bestond daarin, dat zij eerst cultures maakten in een electieven, vloeibaren voedingsbodem met daarin verdeeld filtreerpapier en na verscheidene overentingen daarmee celluloseagarplaten beënten. Zij waren de eersten, die deze platen met succes gebruikten. Dat zij, door aanvankelijk vloeibare voedingsbodems te gebruiken, het grootste gedeelte van alle cellulosesplitsers verwijderden en slechts een bepaalde groep overhielden, daarvan waren zij zich in het minst niet bewust. Naderhand brachten

zij nog een tweeden keer — eveneens geheel onbewust — een zeer sterke selectie tot stand door de cellulosesplitsende koloniën van de celluloseagarplaten op verschillende andere voedingsbodems, met oplosbare koolhydraten en proteïnen, over te enten en daarop rein te kweeken. Daardoor komt het, dat zij tenslotte slechts van díe soorten zuivere cultures verkregen, welke zich in vloeibare voedingsbodems op ondergedompelde cellulosevezels kunnen ontwikkelen, zonder hulp van begeleidende organismen op „synthetische" voedingsbodems groeien en niet specifiek op cellulose zijn aangewezen, maar ook uit andere verbindingen de vereischte energie kunnen putten.

Hoewel zij door hun eenzijdige isoleering slechts een klein deel der cellulosesplitsende bacteriën leerden kennen, komt aan KELLERMAN c.s. toch de verdienste toe, aangetoond te hebben, dat overal in den grond veel verschillende cellulose splitsende bacteriën voorkomen. In elk geval hebben hun publicaties inspireerend gewerkt, vooral omdat zij daarin vele malen in conflict kwamen met de toen heerschende meening. Zij bestreden zelfs de zienswijze van een zoo algemeen erkende autoriteit als OMELIANSKI en twijfelden aan de reinheid van diens cultures. Dientengevolge werden zij al heel spoedig van verschillende kanten aangevallen, hetgeen des te gemakkelijker was, omdat hun werk op vele plaatsen onvolledig en oppervlakkig bleek te zijn. Zoo wees OMELIANSKI (126) er terecht op, dat KELLERMAN er genoegen mee neemt, het ontstaan van heldere zones rondom de koloniën waar te nemen, maar dat hij overigens op geen enkele wijze het vermogen van zijn organismen om de cellulose te splitsen heeft onderzocht. Deze heldere zones kunnen, volgens OMELIANSKI, misschien verklaard worden, doordat de troebeling van koolzure kalk wordt opgelost door zuurvormende bacteriën.

In nog veel scherpere bewoordingen dan OMELIANSKI valt PRINGSHEIM KELLERMAN en zijn medewerkers aan. In zijn mededeeling uit het jaar 1913 (140) erkent hij wel de groote beteekenis van de aërobe, bacteriëele ontleding van cellulose, maar het gelukt hem op geenerlei wijze de aërobe cellulosesplitsers te isoleeren. Hij beweert zelfs, dat dit op vaste voedingsbodems onmogelijk is. Deze opvatting blijft hij ook later huldigen (142, 143), als hij antwoordt op het werk van LÖHNIS en LOCKHEAD, die reeds in 1913 in hun eerste, voorloopige, publicatie (110) met KELLERMAN instemden en mededeelden, dat het hun zonder veel moeilijkheden gelukt was, op celluloseagar een sterke ontleding van cellulose te verkrijgen en dat zij ook verscheidene bacteriën, welke cellulose splitsen, van het type van die van KELLERMAN, in zuivere cultuur hebben gebracht. Bovendien weerlegden zij de bewering van OMELIANSKI, dat de heldere zones rondom de koloniën

slechts werden veroorzaakt door het oplossen van het krijt, daar ze, ook na overgieten met zoutzuur, behouden bleven. Een beschrijving van de gekweekte bacteriën gaven zij in 1913 nog niet, maar zij hoopten hierop later uitvoerig in te gaan. Hiervan kwam echter tot 1923 niets. Wanneer zij dan eindelijk op deze vraag terugkomen (111), zijn zij reeds veel voorzichtiger in hun uitingen en geven toe, dat het niet zonder meer mogelijk is om op celluloseagarplaten aërobe cellulosesplitsende bacteriën rein te kweeken. Wel verkregen zij, in een vloeibaren voedingsbodem, met strookjes filtreerpapier er in, verschillende ruwe cultures, welke de cellulose somtijds zeer sterk aantastten en dikwijls op cytophagen gelijkende organismen bevatten. Bij uitzaaiing op celluloseagarplaten ontwikkelden zich echter altijd verschillende vormen door elkaar en werden mengkoloniën gevormd, zoodat het verkrijgen van werkelijk zuivere cultures opgegeven moest worden. Vermoedelijk zijn LÖHNIS en LOCKHEAD bij een exacter onderzoek op dezelfde moeilijkheden gestooten, welke ook KELLERMAN c.s. reeds ondervonden. Zij hebben echter veel duidelijker ingezien, dat de koloniën symbiosen waren.

Een zeer scherpen aanval op KELLERMAN deed verder GROENEWEGE (53). Het is weliswaar niet duidelijk waarom, want in den loop van zijn werk kwam hij langs een omweg tenslotte ongeveer tot hetzelfde resultaat als KELLERMAN. Hij isoleerde n.l. ook aërobe, beweeglijke bacteriën, zonder sporen, die niet speciaal op cellulose waren aangewezen en ook op suiker- en eiwithoudende voedingsbodems groeiden. Op celluloseagar vormden zij rondom de koloniën een helder veld. Zij bleken echter, bij kwantitatief onderzoek, slechts enkele procenten van de aanwezige cellulose op te kunnen lossen. De organismen van GROENEWEGE komen dus zoowel morphologisch als ook physiologisch met die van KELLERMAN volkomen overeen. Alleen spreekt GROENEWEGE niet van de degeneratieverschijnselen en ook niet van een verlies van het vermogen om de cellulose te ontleden bij het kweeken op voedingsbodems, welke geen cellulose bevatten. Daarom is het niet uitgesloten, dat hij werkelijk zuivere cultures heeft verkregen van echte cellulosebacteriën. Tenslotte zij er nog op gewezen, dat zijn organismen, in symbiose met bepaalde denitrificeerende bacteriën, in staat waren cellulose af te breken, ook bij een vrijwel absolute luchtafsluiting, als er maar voldoende nitraat aanwezig was. Dit stemt dus overeen met hetgeen VAN ITERSON in het jaar 1903 had gevonden.

Naast tegenstanders had KELLERMAN ook verscheidene aanhangers. Onder de laatsten moet BRADLEY vermeld worden, die in 1923 eerst een voorloopige, korte mededeeling publiceerde (21), waarop in 1927 een uitvoerig aanvullend bericht volgde (22). Dit — overigens zeer

oppervlakkige — werk is eigenlijk niets anders dan een herhaling en bevestiging van KELLERMAN's publicaties. De eenige vooruitgang bestaat daarin, dat BRADLEY door middel van de bepaling van de gewichtsvermindering van de in de voedingsvloeistof hangende strookjes papier geprobeerd heeft de ontleding der cellulose quantitatief te bepalen. Bij zijn zuivere cultures was het verschil in gewicht bijna onwaarneembaar en eveneens bleken de weelderig groeiende ruwe cultures de cellulose slechts zwak aan te tasten, daar nooit meer dan 20 % afgebroken werd; in de meeste gevallen nog veel minder.

In 't jaar 1929 heeft tenslotte SKINNER (169) het werk van KELLERMAN nogmaals grondig gecontroleerd, waarbij hij de origineele cultures van KELLERMAN en van LÖHNIS en LOCKHEAD gebruikte. Hij komt tot het resultaat, dat de meeste dezer cultures werkelijk rein zijn en ook werkelijk de cellulose kunnen splitsen zonder op de hulp van bepaalde symbionten te zijn aangewezen, wanneer er maar een organische stikstofbron aanwezig is. Men moet hierbij echter bedenken, dat in den loop der jaren van de vele cultures van KELLERMAN en van LÖHNIS en LOCKHEAD slechts een klein deel was overgebleven, n.l. juist de zuivere cultures van soorten, welke zelfstandig kunnen leven. De soorten, welke op symbiose zijn aangewezen, waren afgestorven, of werden slechts als ruwe cultures aangehouden. SKINNER had dus alleen de beste cultures van KELLERMAN bewerkt en deze behooren juist tot de groep der omnivore, kleine bacteriën. Deze zijn echter van relatief geringe beteekenis bij de ontleding der cellulose in de natuur en zijn ook niet zeer talrijk. Ongeveer tegelijk met SKINNER heeft ook SNIESZKO (170) de cultures van KELLERMAN gecontroleerd. Hij komt daarbij tot hetzelfde resultaat.

Deze beide werken van SKINNER en SNIESZKO hebben de kwestie over de cellulose splitsende bacteriën van KELLERMAN dus min of meer definitief opgelost. KELLERMAN zelf heeft aan dezen strijd niet deelgenomen; wel hebben enkele van zijn medewerkers in de aangegeven richting doorgewerkt. In de eerste plaats moet een mededeeling van MCBETH uit het jaar 1916 (114) genoemd worden. Deze beschrijft allereerst nog talrijke nieuwe vormen en geeft verder een tabellarisch overzicht van alle tot nu toe geïsoleerde bacteriën, benevens een determinatietabel. De nieuwe door hem geïsoleerde vormen behooren alle tot dezelfde typen, waartoe ook de oudere stammen van KELLERMAN gerekend kunnen worden. Iets principieel nieuws geeft MCBETH dus niet. Interessant zijn echter zijn mededeelingen over de relatieve beteekenis van de verschillende cellulose ontledende organismen in de natuur. Hij meent n.l., dat bacteriën slechts in aride streken met neutrale of alkalische gronden van belang

zijn, terwijl in gebieden met een vochtig klimaat en gepodsoleerde gronden schimmels en actinomyceten de ontleding der cellulose tot stand brengen. Men moet bij deze uitlatingen echter niet vergeten, dat in de dagen van McBeth de belangrijkste cellulosesplitsers, n.l. de cytophagen, de polyangiden en de proactinomyceten, nog onbekend waren.

De strijd over het werk van Kellerman c.s. heeft zich niet slechts tot de vraag beperkt, of zijn resultaten juist zijn of niet, maar heeft ook den stoot gegeven tot verscheidene, breed opgezette, polemische werken. Zoo is o. a. de reeds vermelde kritiek van Pringsheim (140) niet onbeantwoord gebleven. In het jaar 1919 gaf Rippel n.l. een algemeen overzicht van den toenmaligen stand van het onderzoek van de ontleding der cellulose (147), waarbij hij in verschillende opzichten een andere zienswijze bleek te huldigen dan Pringsheim. Hierop volgde een polemiek tusschen deze beide onderzoekers (141, 148).

Slaat men een blik terug op al de tot nu toe besproken werken, dan ziet men, dat zij er toe hebben geleid, dat eigenlijk reeds alle wegen van de ontleding der cellulose bekend geworden waren: zoowel de aërobe als ook de anaërobe. Men had ook al ingezien, welk een belangrijke rol de bacteriën bij dit proces spelen, hoewel nog lang niet alle bacteriën, die cellulose splitsen, waren ontdekt. Ongeveer in denzelfden tijd werden echter ook de cellulose ontledende schimmels en actinomyceten gevonden en bestudeerde men hun werkzaamheid. Op dezelfde wijze als bij de bacteriën werd ook bij de schimmels eerst langen tijd gestreden over de vraag, of zij in staat zijn zuivere, echte cellulose aan te tasten. Daar in deze publicatie de ontleding der cellulose door schimmels slechts terloops besproken zal worden, kan ook de litteratuur over de schimmels hier slechts een korte vermelding vinden.

De alleroudste gegevens zijn voor ons van geen beteekenis meer, maar ook later gelukte het langen tijd niet de aantasting van zuivere cellulose door schimmels onomstootelijk aan te toonen. Ja, eigenlijk werd deze vraag pas door de fraaie en exacte proefnemingen van Otto (129) in het jaar 1916 definitief beantwoord. Door zorgvuldige proeven werd door hem onbetwistbaar vastgesteld, dat vele, hoewel lang niet alle, schimmels in staat zijn zuivere cellulose als eenige koolstofbron te gebruiken. De cellulosevezels worden daarbij sterk gecorrodeerd en soms zelfs geheel en al opgelost. Uitsluitend de Eumyceten werkten oplossend, terwijl geen van de door Otto onderzochte Phycomyceten dit vermogen bezat. Het lukte hem eveneens om in vele gevallen uit de cultures der schimmels vloeistoffen te persen,

die, ook na behandeling met protoplasma-vergiften, zooals toluol of chloroform, de cellulose duidelijk aantastten. Hiermee waren cellulosesplitsende enzymen bij schimmels aangetoond. OTTO was ook de eerste, die bij zijn proefnemingen een vérstrekkende differentiatie van de verschillende vormen van cellulose vaststelde, waarbij hij zich geheel en al aan het door SCHWALBE (165) in het jaar 1911 opgestelde schema hield. De belangrijkste uitkomst van OTTO's werk was echter, dat hij tot het inzicht kwam, dat de cellulose zoowel chemisch als physisch sterk gewijzigd kan worden, zonder dat haar oplosbaarheid voor de schimmels beïnvloed wordt. De schimmelsoorten, welke in het algemeen in staat zijn cellulose te ontleden, kunnen dus steeds zoowel de natuurlijke, onveranderde cellulose, als ook alle cellulose-derivaten aantasten, dus zoowel cellulosehydraat, als ook hydrocellulose en oxycellulose. Ook de mechanische toestand, waarin de cellulose zich bevindt, dus of men natuurlijke vezels heeft of fijne geprecipiteerde cellulose, heeft geen invloed. Dit resultaat, dat volgens mijn ondervinding ook voor bacteriën, actinomyceten en myxobacteriën geldt, is zeer belangrijk, daar er uit blijkt, dat bij de enzymatische ontleding der cellulose het geraamte van het cellulosemolecuul aangetast wordt, terwijl de graad van de hydratatie of van de oxydatie van de carbonyl- resp. hydroxylgroepen daarbij van geen beteekenis is. Dit principe is overigens geheel en al in overeenstemming met het door PRINGSHEIM (138, 144) aangegeven schema van de fermentatieve splitsing der cellulose (Zie verder beneden).

Behalve door de onderzoekingen van OTTO werd ongeveer tegelijkertijd van vele zijden op de ontleding der cellulose door schimmels en actinomyceten gewezen. Allereerst moet hier het omvangrijke werk van WAKSMAN over de schimmels in den grond worden vermeld (191). Hierin beschrijft hij de belangrijkste daarin voorkomende schimmels en bepaalt daarbij o. a. hun vermogen om cellulose te ontleden. Hij vond zeer vele schimmelsoorten, die min of meer in staat waren cellulose te splitsen en kent hun dientengevolge een zeer groote beteekenis toe bij het mineraliseeren van de cellulose. Weliswaar is hij in latere publicaties (194, 195) hieromtrent eenigszins van meening veranderd, daar hij tot de overtuiging is gekomen, dat in normale gronden de schimmels grootendeels slechts als sporen voorkomen, dus niet actief aan omzettingen deelnemen. Slechts in zure gronden zijn zij werkelijk van groote beteekenis.

Ook KELLERMAN c.s. beschreven naast bacteriën vele cellulose-splitsende schimmels. Reeds in hun eerste publicaties in het jaar 1912 (84, 85) maken zij melding van een sterke ontleding der cellulose door verschillende uit den grond geïsoleerde schimmels uit de geslachten

Penicillium, Aspergillus, Fusarium en *Sporotrichum*. In de volgende jaren onderzochten zij deze vraag met meer nauwgezetheid (86, 114, 115, 162) en kwamen zij tot de overtuiging, dat de schimmels en actinomyceten een zeer groote rol spelen bij de ontleding der cellulose in den grond, ja dat zij waarschijnlijk zelfs het grootste aandeel in dit proces hebben, althans in zure, vochtige grondsoorten.

Verder besprak PRINGSHEIM (140) o. a. de ontleding van de cellulose door schimmels en actinomyceten en wijdde MÜTTERLEIN hieraan (120) een breedvoerig onderzoek. Bovendien kunnen nog enkele onbeduidende mededeelingen over cellulose ontledende schimmels genoemd worden: CARBONE (23), HOPFFE (57) en KOSIN (93).

Nog trager en later dan de ontleding der cellulose door bacteriën en schimmels werd die door actinomyceen bekend. De oorzaak hiervan moet vermoedelijk daarin gezocht worden, dat onze kennis van deze organismen langen tijd nog zeer onvolledig was. Pas de baanbrekende werken van KRAINSKY (94, 95), WAKSMAN (192, 193), DRECHSLER (42), LIESKE (108) en in den laatsten tijd van BALDACCI (11) hebben de morphologie en systematiek van deze organismen ontward en geordend. De eerste mededeeling hierover is die van KRAINSKY uit het jaar 1913 (94), waarin hij vermeldt, dat hij twee cellulose sterk ontledende actinomyceten uit den grond heeft geisoleerd. In zijn later verschenen uitvoerige werk (95) bespreekt hij meer in 't algemeen de splitsing der cellulose door actinomyceten. Hij vond talrijke prachtig ontledende soorten. De meeste vertegenwoordigers der cellulosesplitsers behoorden tot zijn groep van Microactinomyceten, dus tot de soorten, welke weinig mycelium vormen en maar nauwelijks boven den voedingsbodem uitsteken.

Enkele jaren later publiceerde WAKSMAN zijn studie over actinomyceten (193), waarin hij o. a. ook diep ingaat op de ontleding der cellulose door deze organismen. Hij vindt cellulose splitsende soorten in alle groepen, de actiefste echter ook weer onder die, welke geen luchtmycelium bezitten. Een van de voornaamste resultaten van zijn werk is, dat, volgens hem, in geen enkele klasse van microorganismen zóó veel cellulosesplitsers voorkomen als juist onder de actinomyceten. Vele ervan ontleden de cellulose zeer sterk, en niet alleen wanneer dit de eenige beschikbare energiebron is, maar dikwijls ook bij aanwezigheid van oplosbare koolhydraten. WAKSMAN is dientengevolge van meening, dat de actinomyceten een zeer groote rol spelen bij de ontleding van celstofrijke stoffen in den grond.

Zooals men uit bovenstaande mededeelingen kan zien, hield men zich reeds in de tot nu toe besproken jaren veelvuldig bezig met de vraag: welke microben — schimmels, actinomyceten of bacteriën —

de hoofdrol spelen bij de ontleding der cellulose in de natuur. Achteraf is het duidelijk, dat deze bespiegelingen toen nog voorbarig waren, aangezien toen vele der belangrijkste en actiefste cellulosesplitsers (cytophagen, polyangiden, proactinomyceten) nog niet eens bekend waren en een kwantitatieve bepaling der celluloseontleding en van het aantal cellulosesplitsers ook nog onmogelijk was.

§ 2. DE MODERNE LITTERATUUR.

Al de tot nu toe besproken werken behooren tot de oudere periode van het onderzoek naar de ontleding der cellulose. Ze zijn alle nog min of meer er op gericht, de splitsing van de cellulose door microorganismen in 't algemeen of door een bepaalde groep ervan aan te toonen. Toen dit bewijs langzamerhand was geleverd, verplaatste zich de belangstelling meer en meer naar het opzoeken en nauwkeurig beschrijven van de belangrijkste vertegenwoordigers dier groepen en naar het onderzoek van het ontledingsproces zelf. Deze werken vat ik in het onderstaande samen als de moderne onderzoekingen en neem daarbij als uitgangspunt de interessante mededeeling van HUTCHINSON en CLAYTON (61) over een organisme, *Spirochaeta cytophaga*, dat zij in het jaar 1918 ontdekten en beschreven. Hiermede had men nl. voor 't eerst een *specifieken*, aëroben cellulosesplitser gevonden.

De hieronder te bespreken werken zijn gerangschikt volgens de groote systeemeenheden der microben.

a. Cytophaga.

HUTCHINSON en CLAYTON beschreven hun *Spirochaeta cytophaga* als volgt: jonge culturen bestaan uit lange (3 tot 6 μ) en zeer dunne (0.2 tot 0.5 μ) staafjes, welke, in tegenstelling tot echte bacteriën, duidelijk toegespitste einden hebben en buigzaam zijn. Zij zijn zelfs in staat kronkelende bewegingen uit te voeren, waarbij zij zich somtijds tot ringen of lussen kunnen oprollen. Ciliën konden HUTCHINSON en CLAYTON bij deze organismen niet aantoonen. Zij zijn dan ook niet beweeglijk op de wijze van de gewone bacteriën, maar kruipen slechts heel langzaam over den voedingsbodem. Een vorming van endosporen werd door HUTCHINSON en CLAYTON nooit waargenomen. Wel echter gingen de slanke wormpjes na enkele dagen over in ronde onbeweeglijke vormen, welke men het best met protozoën-cysten vergelijken kan. In het begin hielden zij deze cysten voor begeleidende organismen van het type der Coccaceeën. Daar het hun echter op geen enkele wijze gelukte de staafjes van de coccen te scheiden en zij zelfs uit „ééncel-cultures" altijd weer beide vormen verkregen, zagen zij zich genoodzaakt deze beide vormen als twee ontwikkelingsstadia van één en dezelfde microbe te beschouwen. De overgang van de eene vorm in de andere konden zij weliswaar niet direct waarnemen, maar wel zagen zij

reeds enkele tusschenvormen, welke later door andere onderzoekers veel nauwkeuriger werden beschreven. Volgens de beschrijvingen van HUTCHINSON en CLAYTON is *Spirochaeta cytophaga* physiologisch hoofdzakelijk daardoor gekarakteriseerd, dat zij uitsluitend op echte cellulose is aangewezen en geen andere organische verbinding kan aantasten, ja, dat het organisme door de aanwezigheid van oplosbare organische stoffen zelfs geschaad wordt. Verder bleek *Spirochaeta cytophaga* streng aërob te zijn en zich het best te ontwikkelen bij een neutrale tot zwak alcalische reactie. De benoodigde stikstof verkrijgt zij vooral uit anorganische verbindingen (NO_3 of NH_4). Zij kan hiertoe echter ook pepton en enkele andere organische verbindingen gebruiken, mits de concentratie hiervan niet te hoog is. De ontleding der cellulose geschiedt zeer krachtig. De vezels worden volkomen opgelost, terwijl zich daaruit een gele, geleiachtige stof zonder structuur vormt. Op celluloseagar vormen zich duidelijke, iets ingezonken, oplossingsvelden. Een ander ontledingsproduct dan het niet nader onderzochte slijm konden HUTCHINSON en CLAYTON niet aantoonen; ook aan latere onderzoekers is dit niet gelukt.

Zooals men ziet, geven HUTCHINSON en CLAYTON in deze eerste mededeeling reeds een zeer volledige beschrijving van de nieuw ontdekte microbe. Deze beschrijving bleek volkomen juist te zijn, want in geen enkel essentieel punt werden later verbeteringen aangebracht. Alleen de plaatsing in het systeem hebben zij verkeerd beoordeeld. Zij zagen terecht in, dat *Spirochaeta cytophaga* niet tot de echte bacteriën kan worden gerekend — daartoe zijn de verschillen te groot. Hun besluit om haar tot de spirochaeten te rekenen is echter ongegrond, want behalve de flexibiliteit en de puntige einden kan men geen enkele overeenkomst met de spirochaeten aanwijzen. Hun keuze is des te onbegrijpelijker, daar zij zelf het vermoeden uitspreken, dat hun organisme nauw verwant is met *B. ferrugineus* van VAN ITERSON (66, 67).

Vreemd genoeg werd er aanvankelijk gedurende verscheidene jaren aan deze principieele en interessante mededeeling van HUTCHINSON en CLAYTON vrijwel geen aandacht geschonken. Pas in 1926 vergeleek WINOGRADSKY zijn nieuw geïsoleerde organismen met *Spirochaeta cytophaga* (211). Ondertusschen verschenen wel eenige onbelangrijke mededeelingen over cellulosesplitsende organismen, welke volgens de beschrijvingen vermoedelijk eveneens tot de groep der *Cytophaga* behooren, n.l. van VON GESCHER (49) en BOJANOWSKY (17). De daarin beschreven organismen werden echter niet als belangrijke en bijzondere vormen beschouwd en ook niet bij *Spirochaeta cytophaga* ingedeeld.

WINOGRADSKY beschrijft in de bedoelde publicatie voor het eerst zijn nieuwe wijze van werken met verschillende electieve kiezelzuurgel platen, waarop hij kruimeltjes grond uitstrooide (Zie hierover nader in het hoofdstuk over de methodiek). Op de platen nu, welke hij voor de studie der cellulosesplitsing had bereid en welke zelf geen organisch voedsel bevatten, maar slechts met een stuk filtreerpapier bedekt waren,

ontwikkelden zich o. a. cultures van lange, dunne staafjes. Deze tastten de cellulose zeer sterk aan en deden een gele of bruine, structuurlooze massa ontstaan. De beschrijving van deze organismen is in deze eerste mededeeling nog zeer vluchtig en onvolledig. WINOGRADSKY heeft daarbij zeker geen zuivere cultures voor zich gehad, maar mengsels van *Cytophaga*-soorten met vibrionen en misschien ook met andere begeleidende organismen, welke hij nog niet duidelijk kon onderscheiden. Hij vermoedde toen echter al wel, dat zijn bacteriën overeenkwamen of nauw verwant waren met *Spirochaeta cytophaga* van HUTCHINSON en CLAYTON, op wier werk WINOGRADSKY telkens wijst.

Deze eerste mededeeling werd gevolgd door twee eveneens korte, voorloopige mededeelingen (212, 213). Na de zuivering van zijn cultures verder te hebben doorgevoerd onderscheidt WINOGRADSKY hierin nu minstens twee verschillende groepen van organismen, n.l. *Cytophaga*-soorten en vibrionen, welke het papier ook op verschillende wijze aantasten. De eerste vormen een structuurlooze, geleiachtige massa, lossen de cellulose-vezels dus geheel en al op, terwijl de vibrionen de vezels slechts gedeeltelijk aantasten en het papier dientengevolge slap maken, zonder het heelemaal op te lossen. Een gedetailleerde differentatie van de cellulose-splitsende organismen gaf WINOGRADSKY toen nog niet.

Pas in 1929 volgt zijn uitvoerige werk over de aërobe ontleding van cellulose (214), waarin hij de, volgens bovengenoemde methodiek verkregen, ruwe cultures nader bestudeert en in een paar groepen indeelt. Hij onderscheidt nu 3 groepen: *Cytophaga*, *Cellvibrio* en *Cellfalcicula*. De eerste beschrijft hij ongeveer op dezelfde wijze als HUTCHINSON en CLAYTON hun *Spirochaeta cytophaga*. De vorming van ronde cysten heeft WINOGRADSKY echter niet als zoodanig herkend, want hij zag hen aan voor een, op een coc gelijkend, begeleidend organisme, dat zelf de cellulose niet aantast, maar zich voedt met de, door de *Cytophaga* gevormde afbraakproducten. Daarmee verklaart hij ook, waarom deze coc altijd pas tot ontwikkeling komt, nadat de *Cytophaga* haar maximale ontwikkeling bereikt heeft. Daar WINOGRADSKY bij zijn werk er in 't geheel niet naar streefde om zuivere cultures te verkrijgen, viel het hem niet op, dat de wormpjes en de coccen niet van elkaar gescheiden konden worden en bleef hij ook in latere publicaties deze opvatting huldigen. Daar hij dus het werkelijke ruststadium van de *Cytophaga* niet als zoodanig heeft herkend, heeft hij ijverig naar zulk een vorm gezocht en kwam daarbij tot de overtuiging, dat in oudere cultures zich in de wormpjes rijen van kleine „sporen" vormen, die na het autolytische uiteenvallen der wormpjes vrij komen en later op een verschen voedingsbodem weer kunnen ontkiemen. Waarschijnlijk heeft hij de chromatine-korreltjes, die zich

in de oudere cellen van enkele *Cytophaga*-soorten vormen en vaak regelmatig in een rij naast elkaar liggen, voor sporen aangezien. Verder meent WINOGRADSKY bij de cytophagen een uitgesproken neiging tot autolyse aangetoond te hebben. De opgezwollen en slecht kleurbaar geworden overgangsstadia, die bij het ontstaan der cyste optreden, beschouwt hij als het begin der autolyse. Een snel intredende en kwantitatief verloopende autolyse bij het ouder worden der cultures schrijft WINOGRADSKY overigens toe aan alle cellulosesplitsers — ook aan de *Cellvibrio*-soorten. Het is echter niet geheel duidelijk, wat hem tot deze zienswijze heeft gebracht.

Physiologisch heeft WINOGRADSKY de *Cytophaga* slechts onvolledig bestudeerd. Hij wijst wel op hun strenge specificiteit wat betreft de organische voeding, maar hun gedrag ten opzichte van oplosbare organische verbindingen heeft hij niet nader onderzocht.

WINOGRADSKY heeft verscheidene — ook morphologisch duidelijk verschillende — soorten van cytophagen gevonden en beschreven. Daar hij echter slechts met ruwe cultures werkte en ook aan macroscopische kenmerken (zooals kleur en vorm der koloniën) bij de beschrijving aandacht heeft geschonken, welke kenmerken mede door een verschillende begeleidende flora veroorzaakt kunnen zijn, heeft zijn indeeling in soorten weinig waarde.

Ongeveer tegelijk met WINOGRADSKY hebben ook DUBOS en WAKSMAN cytophagen gevonden en beschreven (43, 202). Ook hun beschrijving stemt morphologisch en physiologisch zeer goed overeen met die van HUTCHINSON en CLAYTON. Zij stelden zich ook bij de beoordeeling der cysten op het standpunt van dezen en zagen de cysten en de staafjes slechts voor twee ontwikkelingsstadia van hetzelfde organisme aan. DUBOS heeft ook *Cytophaga*-soorten zonder cysten gevonden. WINOGRADSKY heeft weliswaar ook cystenlooze cytophagen gevonden, maar kon de principieele beteekenis van de afwezigheid der cysten natuurlijk niet inzien, daar hij deze immers voor begeleidende organismen aanzag. DUBOS heeft dus voor het eerst bewust cystenvormende en cystenlooze *Cytophaga*-stammen onderscheiden. Hij gaf overigens geen nauwkeurige beschrijving van de door hem geïsoleerde organismen. Verder is het opmerkelijk, dat, volgens zijn meening, de cytophagen dermate aëroob zijn, dat zij zelfs niet in of op agarplaten kunnen groeien, maar alleen op stukjes papier, welke in een oplossing van voedingsstoffen zijn gedrenkt. Het lukte hem in elk geval niet, hen op celluloseagar te kweeken. Dit is een eigenaardige bewering, welke van andere zijden niet bevestigd werd. Ook mij lukte het steeds een weelderige groei op celluloseagar te verkrijgen, zelfs tot 2 cm diep in de agar.

In 1930 verscheen een mededeeling van BOKOR (20) over *Mycococcus cytophagus*, een door hem uit boschgrond geïsoleerd cellulose-ontledend organisme. Vermeldenswaardig is in deze publicatie alleen, dat BOKOR dus ongeveer tegelijk met WINOGRADSKY en DUBOS een *Cytophaga* heeft geïsoleerd en wel vermoedelijk een cystenlooze, daar hij nergens de toch zeer opvallende cysten vermeldt of afbeeldt. Overigens bevat het werk van BOKOR sterk van de gangbare opinie afwijkende opvattingen omtrent levenscyclus en systematische plaats der cytophagen. Al deze theorieën zijn echter onbevestigd gebleven of weerlegd en hebben nu dus geen waarde meer.

Tegelijk met BOKOR heeft ook KRZIEMIENIEWSKA de levenscyclus van de cytophagen onderzocht (97). Als resultaat van haar grondige werk kwam zij tot het volgende verloop:

In de wormpjes ontstaat bij het ouder worden eerst een condensatie van chromatine in het midden. De uiteinden worden zeer doorschijnend en verliezen het vermogen om kleurstoffen te adsorbeeren. Tegelijk worden de wormpjes korter en dikker en krijgen langzamerhand de karakteristieke spoelvorm met een band van chromatine in het midden. Daarna verdikken zich deze spoelvormige organismen nog weer en ronden zich ten slotte af tot bolvormige cysten. Aanvankelijk nemen deze, evenals de spoeltjes, zeer slecht kleurstoffen op en zien zij er in gekleurde preparaten uit als hyaline coccen met een excentrisch gelegen, donker gekleurde ophooping van chromatine. Later vormen zij echter een wand, die intensief kleurstof opneemt, waardoor zij zich, na kleuring, als donkere groote coccen vertoonen, waarin geen details meer kunnen worden onderscheiden. Overgebracht in een verschen voedingsbodem ontkiemen deze cysten, terwijl de wand verbroken of doorboord wordt en een jonge, aanvankelijk nog korte en dikke *Cytophaga* het omhulsel verlaat. De leege omhulsels zijn nog een tijdlang zichtbaar, maar verdwijnen langzamerhand geheel en al. De jonge cel, welke evenals de zich verdikkende spoeltjes in het midden een ophooping van chromatine vertoont, doch aan de einden volkomen doorschijnend is, strekt zich meer en meer en wordt ten slotte een typisch dun, puntig wormpje. Hierin verdwijnt eveneens de concentratie van de chromatine, zoodat de geheele cel regelmatig kleurbaar wordt. Pas dàn kan een vermeerdering door insnoering en celdeeling plaats vinden. Het ontkiemen der cysten verschilt van het zich encysteeren slechts daardoor, dat de jonge wormpjes stompe uiteinden hebben, terwijl de spoeltjes, ook wanneer zij al sterk opgezwollen zijn, nog puntige uiteinden behouden. Overigens is echter het eene proces het reciproque van het andere.

Het is moeilijk na te gaan, of KRZIEMIENIEWSKA den geheelen cyclus juist heeft beschreven, want de fijnere structuren van deze op zichzelf al zeer kleine microben staan op de grens van het zichtbare. Hoe scherp zij de *Cytophaga* heeft onderzocht blijkt echter daaruit, dat haar zienswijze later over 't geheel genomen verscheidene keeren werd bevestigd, zoodat de levenscyclus der *Cytophaga* sedert dien als bekend kan worden

beschouwd. Slechts in details wijken de meeningen van latere onderzoekers van de hare af.

KRZIEMIENIEWSKA heeft in dit werk slechts een cystenvormende *Cytophaga* beschreven. Bij de cystenlooze soorten kan trouwens van een gecompliceerden levenscyclus nauwelijks gesproken worden. Zij vermoedt, dat de cytophagen tot de myxobacteriën behooren, meer speciaal tot het geslacht *Myxococcus* THAXTER. Om deze zienswijze te staven vergelijkt zij de eigenschappen en den ontwikkelingscyclus van de myxococcen met die der cytophagen en vindt een vergaande overeenstemming. Wegens hun uitgesproken specificiteit voor het ontleden der cellulose wil zij de cytophagen echter als een aparte groep handhaven onder den geslachtsnaam „*Cytophaga*".

De kritiek, waaraan zij het werk van WINOGRADSKY onderwierp, bleef niet onbeantwoord. In 1932 publiceerde deze n.l. een polemisch werk, waarin hij de bovenvermelde publicatiën van KRZIEMIENIEWSKA en BOKOR analyseert (215). Spoedig verscheen nu een tweede mededeeling van eerstgenoemde (98), waarin zij de *Cytophaga* nog uitvoeriger en op ruimer schaal behandelt en zich moeite geeft om het verschil tusschen haar eigen zienswijze en die van WINOGRADSKY te verklaren en uit den weg te ruimen. Zij had ondertusschen ook verscheidene *Cytophaga*-stammen zonder cysten geïsoleerd en vergeleken met de gegevens van WINOGRADSKY. Daarbij komt zij tot de overtuiging, dat deze ten onrechte zijn cytophagen identificeert met de *Spirochaeta cytophaga* van HUTCHINSON en CLAYTON. De meeste van zijn cultures behooren tot de stammen, die geen cysten vormen en onderscheiden zich dus principieel van de echte *Spirochaeta cytophaga*. Weliswaar is het wormpjesstadium bij beide vormen bijna gelijk, alleen is het bij *Spirochaeta cytophaga* iets grooter dan bij de vorm van WINOGRADSKY, welke hij *Cytophaga Hutchinsoni* noemt. KRZIEMIENIEWSKA deelt nu de cytophagen in cystenvormende en cystenlooze soorten in. Tot de eerste behoort, volgens haar, slechts één soort: *Spirochaeta cytophaga H.* en *Cl.*, welke zij, gezien de gelijkenis van deze met de myxococcen, *Cytophaga myxococcoides* wil noemen. Tot de cystenlooze rekent zij de meeste cytophagen van WINOGRADSKY en de eene vorm van DUBOS. Toch wil zij de cystenlooze en de cystenvormende soorten in één geslacht „*Cytophaga*" houden.

Ten slotte onderzocht zij in dit werk de vorming en de ontkieming der cysten zeer nauwkeurig. Een merkwaardig resultaat daarbij was, dat de cysten zeer weinig bestand bleken te zijn tegen ongunstige uitwendige invloeden. Zij waren n.l. nauwelijks resistenter dan de actieve wormpjes. Daardoor wil KRZIEMIENIEWSKA hen niet de rol

van echte sporen of cysten — overeenkomend met de cysten der protozoën en de endosporen der bacteriën — toekennen. Aan den anderen kant pleit hun vorming bij het ouder worden en bij het uitputten van den voedingsbodem en hun ontkiemen op een versch substraat wél voor deze hypothese. Een definitief oordeel spreekt zij hierover nog niet uit.

Ongeveer tegelijk met de tweede mededeeling van KRZIEMIENIEWSKA publiceerde ook ROKITSKAJA haar uitvoerige onderzoekingen over de cytophagen, welke zij sedert 1924 steeds bij de aërobe ontleding van de cellulose in den bodem had aangetroffen (150). Zij maakt slechts melding van één *Cytophaga*-soort, n.l. een cystenvormende, welke goed overeenkomt met *Spirochaeta cytophaga*. Deze eene soort beschrijft zij echter zeer nauwkeurig en bestudeert ook haar ontwikkelingscyclus. Zij komt vrijwel tot dezelfde resultaten als KRZIEMIENIEWSKA en beschrijft reeds heel nauwkeurig de transformaties van de chromatine gedurende den geheelen ontwikkelingscyclus, hetgeen later door BADIAN (4, 5, 6) werd bevestigd. ROKITSKAJA beeldt haar *Cytophaga* af met zeer lange, uiterst fijne uiteinden en zegt ook met nadruk, dat deze fijne draadjes vaak min of meer spiraalvormig opgerold schijnen te zijn. Deze mededeeling is zeer belangrijk, daar hierin misschien een verklaring van het vermogen der cytophagen om te kruipen gevonden kan worden. (Zie verder hoofdstuk III). In physiologisch opzicht brengt het werk van ROKITSKAJA niet veel nieuws. Zij ziet in het slijmachtige ontledingsproduct van de cytophagen één van de hoofdbestanddeelen van den humus en kent dientengevolge aan deze organismen een zeer groote rol toe bij de vorming daarvan. ROKITSKAJA trof de cytophagen in de meeste grondsoorten in geheel Rusland aan. Slechts in uitgesproken zure gronden en in naaldbosschen ontbraken zij. Zij beschouwt derhalve de cytophagen als cosmopolieten.

In 1934 verschenen verder twee belangrijke werken over dit onderwerp, die de zienswijze van HUTCHINSON en CLAYTON, KRZIEMIENIEWSKA en ROKITSKAJA in groote lijnen bevestigden. Ten eerste hebben ISSATSCHENKO en WACKENHUT (65) den ontwikkelingscyclus der *Cytophaga* nogmaals aan een nauwkeurig onderzoek onderworpen. Hun schema komt eigenlijk vrijwel overeen met dat van KRZIEMIENIEWSKA en ROKITSKAJA, alleen meenen zij, dat de wormpjes in de cysten al direct in den definitieven, slanken vorm ontstaan en als kluwens opgerold zijn. Wanneer zij zich uit het omhulsel hebben vrijgemaakt, hebben zij reeds dadelijk hun normalen vorm aangenomen, terwijl zij volgens KRZIEMIENIEWSKA en ROKITSKAJA eerst kort, dik en stomp zijn en zich pas langzamerhand strekken. Vermoedelijk berust deze

waarneming van ISSATSCHENKO en WACKENHUT op een gezichtsbedrog, want zij werd ook later van andere zijde niet bevestigd.

Het tweede in 1934 verschenen werk is de interessante mededeeling van STAPP en BORTELS (174) over de cellulosesplitsing in de bovenste lagen van boschgrond. In dit grondige en veelomvattende werk beschrijven zij o. a. ook de cytophagen zeer uitvoerig. Zij konden deze organismen uit alle basenrijke en de cellulose actief ontledende monsters isoleeren. Zij vonden slechts één cystenvormende soort, welke geheel en al overeenkwam met de reeds bekende. Deze liet zich gemakkelijk rein kweeken en ook onbeperkt op synthetische, cellulose bevattende voedingsbodems cultiveeren. Daarnaast isoleerden zij echter ook verscheidene nauw aan elkaar verwante cystenlooze vormen. Deze konden echter op de zuiver synthetische voedingsbodems alléén niet groeien, doch slechts in symbiose met een of meer bacteriën, die zelf geen cellulose aantastten. Over de oorzaak van deze onontbeerlijke symbiose laten STAPP en BORTELS zich niet uit; zij vermelden slechts, dat alle door hen gevonden cystenlooze cytophagen op symbiose aangewezen zijn. Zij beschrijven ook den ontwikkelingscyclus van hun cystenvormende soort, welke zij, vreemd genoeg, niet identificeeren met de *Cytophaga myxococcoides* van KRZIEMIENIEWSKA, maar als een nieuwe soort onder den naam van *Cytophaga globulosa* beschrijven. Over het geheel genomen geven ook zij weer hetzelfde ontwikkelingsschema aan, maar zij hebben dit schema aangevuld met een alleszins belangrijke waarneming, n.l. die van de z.g. „stervorming". Daaronder verstaan zij de opeenhooping van vele individuen tot compacte, stervormige massa's. Binnen in deze vlokken vormen zich dan de cysten, welke eerst na het uiteenvallen der „sterren" vrijkomen. STAPP en BORTELS deelen niet mee of de cystenvorming slechts plaats kan hebben in de sterren, of dat deze ook mogelijk is bij vrijliggende individuen. Het is echter duidelijk, dat zij in de sterren primitieve vruchtlichamen willen zien van het type van die der myxobacteriën, waartoe zij, evenals KRZIEMIENIEWSKA, de cytophagen rekenen. De vorming van zulke „sterren" is inderdaad zeer karakteristiek voor alle cytophagen en werd later door verscheidene onderzoekers bevestigd. Door mij werden ook bij de later te vermelden cellulose niet ontledende soorten „sterren" waargenomen. Bij alle cystenlooze cytophagen zou de „stervorming" weliswaar slechts als een atavisme beschouwd moeten worden; of men moest met STAPP en BORTELS aannemen, dat het doel van de vorming der „sterren" eigenlijk is het samensmelten van cellen — dus een geslachtelijk proces — waarvan de vorming van cysten geen noodzakelijk gevolg behoeft te zijn.

In 1936 behandelden tenslotte IMŠENECKI en SOLNTZEWA (62) de

cytophagen nogmaals zeer nauwgezet. Over het geheel genomen komt ook hun meening overeen met die van KRZIEMIENIEWSKA, ROKITSKAJA, STAPP en BORTELS en ISSATSCHENKO en WACKENHUT. Slechts in kleinigheden wijken hun waarnemingen van die der andere onderzoekers af. Belangrijk is het, dat, terwijl tot nu toe alle beschreven cystenvormende cytophagen als identiek konden worden beschouwd, IMŠENECKI en SOLNTZEWA behalve deze eene soort nog een tweede cystenvormende *Cytophaga* ontdekt hebben. Deze vormt ovale cysten en wijkt, ook in physiologisch opzicht, eenigszins van de gewone soort af. Zij noemen haar *Cytophaga ellipsospora*. Zij hebben ook verscheidene cystenlooze soorten gevonden, maar niet rein gekweekt. Zij willen in de cystenlooze cytophagen geen zelfstandige soorten zien, maar slechts rassen van de echte cystenvormende, die het normale vermogen om cysten te vormen om de een of andere reden hebben verloren.

IMŠENECKI en SOLNTZEWA bespreken uitvoerig de vraag, welke plaats de cytophagen in het systeem moeten innemen. Op grond van de door STAPP en BORTELS beschreven „ster"-vorming, welke zij eveneens bij alle *Cytophagae*, ook die, welke geen cysten vormen, hebben waargenomen, meenen zij, dat men zonder eenig bezwaar de cytophagen tot het geslacht *Myxococcus* mag rekenen. Zij beschouwen n.l. de „sterren" als rudimentaire vruchtlichamen der myxobacteriën.

De door DUBOS verkondigde en sedert dien tijd algemeen aanvaarde meening, dat de cytophagen buitengewoon aërophiel zouden zijn, bestreden IMŠENECKI en SOLNTZEWA. Het is hun n.l. gelukt ook op den bodem van hoog gevulde reageerbuizen nog een ontwikkeling en een ontleding van het papier te verkrijgen. De cellvibrionen, welke zij eveneens beschreven hebben, zijn volgens hun meening in dit opzicht aanzienlijk veeleischender.

Een aparte plaats nemen de beide in 1932 en 1933 gepubliceerde werken van FLEHMIG (47) en RIPPEL en FLEHMIG (149) in. Zij beschrijven een organisme, dat ongetwijfeld eveneens tot de cystenvormende cytophagen moet worden gerekend, maar dat toch in vele opzichten afwijkt van de gewone *Spirochaeta cytophaga*. Hun organisme is veel korter en dikker, n.l. slechts 1.6 tot 1.8 μ lang en 0.4 tot 0.5 μ breed, terwijl de meeste gegevens over de afmetingen der *Spirochaeta cytophaga* spreken van een lengte van 3 tot 6 μ en een breedte van 0.3 tot 0.5 μ. Verder vermelden zij uitdrukkelijk, dat hun organisme altijd geheel recht is en nooit krommingen vertoont. Ook hebben zij geen kronkelende bewegingen waargenomen. De einden loopen wel eenigszins spits toe, hoewel niet zoo duidelijk als bij de echte *Spirochaeta*

cytophaga; en de langzame, kruipende beweging komt ook geheel en al met die der cytophagen overeen. Het feit, dat zij op cellulose aangewezen zijn en ronde cysten vormen, die ook in reincultures altijd uit de staafjes ontstaan, sluit alle twijfel er aan uit, of dit organisme tot de cytophagen behoort.

Deze mededeelingen zou men als een betrouwbare en belangrijke aanvulling van onze kennis van de aërobe ontleding der cellulose kunnen beschouwen, indien RIPPEL en FLEHMIG hun organisme hadden aangetroffen naast de algemeen bekende andere cellulosesplitsers (gewone cytophagen, cellvibrionen, enz.); zij deelen echter mede, dat dit het eenige cellulose ontledende organisme is, dat zij uit zand en heidegrond konden isoleeren; en dat is volkomen onbegrijpelijk. Het is n.l. niet in te zien, waarom zij juist dit zeldzame organisme vonden, dat verder niemand waargenomen heeft, terwijl zij al de talrijke andere cellulose splitsende organismen geheel over het hoofd gezien hebben. Aan hun manier van werken kan het niet gelegen hebben, daar de toegepaste isoleeringstechniek niet principieel van die der andere onderzoekers afwijkt. Misschien moet de verklaring daarin gezocht worden, dat zij hoofdzakelijk heidezand als entmateriaal gebruikten. In elk geval is het gewenscht hun resultaten te controleeren.

In 't kort zij nog het werk van RUBENTSCHIK uit 1933 (153) vermeld. Deze isoleerde uit de vloeivelden van Odessa talrijke cellulose splitsende organismen, waaronder ook cytophagen. Hij verkreeg echter geen zuivere cultures en beschreef zijn organismen maar heel oppervlakkig. Vreemd genoeg beschrijft hij ook organismen, die een intermediaire plaats zouden innemen tusschen de vibrionen en de cytophagen. Daar hij echter alleen met ruwe cultures gewerkt heeft, is deze mededeeling niet zonder contrôle aanvaardbaar.

b. De overige myxobacteriën.

Zooals men uit de laatstbesproken werken kan zien, zijn tegenwoordig eigenlijk alle onderzoekers het er over eens, dat de cytophagen tot de myxobacteriën moeten worden gerekend. Nu is het interessant, dat in de laatste jaren van verschillende zijden tegelijk ook van andere cellulose splitsende myxobacteriën melding gemaakt wordt. In tegenstelling tot de cytophagen werden deze echter van 't begin af aan als myxobacteriën erkend. Nog in 1924 meende JAHN (68), dat de myxobacteriën niet in staat waren om cellulose aan te tasten. Een jaar later beschreef echter GEITLER (48) een myxobacterie, die op *Cladophora* parasiteert en daarbij de celwanden doorboort en oplost. Deze soort is dus vermoedelijk in staat cellulose te splitsen. GEITLER zelf gaat niet nader op dit punt in. Verder vermoedden de KRZIEMIENIEWSKY'S

reeds sedert eenige jaren, dat bepaalde myxobacteriën cellulose kunnen aantasten, daar zij regelmatig een goede ontwikkeling van deze microben verkregen op filtreerpapier, waarmee hun cultuurschalen van binnen waren belegd. Doch pas in 1937 publiceerden zij de eerste exacte mededeelingen hierover (104, 105). Zij beschreven hierin reeds 6 verschillende maar toch nauw met elkaar verwante soorten. Deze behooren allen tot het type, dat stompe celeinden heeft; zij kunnen worden ingedeeld bij de geslachten *Sorangium* en *Archangium*. Zij werden door de KRZIEMIENIEWSKY'S uit vochtigen grond of mest geïsoleerd. Het bleek, dat bij de door hen toegepaste techniek het rein kweeken veel moeilijkheden opleverde, zoodat zij slechts twee soorten volkomen zuiver verkregen (*Sorangium compositum* en *S. nigrescens*). Over de systematische indeeling van deze cellulose ontledende myxobacteriën is men het nog in 't geheel niet eens, daar de systematiek van de myxobacteriën in 't algemeen nog labiel en onvoldoende uitgewerkt is. Geen van de zes soorten van de KRZIEMIENIEWSKY'S is specifiek op cellulose aangewezen; ze kunnen allen ook de meeste oplosbare koolhydraten gebruiken. Voor *Sorangium compositum* is cellulose echter de beste energiebron. Alle zes soorten zijn streng aëroob en splitsen de cellulose zeer krachtig; echter in zuivere cultures veel zwakker dan in ruwe.

Onafhankelijk van de KRZIEMIENIEWSKY'S en zelfs een jaar eerder (1936) beschreven ook IMŠENECKI en SOLNTZEWA (62) terloops een cellulose splitsende myxobacterie, welke zij bij het geslacht *Polyangium* rekenden. Hun in 't Russisch geschreven publicatie bleef eerst onopgemerkt en kwam ook de KRZIEMIENIEWSKY'S pas gedurende 't persklaar maken van hun werk onder de oogen. Zij beschreven het betreffende organisme als een korte en dikke myxobacterie met stompe einden. In de vruchtlichamen vormen zich duidelijk zichtbare, dicht ineengedrongen, secundaire cysten. Eigenaardig genoeg noemen IMŠENECKI en SOLNTZEWA hun organisme toch niet *Sorangium*, maar *Polyangium cellulosum*. Overigens vertoont dit organisme geen noemenswaardige bijzonderheden. Het is een typische myxobacterie. Cellulose wordt krachtig aangetast. Over het voorkomen en de verbreiding van deze bacterie deelen de schrijvers niets mede. Zij isoleerden haar uit grond in het gebied ten Oosten van de Wolga.

Eén jaar later, in 1937, volgde een tweede publicatie van dezelfde onderzoekers over dit onderwerp. Hierin deelen zij mede, verscheidene soorten van de geslachten *Polyangium* en *Sorangium* geïsoleerd te hebben. Zij beschrijven echter slechts één *Sorangium*-soort. Het is niet duidelijk, of dit hetzelfde organisme is als in hun eerste mededeeling. Zij deelen hun organisme nu in bij het geslacht *Sorangium*, aangezien

zij nu een duidelijke vorming van secundaire cysten, welke zich langzamerhand tot grootere primaire cysten vereenigen, meenen te hebben waargenomen. Voor zoover men echter aan de hand van de bijgaande afbeeldingen kan oordeelen, zijn deze organen in 't geheel geen cysten, maar slechts de bij 't ouder worden optredende deformaties van de vegetatieve cellen. IMŠENECKI en SOLNTZEWA geven overigens een heel nauwkeurige beschrijving van hun *Sorangium* en deelen ook vele interessante details mede. De door hen geïsoleerde myxobacteriën zijn niet specifiek op cellulose aangewezen, groeien zelfs beter op oplosbare koolhydraten en andere organische verbindingen. Over 't geheel genomen lijken hun myxobacteriën zeer op die van de KRZIEMIENIEWSKY'S. Vermoedelijk betreft het in beide gevallen dezelfde of nauw verwante organismen. Men heeft hier dus blijkbaar te doen met een cosmopolitische en zeer algemeene groep van myxobacteriën, die onder bepaalde omstandigheden een belangrijke rol spelen bij de ontleding der cellulose in de natuur.

Dat de myxobacteriën in 't algemeen zeer sterk lytisch kunnen werken en behalve cellulose ook andere zeer bestendige verbindingen aantasten, blijkt uit de mededeeling van JOHNSON (79), die verscheidene chytine splitsende mariene myxobacteriën isoleerde en beschreef.

c. Bacteriën en Pseudomonadaceeën.

Wanneer wij ons nu wenden tot de echte bacteriën, dan kan als eerste interessante mededeeling, die verscheen, nadat de strijd over de organismen van KELLERMAN geluwd was, die van GRAY en CHALMERS (51) beschouwd worden. Zij beschreven daarin een zoowel cellulose als ook agar splitsende bacterie. Volgens onze hedendaagsche begrippen is het een typische *Vibrio*, behoort dus tot de groep der cellvibrionen van WINOGRADSKY. Men kan dientengevolge zeggen, dat GRAY en CHALMERS de eersten waren, die een vertegenwoordiger van deze belangrijke en interessante groep van organismen uitvoerig hebben beschreven. Vele bacteriën van KELLERMAN c.s., GROENEWEGE, LÖHNIS en LOCKHEAD, enz., behooren zeker ook tot de vibrionen, maar pas GRAY en CHALMERS hebben de spiraalvorm van hun bacterie herkend en haar ook bewust bij de *Spirillaceeën* ingedeeld. Zij noemen haar *Microspira agarliquefaciens* en beschrijven haar zoowel morphologisch als ook physiologisch zeer uitvoerig. Ze is niet op cellulose of agar aangewezen, maar kan ook de meeste oplosbare organische verbindingen benutten; dus behoort ze tot de zeer uitgebreide groep van de niet-specifieke omnivore cellulose splitsende vibrionen, waartoe ook de meeste organismen van KELLERMAN, evenals die van KALNINS (80) gerekend moeten worden.

Het bijzondere van *Microspira agarliquefaciens* is echter, dat zij, volgens GRAY en CHALMERS, door verschillende oplosbare koolhydraten niet alleen in haar ontwikkeling wordt gestimuleerd, maar daarbij ook de cellulose sterker aantast. Deze waarneming is wel heel scherp in tegenspraak met de zienswijze van de meeste andere onderzoekers en ook met mijn ondervindingen. Een versterkte celluloseontleding bleek n.l. door toevoegen van oplosbare suikers slechts dàn verkregen te worden, wanneer slechts héél weinig suiker gebruikt wordt, zoodat deze snel volledig opgenomen kan worden en dus alleen in het begin een stimulans voor de ontwikkeling van de betreffende microben is. En zelfs dàt is slechts het geval bij organismen, die op cellulose als éénige energiebron slecht groeien. In alle andere gevallen kan suiker de celluloseontleding alleen remmen. De waarnemingen van GRAY en CHALMERS over de gunstige werking van bepaalde organische verbindingen op de ontleding van cellulose door *Microspira agarliquefaciens* moeten dus nog grondig gecontroleerd worden, vooral ook omdat nòch VAN DER LEK (107), nòch ik hun mededeelingen konden bevestigen voor met *Microspira agarliquefaciens* identieke of toch zeer nauw verwante cellulose en agar splitsende vibrionen. In 1928 heeft n.l. VAN DER LEK uit tuinaarde een microbe geïsoleerd, die vrijwel in alle eigenschappen overeenkomt met de *Microspira agarliquefaciens* van GRAY en CHALMERS. Agar werd door deze bacterie zelfs nog sterker aangetast en geheel vervloeid. VAN DER LEK noemde zijn *Vibrio*, welke hij als identiek met *Microspira agarliquefaciens* beschouwt, *Vibrio agarliquefaciens*. Met uitzondering van de werking van oplosbare organische verbindingen bevestigde hij de beschrijving van GRAY en CHALMERS. Bovendien kon hij waarnemen, dat het vermogen om agar aan te tasten na enkele overentingen op agarvoedingsbodems steeds sterker werd, terwijl het aanvankelijk slechts zwak ontwikkeld was. VAN DER LEK heeft ook reeds waargenomen, dat *Vibrio agarliquefaciens* niet op zuiver synthetische voedingsbodems groeit, maar bepaalde organische groeistoffen noodig heeft.

Enkele jaren na het werk van GRAY en CHALMERS maakte DUBOS (202, 43, 44) melding van verscheidene cellulose splitsende bacteriën. Hij beschreef hen echter maar kort en onvolledig. Het is uit zijn werken in 't geheel niet op te maken, of hij zijn organismen als zuivere cultures verkregen heeft of slechts met ruwe cultures werkte. Het was trouwens ook niet zijn doel een nauwkeurige beschrijving te geven van bepaalde cellulose ontledende organismen, doch een onderzoek in te stellen naar hun voorkomen en hun beteekenis in den grond. DUBOS heeft ongetwijfeld naast enkele cytophagen ook verscheidene cellulose ontledende bacteriën beschreven, zoowel van het type van de min

of meer specifieke vibrionen als ook zeer omnivore soorten, zooals die van KELLERMAN.

Ongeveer tegelijk met DUBOS beschreef ook WINOGRADSKY cellulose splitsende bacteriën. Hij isoleerde de betreffende microben op kiezelzuurplaten volgens zijn nieuwe methode, die hij pas naderhand nauwkeurig beschreef (216) en die in het hoofdstuk over de methodiek zal worden behandeld. De resultaten van zijn onderzoekingen zijn, afgezien van enkele korte voorloopige publicaties (211, 212, 213) uitvoerig vermeld in zijn bekende werk uit het jaar 1929 (214).

Naast talrijke en zeer actieve cytophagen trokken onder de cellulose ontledende organismen hoofdzakelijk kleine en meestal zeer korte vibrionen zijn aandacht. Deze kwamen in grooten getale in den bodem voor en tastten de cellulose ook zeer sterk aan, maar de vezels werden hierbij niet zoo volkomen verteerd als door de cytophagen, doch slechts oppervlakkig aangetast. Hierdoor werd het papier slap en viel uiteen, maar ging niet over in een doorschijnend gel. Het waren levendig beweeglijke, spiraalvormig gekromde bacteriën, met polaire ciliën. Zij waren echter meestal zoo kort, dat de spiraalvorm niet duidelijk zichtbaar was. Meestal waren het slechts heel korte, een weinig gekromde staafjes. Het is dan ook begrijpelijk, waarom deze organismen, die vóór WINOGRADSKY reeds door vele onderzoekers gezien en beschreven werden (de meeste bacteriën van KELLERMAN, LÖHNIS, GRAY en CHALMERS, enz. behooren hiertoe), pas door hem als vibrionen werden herkend en tot een morphologisch uniforme groep werden vereenigd. WINOGRADSKY stelde voor deze bacteriën „*Cellvibrio*" te noemen en hen dus als een apart geslacht te beschouwen. Dit laatste is volgens mijn meening niet juist, daar zoowel de morphologische als ook de physiologische verschillen tusschen de soorten afzonderlijk te groot zijn om hen allen in één geslacht te vereenigen. De naam „*Cellvibrio*" is echter reeds ingeburgerd en is bij physiologisch-oecologische studiën ook zeer gemakkelijk. De meeste van de door WINOGRADSKY geïsoleerde en beschreven *Cellvibrio*-soorten zijn geel tot oranje of bruin van kleur en relatief lang, dus typische vibrionen. Later werden door KALNINS (80), STAPP en BORTELS (174) en IMŠENECKI en SOLNTZEWA (62) naast zulke vormen ook vele kleurlooze of slechts zwak grauw-geel gekleurde en soms ook bijzonder korte vormen ontdekt, die overigens volkomen tot de groep der *Cellvibrio's* gerekend kunnen worden. Ik vond eveneens veel meer hyaline dan schel gekleurde vormen. Waarschijnlijk heeft WINOGRADSKY meestal juist die soorten, welke opvallend van kleur waren, geïsoleerd, de hyaline echter over 't hoofd gezien; een fout, welke vaker gemaakt is, hoofdzakelijk in de gevallen, waarbij papier en niet celluloseagar gebruikt werd.

Naast de voor de ontleding van de cellulose in de natuur zeer belangrijke cytophagen en cellvibrionen beschreef WINOGRADSKY in zijn werk ook nog verscheidene andere bacteriën, die cellulose ontleden. Enkele daarvan vereenigt hij tot de groep „*Cellfalcicula*". Al deze soorten werden echter slechts oppervlakkig beschreven, zoodat men er zich geen duidelijke voorstelling van kan maken. Daarbij moet men ook niet vergeten, dat WINOGRADSKY altijd alleen met ruwe cultures werkte en daardoor misschien vaak mengcultures voor zuivere cultures heeft aangezien. De *Cellfalciculae* beschrijft hij als zwak gebogen, korte, levendig beweeglijke, kleine staafjes met een eindstandigen zweepdraad, dus ongeveer als de *Cellvibrio's*. Alleen deelt hij mee, dat zij dikwijls eenigszins toegespitste uiteinden hebben en in het midden iets dikker zijn; twee eigenschappen, welke ik ook bij sommige *Cellvibrio*-soorten, zij het dan ook minder opvallend, aantrof. Het is dientengevolge niet duidelijk, waarom WINOGRADSKY de *Cellfalciculae* als een aparte groep van de *Cellvibrio's* afscheidt. Hun vaak groene kleur kan daarvoor ook niet verantwoordelijk zijn, daar ook onder de echte cellvibrionen groene en groen-gele soorten voorkomen. In elk geval zijn de *Cellfalciculae* ook vibrionen.

De niet tot de vibrionen maar tot de bacteriën met min of meer peritriche ciliën behoorende soorten vermeldt WINOGRADSKY slechts eenmaal en dan nog is het een onvoldoende gezuiverde ruwe cultuur. Bacteriën, die de cellulose ontleden en sporen vormen, dus echte bacillen, heeft hij nooit gevonden. Hij ziet in de bacillen overigens ook geen autochtone bewoners van den grond en ontkent dientengevolge ook elke beteekenis, die zij zouden hebben bij de afbraak van de cellulose in de natuur.

Vrijwel onmiddellijk na WINOGRADSKY en onafhankelijk van hem publiceerde KALNINS in 1930 (80) een zeer interessant en uitvoerig werk over aërobe cellulose splitsende bacteriën, waarin hij ook zeer vele belangrijke methodische gegevens over het isoleeren en rein kweeken mededeelde. Aanvankelijk streefde hij er naar om alleen de specifiek op cellulose aangewezen soorten te isoleeren. Hij vond daarbij echter altijd alleen cytophagen, waarvan hij talrijke stammen isoleerde. Daarnaast vond hij echter ettelijke kleine vibrionen en bacteriën van het type van de *Microspira agarliquefaciens* van GRAY en CHALMERS en van de organismen van KELLERMAN. Deze bacteriën kwamen veel algemeener en talrijker voor in de onderzochte gronden dan de cytophagen. Zij waren echter nooit specifiek op cellulose aangewezen. De meeste gaven niet eens de voorkeur aan cellulose, maar groeiden even goed of nog beter op verschillende andere organische verbindingen. Het feit, dat zij algemeen voorkomen in alle mogelijke

grondsoorten en zich snel kunnen ontwikkelen, benevens hun groote virulentie, bracht KALNINS tot de overtuiging, dat deze niet specifieke organismen toch een zeer groote rol kunnen spelen bij de afbraak van cellulose in den grond. Daartoe onderzocht hij hen nauwkeurig en beschreef vele stammen uitvoerig. Dit werk is, naast het zoo even vermelde van WINOGRADSKY, systematisch het veelzijdigste en meest omvattende over de aërobe cellulose splitsende bacteriën. Helaas kende KALNINS de onderzoekingen van WINOGRADSKY nog niet, zoodat hij niet op diens resultaten kon voortbouwen. Over het geheel genomen bevestigen zijn resultaten de zienswijze van WINOGRADSKY. Slechts in één opzicht loopen zij sterk uiteen. WINOGRADSKY meent nl., dat de meeste van zijn *Cellvibrio's* specifiek op cellulose zijn aangewezen, KALNINS daarentegen vond slechts enkele soorten, die aan cellulose de voorkeur gaven boven andere koolhydraten, zonder werkelijk specifiek te zijn; de meeste waren echter geheel en al omnivoor. Hiermee steunde hij dus ook de zienswijze van KELLERMAN en diens aanhangers. Ik sluit mij, wat deze vraag betreft, geheel en al bij KALNINS aan, want werkelijk specifieke cellulosesplitsers vond ik ook slechts onder de cytophagen.

Helaas heeft WINOGRADSKY het werk van KALNINS niet opgevat als een welkome aanvulling van zijn eigen onderzoekingen, maar heeft hij het bestreden. In zijn polemische publicatie (215) uit het jaar 1932 kan hij de door KALNINS aangevoerde feiten weliswaar niet ontkennen, maar hij weigert te gelooven, dat de niet specifieke celluloseontleders eenige beteekenis hebben in de natuur, daar zij in den grond altijd oplosbare voedingsstoffen vinden en de cellulose dan zouden versmaden. De ontleding van de cellulose door deze organismen zou dus slechts een laboratoriumverschijnsel zijn. Hij ziet daarbij echter over het hoofd, dat de oplosbare koolhydraten slechts dan de ontleding der cellulose remmen, wanneer zij in hooge concentratie (van 0.25 % of meer) voorkomen, dus in een concentratie, die in natuurlijke gronden nooit bereikt wordt. Quantitatieve bewijzen hiervoor zijn juist door KALNINS en later ook door STAPP en BORTELS, IMŠENECKI en SOLNTZEWA en door mijn onderzoekingen geleverd.

Systematisch deelt KALNINS zijn organismen in bij de geslachten *Vibrio* en *Bacterium*. De eersten komen verreweg het talrijkst voor. Op grond van welke criteria hij hen echter bij een van deze genera indeelt, is niet duidelijk; nòch in de beschrijving, noch in de afbeeldingen is een scherp onderscheid te zien. Men treft onder hen alle overgangen aan van typische, lange, duidelijk spiraalvormig gebogen vibrionen met polaire ciliën tot korte, rechte, bijna op coccen gelijkende bacteriën. Ook het aantal en de inplanting der zweepdraden

is niet steeds karakteristiek, want zelfs bij overigens typische vibrionen komen soms soorten voor met peritriche ciliën.

De beide laatstgenoemde werken van WINOGRADSKY en KALNINS hebben eigenlijk pas klaarheid gebracht in de kwestie van de aërobe cellulose splitsende bacteriën, waarover sedert KELLERMAN zooveel is gestreden. Na deze fundamenteele publicaties werden de vibrionen en aanverwante bacteriën trouwens nog vele malen opnieuw gevonden en beschreven. Het waren echter altijd slechts enkele min of meer toevallig geïsoleerde soorten, wier eigenschappen dan door de betreffende onderzoekers soms als geldend voor de geheele groep werden beschouwd, waardoor vaak scherpe tegenstrijdigheden in de opvattingen ontstonden.

Zoo hebben o. a. STAPP en BORTELS in hun reeds aangehaalde werk (174) twee *Cellvibrio*-soorten geïsoleerd en beschreven. Beide zijn zeer algemeen voorkomende typische vertegenwoordigers dezer groep, welke in alle eigenschappen tamelijk goed overeenkomen met de door DUBOS en WINOGRADSKY beschreven soorten. Zij behooren tot die soorten, welke het meest op cellulose en andere macromoleculaire koolhydraten zijn aangewezen. Omnivore soorten van het type van KELLERMAN of KALNINS hebben zij niet gevonden. Zij sluiten zich dan ook bij WINOGRADSKY aan en ontzeggen aan de omnivore soorten elke beteekenis.

Verder moet het reeds aangehaalde werk van IMŠENECKI en SOLNTZEWA (62) vermeld worden. Zij hebben eveneens verscheidene *Cellvibrio's* geïsoleerd. Eén vertegenwoordiger beschrijven zij nauwkeurig. Hij komt overeen met de *Cellvibrio vulgaris* van STAPP en BORTELS. IMŠENECKI en SOLNTZEWA hebben echter duidelijk aangetoond, dat dit organisme ook van oplosbare suikers kan leven, dus omnivoor is. Ook vonden zij, in overeenstemming met KALNINS, dat hoogere concentraties van oplosbare koolhydraten de ontleding van de cellulose sterk tegenwerken.

Tenslotte moet nog worden gewezen op de, geheel met mijn ondervinding overeenkomende meening van KALNINS, en ook van STAPP en BORTELS en IMŠENECKI en SOLNTZEWA, n.l. dat bij het kweeken der cellulose splitsende organismen op andere voedingsbodems het cellulolytisch vermogen niet verloren gaat.

d. Bacillen.

Naast de belangrijke groepen van vibrionen en kleine bacteriën werden door verschillende onderzoekers ook aërobe sporenvormende bacillen beschreven. KELLERMAN beschreef reeds een dergelijk organisme en ook KALNINS (80) heeft naast de vele kleine organismen

zonder sporen ook een groote typische bacil met duidelijke endosporen en met vele lange peritriche ciliën gevonden. Deze bacil kwam in sommige gronden in zeer grooten getale voor, zoodat KALNINS in tegenstelling tot WINOGRADSKY ook aan dit organisme een zekere beteekenis bij de ontleding der cellulose toekende.

In 1931 verscheen een uitvoerig werk van SIMOLA (168), waarin twee bacillen met nauwgezetheid beschreven worden. Beide zijn mesophiele, aërobe bacillen van het type der *Clostridia*. Zij zijn weliswaar volstrekt niet specifiek op cellulose aangewezen, ontleden deze echter zeer sterk en groeien daarbij voortreffelijk, indien er organische stikstofverbindingen aanwezig zijn. SIMOLA heeft deze twee bacillen in grooten getale in verschillende grondmonsters, in mest, in vermolmd hout, enz. gevonden en beschouwt hen dus als zeer algemeene cellulose splitsende organismen. Zijn isoleeringstechniek was echter zeer eenzijdig, waardoor hij alleen sporenvormers vond en de in nog veel grooter aantal aanwezige vibrionen, cytophagen en myxobacteriën over 't hoofd zag. Hij heeft dientengevolge de beteekenis der bacillen bij de celluloseontleding overschat. Zijn verdienste is echter de aërobe sporenvormers grondig beschreven en op hun algemeen voorkomen en hun sterke celluloseontleding gewezen te hebben. Hij heeft ook thermophiele, aërobe, cellulosesplitsende bacillen geïsoleerd, maar niet nader beschreven.

In 1936 beschreef HOROWITZ-WLASSOWA (60) wederom een cellulose splitsende bacil, ook van het clostridiumtype. Deze kwam algemeen voor in door organische stoffen sterk verontreinigde gronden en was eveneens zeer omnivoor. Sporenvormende, aërobe cellulosesplitsers zijn dus reeds vaak aangetroffen en ook beschreven; over 't geheel krijgt men echter toch den indruk, dat zij lang niet zoo algemeen voorkomen als de vibrionen.

HOROWITZ-WLASSOWA heeft behalve de clostridium nog een tweede cellulose splitsende bacterie beschreven, welke in geen van de tot nu toe bekende groepen ondergebracht kan worden. Het zou een kort, dik, beweeglijk staafje zijn, dat zeer omnivoor is en zeer algemeen voorkomt. Deze mededeeling zou echter nog zorgvuldig gecontroleerd moeten worden, voordat men dit organisme als een vertegenwoordiger van een nieuwe groep van cellulosesplitsers kan beschouwen, aangezien de beschrijving verscheidene tegenspraken bevat en ook overigens het vermoeden wettigt, dat zij niet met reine cultures gewerkt heeft.

e. Schimmels en Actinomyceten.

Op het gebied van de cellulose splitsende schimmels en actinomyceten heeft het onderzoek in de laatste jaren zoo goed als stilgestaan, hetgeen trouwens ook begrijpelijk is, aangezien in de eerste plaats de bovenvermelde werken van OTTO, WAKSMAN, LIESKE en anderen reeds geleerd hadden, dat zeer veel schimmels en actinomyceten in staat zijn cellulose aan te tasten, zoodat een verdere aanvulling der toch al lange lijsten nu geen principieele beteekenis meer heeft, te meer, daar geen enkele soort op cellulose specifiek aangewezen bleek te zijn; bovendien meende men, wat de schimmels betreft, dat zij slechts in zure gronden van beteekenis zijn. Alleen WAKSMAN in zijn latere publicaties (o. a. 197) en JENSEN zeggen uitdrukkelijk, dat, volgens hun meening, de schimmels ook in neutraal en zelfs alcalisch reageerende gronden een belangrijk aandeel kunnen hebben in de ontleding der cellulose. De laatste is in 't bijzonder tot deze overtuiging gekomen, nadat hij zijn alcalophiele, de cellulose zeer sterk afbrekende schimmel uit het geslacht *Botryosporium* had waargenomen (72, 76).

In de op een breede, algemeene basis opgezette werken zooals de bekende onderzoekingen van WINOGRADSKY, KALNINS, IMŠENECKI en SOLNTZEWA, enz. wordt over de schimmels en actinomyceten nauwelijks gesproken. Alleen JENSEN (76) wil aan de schimmels een groote beteekenis toekennen, aan de actinomyceten ontzegt hij deze echter beslist.

Behalve JENSEN hebben FELSZ-KARNICKA (81) en FELSZ-KARNICKA en ZIEMIECKA (82) enkele jaren geleden de cellulolytische flora van zure podsolgronden onderzocht. Zij komen tot de overtuiging, dat in zure gronden eigenlijk alleen de schimmels van belang zijn, terwijl de bacteriën en actinomyceten geheel op den achtergrond treden. De actinomyceten zijn volgens hun gegevens in geen enkele grondsoort van beteekenis. Deze meening zijn trouwens de meeste onderzoekers toegedaan. WAKSMAN en ook MCBETH laten nog de mogelijkheid open, dat in droge, alcalische gronden ook de actinomyceten voor de ontleding der cellulose van beteekenis zijn, overal elders achten echter ook zij deze microben volkomen onbelangrijk.

In het vierde hoofdstuk zal op deze vraag nader teruggekomen en betoogd worden, dat volgens mijn meening de actinomyceten wel degelijk een groote rol spelen bij de celluloseontleding in den grond en dat de bovenstaande algemeene meening vermoedelijk al weer een gevolg is van een te eenzijdige isoleeringstechniek.

f. Protozoën.

Tot slot van het litteratuuroverzicht moeten nog met enkele woorden de werken van CLEVELAND over cellulose verterende protozoën genoemd worden. Langen tijd scheen het n.l. of slechts bacteriën, myxobacteriën, actinomyceten en echte schimmels in staat zouden zijn cellulase te produceeren. Bij hooger georganiseerde dieren zocht men steeds tevergeefs naar dit vermogen, totdat CLEVELAND, eerst bij termieten en later ook bij op hout levende blattiden en andere insecten, een cellulase-leverende darmfauna van protozoën aantoonde. Bij de hout etende insecten zijn het dus niet bacteriën, die de cellulose splitsen, zooals bij de herkauwers, maar bepaalde protozoën. Deze nemen de houtdeeltjes in zich op en verteren ze dan. Voor de termieten en blattiden heeft CLEVELAND deze protozoën in zijn zorgvuldige publicatiën (31, 32, 33, 34, 35, 36) nauwkeurig beschreven. Door scherpzinnige experimenten heeft hij aangetoond, dat juist de protozoën en niet de naast of zelfs in dezen levende bacteriën voor de ontleding der cellulose aansprakelijk zijn. DICKMAN (40) heeft dit punt later met nog meer nauwgezetheid gecontroleerd. Ondertusschen heeft CLEVELAND ook verschillende andere hout aantastende insecten gevonden, die geen protozoën in hun darm herbergen, maar cellulose splitsende bacteriën, zooals zij ook in den darm der larve van den rozenkever door WERNER gevonden werden (209). In de meeste gevallen schijnen het dus ook bij de insecten bacteriën te zijn, die het hun gastheer mogelijk maken, zich met cellulose te voeden, maar in enkele gevallen wordt deze rol door protozoën overgenomen. De door CLEVELAND gevonden cellulose ontledende darmprotozoën behooren tot verschillende geslachten en zelfs tot zeer ver uit elkaar liggende familiën, zoodat de vorming van cellulase zeer waarschijnlijk onder de protozoën algemeen verbreid is. Daar echter alle door hem beschreven vormen specifieke bewoners van den insectendarm zijn, is de vraag, of er ook vrij levende, grond of water bewonende, protozoën bestaan, die cellulolytisch actief zijn, niet zonder nader onderzoek te beantwoorden. Voorloopig zijn nog geen mededeelingen over zulke vormen aanwezig. Het moet echter niet onwaarschijnlijk geacht worden, dat op den duur ook vrij levende cellulose splitsende protozoën gevonden zullen worden. Met behulp van de gewone bacteriologische isoleeringsmethode kan men meestal geen protozoën isoleeren. Dat men hen bij de tallooze werken over de ontleding der cellulose door bacteriën en schimmels niet heeft gevonden, wil dus in het geheel niet zeggen, dat zij ook inderdaad niet voorkomen. Integendeel, in dezelfde richting voortgaande lijkt het mij zelfs niet hopeloos toe, om ook onder meercellige dieren naar cellulolytische organismen te zoeken.

§ 3. WERKEN VAN GERINGERE BETEEKENIS.

Behalve de tot nu toe besproken fundamenteele werken moeten volledigheidshalve nog publicaties vermeld worden, die slechts weinig tot de oplossing van het probleem der celluloseontleding hebben bijgedragen of alleen de resultaten van anderen bevestigen.

Zoo meende SACK (154, 155) in 1924 cellulose splitsende bacteriën, die tevens nitrificeerend werkten geïsoleerd te hebben. Daar zijn resultaten echter naderhand door niemand werden bevestigd, moeten zij voorloopig in twijfel worden getrokken. ISSATSCHENKO (64) gaf al eerder een korte, onvolledige beschrijving van semi-aërobe bacteriën, die hij in het zwarte slik op den bodem van zoutmeren vond. Volgens zijn meening kwamen ze overeen met de door VAN ITERSON beschreven organismen. Verder heeft SANBORN (156, 157, 158) in zijn werken over symbiose en groeistoffen verscheidene cellulose splitsende bacteriën geïsoleerd, waarvan hij hoofdzakelijk één soort, zijn *Cellulomonas folia*, beschrijft. Het is een typische vertegenwoordiger van het omnivore type van KELLERMAN. JENSEN heeft in 1931 in zijn breed opgezette onderzoekingen over de afbraak van cellulose in den grond (76) de meeste toen al bekend geworden organismen wederom geïsoleerd. Hij vond vibrionen en bacteriën van het type KELLERMAN, cytophagen, actinomyceten en schimmels. Hij beschreef al deze organismen echter niet uitvoerig. Tenslotte heeft LANGE-POSDEËWA (106) onlangs in den grond ook cellulose ontledende vibrionen en cytophagen gevonden. Zij heeft echter niet getracht deze soorten te isoleeren en nader te onderzoeken.

Een aparte plaats nemen de zuiver morphologisch-beschrijvende werken in zooals die van HENNEBERG (54) en zijn medewerkers en later ook van BAKER (7, 8) en BAKER en MARTIN (9, 10). Door hen werden de betreffende organismen niet geïsoleerd, maar uitsluitend in hun natuurlijk milieu na toepassing van differentiatie-kleuring waargenomen. Het is bij deze werkwijze heel moeilijk om met zekerheid uit te maken, of een organisme werkelijk cellulolytisch actief is, of slechts als begeleidend organisme of symbiont optreedt. In deze werken werden dan ook ettelijke organismen — spirillen, bacillen, diplococcen, streptococcen, enz. — beschreven, die alle vermoed worden aan de celluloseafbraak deel te nemen, maar deze resultaten blijven voorloopig nog volkomen speculatief.

Tenslotte zij nog vermeld, dat BOJANOWSKY (17, 18) in roode, ijzerhoudende gronden cellulose splitsende bacteriën en schimmels heeft gevonden, die een groote behoefte hebben aan ijzer en slechts groeien, wanneer de voedingsbodem meer dan 0.002 % oplosbaar Fe bevat. Een nadere beschrijving van de organismen geeft hij echter niet.

Enkele onderzoekers meenen aangetoond te hebben, dat niet alleen speciale organismen de cellulose aan kunnen tasten, maar dat ook alle andere gewone soorten daartoe in staat zijn, zij het dan ook in geringe mate. Zoo meenen o. a. ELLENBERGER (45) en HOPFFE (56, 57), dat in het darmkanaal van de herkauwers behalve de speciale cellulose ontledende organismen ook zulke algemeene soorten als *Bacillus megatherium, Bac. Ellenbachensis, Bac. butyricus, Bac. mesentericus*, enz., eenigermate de cellulose aantasten, en TROTMAN en SUTTON (188) schrijven de verwering van katoenweefsels, welke langzamerhand optreedt, toe aan de werking van heel algemeene organismen: *Bac. subtilis, Bac. mesentericus* en dergelijke. Al deze mededeelingen moeten echter nog terdege gecontroleerd worden, daar zij vermoedelijk op het gebruik van onzuivere cellulose of op het toepassen van gebrekkige analysemethoden berusten.

§ 4. BEPALING VAN CELLULOSE IN DEN GROND.

In aansluiting aan de tot nu toe besproken werken, die zich alle hoofdzakelijk met de microben zelf bezig hielden, moeten hier heel kort nog enkele chemisch-methodische werken vermeld worden, die de mogelijkheid geschapen hebben om de ontleding der cellulose in den grond nauwkeurig kwantitatief na te gaan. Het zijn voornamelijk de mededeelingen van CHARPENTIER, die aan vele van de bovenvermelde onderzoekingen den weg geëffend hebben. CHARPENTIER heeft n.l. in 1920 een nauwkeurige kwantitatieve bepaling van cellulose in den grond door extractie met SCHWEITZER's reagens uitgewerkt (24, 25, 26). Deze methode, die ik eveneens herhaaldelijk heb toegepast, is weliswaar niet ideaal en in humusrijke gronden verkrijgt men er slechts bij benadering juiste waarden mede, zij is echter zeer zeker bruikbaar en tot nu toe de eenige methode, waarover wij beschikken. Van de talrijke onderzoekers, die deze methode met succes hebben toegepast, noem ik slechts enkele: HEUKELEKIAN (55), WAKSMAN en HEUKELEKIAN (203) en JENSEN (76). Enkele jaren later heeft BENGTSSON (16) een aanvulling op het werk van CHARPENTIER geleverd door een methode uit te werken om de cellulose volgens het procédé van CHARPENTIER ook in die gevallen te kunnen bepalen, waarin men niet met zuivere, maar met geïncrusteerde ligninehoudende natuurlijke cellulose te doen heeft. Ook deze methode, waarbij het lignine eerst door de bekende sulfietuitlooging volgens KLASON wordt verwijderd, is gebleken goed bruikbaar te zijn. Aangespoord door het succes van CHARPENTIER en BENGTSSON hebben in de daarop volgende jaren verscheidene onderzoekers zich er op toegelegd, het verloop van de afbraak der cellulose in den grond nauwkeuriger na te gaan en daarbij ook de rol, die de stikstof bij de ontleding der cellulose speelt, nader vast te stellen. Hoofdzakelijk hebben WAKSMAN in verscheidene van zijn werken en BARTHEL met zijn medewerkers bijdragen hiertoe geleverd (BARTHEL en BENGTSSON (12, 13, 14); SÖDERBAUM en BARTHEL (173); ARLINGTON-ANDERSON (1)).

In minder gecompliceerde kunstmatige voedingsmedia en in zuiver kwartszand is de kwantitatieve bepaling van cellulose weliswaar veel eenvoudiger en soms kan zij door verasschen of zelfs door alleen maar uit te wasschen en te wegen bepaald worden. Toch zij hier nog vermeld de door KIESEL en SEMIGANOWSKY (90) voorgestelde methode om de cellulose chemisch tot suikers af te breken en daarna de gevormde glucose polarimetrisch te bepalen.

HOOFDSTUK II.

DE METHODIEK.

Een der eerste vereischten voor een vruchtbaar onderzoek van een bepaald microörganisme of van een groep van microben, is de beschikking over snelle en zekere isoleerings- en kweekmethoden. Daarom zal in dit hoofdstuk voornamelijk over het isoleeren van de cellulosesplitsers gesproken worden.

§ 1. OVERZICHT DER MEEST GEBRUIKELIJKE ISOLEERINGSMETHODEN.

In de jaren vóór VAN SENUS (166) en OMELIANSKI (123; 124) werkte men bij de onderzoekingen over de celluloseontleding uitsluitend met vloeibare media. Intusschen was echter de kweekwijze op vaste voedingsbodems in de bacteriologie ingevoerd, en VAN SENUS, OMELIANSKI en VAN ITERSON (66) waren de eersten, die ook de cellulosesplitsers op vaste voedingsbodems trachtten te kweeken. Zij bereidden een agarvoedingsbodem met daarin fijn verdeelde cellulose. Toch had geen van hen succes met dezen voedingsbodem. Pas KELLERMAN met zijn medewerkers is het gelukt den celluloseagar zoodanig te perfectionneeren, dat er een goede ontwikkeling van cellulose splitsende organismen op mogelijk werd (84; 85; 114; 115; 162; 163).

Doch ook na het succes van KELLERMAN hebben sommige onderzoekers tot op den huidigen dag nog moeilijkheden ondervonden bij het gebruik van den celluloseagar (o. a. PRINGSHEIM 140; DUBOS 43; WINOGRADSKI 211; 212; 213; 214), waarop zij vaak in 't geheel geen groei konden verkrijgen. Vermoedelijk zijn al deze teleurstellingen echter niet inhaerent aan den celluloseagar, doch een gevolg van fouten bij de bereiding (onvoldoende uitwasschen en dergelijke) want vele andere onderzoekers en ook ik hebben nooit moeilijkheden met den celluloseagar ondervonden.

Maar ook al kan men op den celluloseagar een voortreffelijke ontwikkeling van een zuiveren stam verkrijgen, dan nog is het soms moeilijk daarop een cellulosesplitser uit een veelvormige ruwe cultuur te isoleeren, daar de agar zelf vaak ook eenige voedingswaarde heeft, zoodat naast de cellulosesplitsers ook verschillende andere microben zich op dezen voedingsbodem eenigszins kunnen ontwikkelen. Het is dan ook begrijpelijk, dat velen naar een substraat uitgekeken hebben, dat alleen onaantastbaar substraat en niet tevens voedingsstof is. Als zoodanig werd in de eerste plaats de, sedert 1900 door WINOGRADSKI voor het kweeken van nitrificeerende organismen reeds gebruikte kiezelzuurgel aanbevolen, n.l. door BOJANOWSKY (17), DUBOS (43) en WAKSMAN (199) en later ook door WINOGRADSKY zelf (216), door KRZIEMIENIEWSKI (104; 105) en anderen. Hiermede konden zeer goede resultaten bereikt worden, maar de bereiding is vrij tijdroovend en de ermede vervaardigde platen zijn vaak moeilijk hanteerbaar, slecht steriliseerbaar en vrij onbestendig. Naast de kiezelzuurplaten zijn dan ook eenvoudiger substraten aanbevolen, n.l. ongeglazuurde porseleinplaten, gipsblokjes, en ten slotte zelfs uitgeloogd kwartszand of glaskralen. Op al deze

poreuze onderlagen kunnen òf papierschijven gelegd worden, òf er moet een laagje gemalen of gepraecipiteerde cellulose over uitgespreid worden. De cellulose bevindt zich hier dus steeds als een laag op het oppervlak en is niet — zooals bij de celluloseagar- of de kiezelzuurplaten — continu door het geheele substraat verdeeld, en dat is een groot nadeel.

De bij het isoleeren gevolgde werkwijze bleef langen tijd in beginsel dezelfde: men begon altijd met een cultuur der cellulosesplitsers in selectieve voedingsoplossingen en entte dan de daarbij verkregen ruwe cultures op den vasten voedingsbodem om geïsoleerd liggende koloniën te verkrijgen. Door het kweeken der ruwe cultures in vloeibaar milieu begunstigde men echter altijd een bepaalde groep der cellulosesplitsers, n.l. de echte bacteriën — de cellvibrionen en de bacillen — terwijl de overige groepen onderdrukt werden en daardoor langen tijd onopgemerkt bleven.

Dit gebrek van het vóórkweeken in vloeibaar milieu werd den laatsten tijd wel algemeen ingezien, men kon er echter aanvankelijk niet van afstappen, daar een andere voldoend electieve en toch voor alle cellulosesplitsers geschikte werkwijze niet bekend was. Tenslotte publiceerde WINOGRADSKI in 1932 een onderzoek (216), dat als een poging om uit deze impasse te komen opgevat kan worden. Hierin stelt hij een geheel nieuwe werkwijze voor het bestudeeren van de bodemmicroflora in het algemeen voor. Geen der tot nog toe gevolgde methoden bevredigt hem namelijk, noch de plaattelling, noch de verdunningsmethode, noch de directe telling in gekleurde grondsuspensies, noch het bestudeeren van geïsoleerde reine cultures. Vooral aan de laatstgenoemde wijze van onderzoek ontzegt hij elke practische beteekenis voor de studie van de werkzaamheid der verschillende microbensoorten in den grond. Door het rein kweeken schakelt men immers de wederkeerige inwerking der verschillende microörganismen op elkander geheel uit, waardoor de geisoleerde stammen zich heel anders kunnen gedragen dan in het complex der volledige microflora in den grond.

WINOGRADSKI stelt daarom voor, kiezelzuurplaten te gebruiken, die met de onontbeerlijke voedingszouten en met één energieleverende stof geimpregneerd zijn, waarop hij dan kleine grondkorreltjes uitstrooit. Rondom de gronddeeltjes ontwikkelen zich hierbij altijd die microben, voor wie het geboden voedingsmedium geschikt is. Het voornaamste voordeel van deze methode ziet WINOGRADSKI daarin, dat zich nu niet ongehinderd alle soorten zullen ontwikkelen, die de geboden stof kunnen aantasten, maar slechts die, welke in den concurrentiestrijd het meeste succes hebben, dus vanzelf diegenen, die in den natuurlijken grond ook het belangrijkst zijn voor de betreffende omzetting. WINOGRADSKI ziet hierbij echter over het hoofd, dat op de kiezelzuurplaten geenszins de natuurlijke omstandigheden van den grond heerschen. Alleen al de groote overvloed van de geboden voedingsstof is iets, dat in den grond niet voorkomt en nog bedenkelijker is het feit, dat de natuurlijke grond nooit een eenzijdige voeding aanbiedt, dus niet „electief" werkt, wat hier wel het geval is. Men kan dan ook met zekerheid aannemen, dat op deze kiezelzuurplaten heel andere microbensoorten tot ontwikkeling komen dan die, welke in den grond voor de omzetting van de betreffende stof in hoofdzaak verantwoordelijk zijn, namelijk de soorten die snel groeien en met eenzijdige voeding tevreden zijn, terwijl in den grond vaak juist de langzaam groeiende, autochthone soorten overheerschen. Deze kiezelzuurplaatmethode van WINOGRADSKI onderscheidt zich in principe eigenlijk niet van de oude aankweekmethode in electieve,

vloeibare voedingsmedia. Alleen is het vloeibare milieu hier door een vast vervangen, zonder aan de electiviteit afbreuk te doen, hetgeen wél het geval is bij het gebruik van niet absoluut indifferente stoffen zooals gelatine of agar.

Over het aantal der microben in den grond wordt men met deze methode in het geheel niet ingelicht, terwijl dat toch wel een zeer belangrijk punt is bij het onderzoek van de microflora van den grond. WINOGRADSKY heeft dit nadeel ook erkend en beveelt daarom, naast het uitstrooien van grondkorreltjes, ook het enten der platen met afgemeten zeer kleine hoeveelheden grondsuspensie aan. Daarmee wordt het vaststellen van het aantal wel mogelijk gemaakt, maar het grondprincipe der methode wordt daarbij uitgeschakeld; van een natuurlijke concurrentie van alle in den grond levende bacteriën is nu geen sprake meer. In deze modificatie is de methode niets anders dan het tellen van het aantal vertegenwoordigers van een physiologische groep op een electief voedingsmedium, met al de voor- en nadeelen daarvan.

§ 2. OVERZICHT DER EIGEN ISOLEERINGSMETHODEN.

De methodiek van het isoleeren en kweeken der cellulosesplitsers was en bleef dus vrij primitief, en — wat nog erger was — zeer eenzijdig, terwijl hierbij slechts de grootst mogelijke verscheidenheid tot het gewenschte doel zou kunnen voeren. Immers, bij de bestudeering van een physiologische groep, die, zooals men hieronder zal zien, haar vertegenwoordigers in bijna alle systematische groepen van microben heeft, is het geen overbodigheid of noodelooze zorgvuldigheid, maar absolute noodzakelijkheid, om de isoleeringsmethodiek zoo veel mogelijk te varieeren, daar elke werkwijze speciale levensvoorwaarden schept, die telkens weer voor andere leden van het bonte gezelschap der cellulose splitsende organismen de gunstigste ontwikkelingsmogelijkheden opleveren. De vele, vaak in de sterkste tegenspraak tot elkander staande meeningen, die men in de litteratuur ontmoet, kunnen dan ook vermoedelijk daarmee verklaard worden, dat de meeste onderzoekers, maar één werkwijze toepassend, daarbij altijd weer geheel andere organismen voor de eenige of tenminste voornaamste cellulosesplitsers hebben gehouden.

Wil men trachten volledig te zijn, daarbij niet naar voor de microbiologie geheel nieuwe methoden zoekend, dan kan men voor de aërobe cellulosesplitsing vele in principe verschillende aankweek- en isoleeringsmethoden onderscheiden:

1. Isoleering na voorafgaande vermeerdering in een ruwe cultuur.
2. Directe isoleering uit den grond.

De onder 1 genoemde vermeerdering kan geschieden:

a. In een vloeibaar voedingsmedium, met daarin verdeelde natuurlijke (uit elkaar geplukt filtreerpapier) of gepraecipiteerde (hydro-, hydraat- of oxy-) cellulose.

b. Op een vast substraat, waarvoor weer gebruikt kunnen worden: agar, kiezelzuurgel, vochtig kwartszand, glaskralen, gipsplaten en -blokjes, poreuze porceleinen platen, enz. In al deze gevallen kan de cellulose òf op de oppervlakte van het substraat worden aangebracht in den vorm van een laag fijn verdeelde, natuurlijke of gepraecipiteerde cellulose of als een stuk filtreerpapier of katoenen stof, òf zij kan regelmatig in het substraat verdeeld worden.

c. Op filtreerpapier, katoenen stof of watten, die gedeeltelijk uit de voedingsvloeistof omhoog steken, waarbij de organismen juist boven de vloeistofspiegel,

dus in zeer vochtige omgeving, maar toch op een vast substraat tot ontwikkeling komen. Dit is in zekeren zin een middenweg tusschen de beide eerstgenoemde methodes.

d. In natuurlijken grond, waarbij de cellulose (natuurlijke of gepraecipiteerde) hetzij zoo regelmatig mogelijk met den grond vermengd wordt, of integendeel hier en daar in grootere hoeveelheid wordt aangebracht (begraven stukjes filtreerpapier). Bij deze methode is enten, dat bij de drie vorige methoden noodzakelijk was, natuurlijk overbodig, aangezien hier de te onderzoeken grond zelf als substraat dient. Men kan deze vermeerdering buiten, in natuurlijke omstandigheden uitvoeren, maar ook in gemengde en naar behoefte voorbereide grondmonsters in het laboratorium.

Bij al deze vermeerderingsmethodes kan men de zuivere cellulose ook door het een of andere celluloserijke natuurproduct vervangen (stroo, zaagsel en dergelijke), waardoor men dichter bij den natuurlijken toestand in den grond komt.

De onder 2. genoemde directe isoleering uit den grond kan met behulp van ongeveer dezelfde methodes geschieden, als de zoojuist genoemde (behalve die onder *d*), alleen moet de rijkelijke enting nu door een zoo zuinig mogelijke vervangen worden. Ten slotte kan men alle hier opgesomde methodes nog veelvuldig varieeren met betrekking tot de samenstelling der voedingsoplossing, de soort van stikstofbron, de reactie van het substraat, enz., zoodat een welhaast oneindige reeks van modificaties denkbaar is.

Toen ik zelf het isoleeren van cellulose ontledende organismen ter hand nam en daarbij uit den overvloed van al deze kweekmethoden kon putten, leek het eerst alsof met het gebruik van elke nieuwe methode zich uit hetzelfde grondmonster steeds weer nieuwe cellulosesplitsers lieten kweeken. Eerst bij nadere kennismaking met de methodiek zag men, dat niet alle modificaties iets nieuws aan den dag brachten. Langzamerhand gelukte het, eenige methoden te kiezen en zoo te wijzigen, dat daarbij alle mogelijkheden, die van belang zijn bij het scheppen der levensvoorwaarden verwezenlijkt werden.

Het eigenlijke isoleeren werd door mij practisch gesproken altijd op celluloseagar uitgevoerd, hoewel ik volstrekt niet blind ben voor de bezwaren van dezen voedingsbodem. Op celluloseagarplaten ontwikkelen zich n.l. altijd ook veel microben, die met de celluloseaantasting niets te maken hebben en deze microorganismen hebben vaak naar het aantal zoodanig de overhand boven de cellulosesplitsers, dat de laatsten nauwelijks te vinden zijn in de veelheid der zich ontwikkelende koloniën. Daarom is vaak een verschuiving van getalsverhoudingen ten gunste van de cellulosesplitsers door de vermeerdering in een ruwe cultuur volstrekt noodig, zoolang men met agarplaten wil werken.

Als werkelijk *vaste* voedingsbodems kan men eigenlijk alleen de stollende gelen beschouwen, in dit geval dus slechts de agar en de kiezelzuurgel, waarin de cellulose gesuspendeerd en meegestold is. Bij alle andere z.g. „vaste" substraten bevindt de cellulose zich altijd alleen maar aan de oppervlakte, als stukjes filtreerpapier, katoenen stof of fijngemalen of gepraecipiteerd als een laagje. Hier is het water echter niet colloidaal aan de cellulose of het substraat gebonden, maar wordt alleen capillair tusschen de vezels vastgehouden. De microben ontwikkelen zich dus in een vrij beweeglijke vloeistof en kunnen zich daarin zeer gemakkelijk en snel voortbewegen, zoodat geen duidelijk begrensde koloniën ontstaan, maar groote gebieden der platen — soms de geheele oppervlakte — door hen worden overwoekerd. Op dit verschijnsel wijst WINOGRADSKY, die de met schijven papier bedekte kiezelzuurplaten aanbeveelt, trouwens zelf (216).

Helaas kleven echter ook aan de kiezelzuurcelluloseplaten, waarin de cellulose meegestold is, enkele bezwaren. Ten eerste moet de kiezelzuurgel na het stollen grondig uitgeloogd worden, vóór hij als voedingssubstraat dienen kan; daarom kunnen dergelijke platen slechts op de oppervlakte geënt worden, terwijl men bij agar de kiemen vóór het stollen toevoegt en ze dus door de geheele massa der plaat verdeelt. Het enten op de oppervlakte heeft echter het nadeel, dat veel organismen zich ver over het oppervlak kunnen uitbreiden, zoodat de koloniën vaak met elkander versmelten. Juist onder de celluloseaantastende bacteriën komen vele van zulke spreidende soorten voor. Bovendien is het heel moeilijk, zoo niet geheel onmogelijk, het uitloogen aseptisch te doen geschieden. Bij het streven naar werkelijk reine culturen is het gebruik van niet-steriele platen echter zeer ongewenscht, ook wanneer het substraat zooveel mogelijk electief is, want nà de ontwikkeling der cellulosesplitsers kunnen de sluimerende infectiekiemen gemakkelijk ten koste van de afbraakproducten tot ontwikkeling komen. Wel heeft BOJANOWSKY (17) een bereiding van kiezelzuurplaten beschreven, die vóór het stollen op de gewone wijze in de autoclaaf gesteriliseerd kunnen worden en na het stollen niet meer behoeven te worden uitgeloogd, maar mij is het niet gelukt om volgens dit recept bruikbare resultaten te verkrijgen. De gel werd niet stijf na het steriliseeren. Veranderde men echter de concentratie van waterglas en zoutzuur zoodanig, dat het stollen wel intrad, dan waren geen microben in staat om op deze platen te groeien zoolang zij niet uitgeloogd waren. Een ander nadeel der kiezelzuurcelluloseplaten is het langzame stollen, waardoor de in het nog vloeibare substraat verdeelde cellulose intusschen bezinkt, zoodat de bovenste lagen van de plaat, waarop de microben zich juist moeten ontwikkelen, zoo goed als cellulosevrij zijn. Wel kan men de sterkte van de waterglas- en zoutzuuroplossingen zóó kiezen (waterglas in veel hoogere en zoutzuur in veel lagere concentratie), dat het stollen bijna oogenblikkelijk na het mengen van de oplossingen intreedt, maar de zoo verkregen platen zijn hard en zeer bros. Over het algemeen is gebleken, dat de ontwikkeling van de cellulose splitsende microben op de veel hardere en drogere kiezelzuur-cellulose-voedingsbodems slechter is dan op de agar-cellulosebodems. Eenige soorten, bijv. sommige sporenvormende bacteriën en de meeste cytophagen willen op kiezelzuurplaten in het geheel niet groeien, ook niet op de meest verdunde gel.

Het zij mij veroorloofd, op deze plaats in het kort op een opvatting van STAPP en BORTELS over den invloed van agar op het ontwikkelingsvermogen van bepaalde cellulose aantastende organismen in te gaan. Deze onderzoekers meenen namelijk (174), dat agar voor vele cellulose splitsende organismen specifiek schadelijk zou zijn. Reeds 1 % zou remmend werken. Daarom bevelen zij een celluloseagar van slechts 0,7 tot 0,8 % agargehalte aan. Bij kiezelzuurgel echter bleek, dat een hoogere concentratie van het siliciumoxyde nog veel schadelijker is. Het lijkt mij dus juister, niet van de veronderstelling uit te gaan, dat agar of siliciumoxyde een schadelijke werking uitoefenen, maar aan te nemen, dat vele microörganismen zich bij het groeien in of op een hydrophiel gel des te beter ontwikkelen, naarmate deze gel waterrijker en dus meer verdund is. En dat schijnt bij alle gelatineuze stoffen het geval te zijn, onverschillig of het om een organische of een minerale stof gaat. Ik kan mij dus geheel en al bij de practische gevolgtrekking van STAPP en BORTELS aansluiten: men verkrijgt de beste resultaten wanneer men zoo sterk mogelijk verdunde agar of kiezelzuurgel gebruikt, maar hun verklaringswijze is naar mijn meening niet de juiste. Bij agar kan men inderdaad tot ongeveer 0,75 % agar afdalen, terwijl bij kiezel-

zuurgel ongeveer $1\frac{1}{4}$ % SiO_2 (= ongeveer $12\frac{1}{2}$ vol. % waterglas in het mengsel) als de laagste concentratie, die nog stolt, moet worden beschouwd.

Niettegenstaande al zijn fouten en tekortkomingen is de agar dus toch bij mijn onderzoekingen het beste substraat gebleken voor het bestudeeren van de cellulosesplitsing, en ze heeft het mogelijk gemaakt om snel een algeheele reinheid der cultures te bereiken, terwijl vele onderzoekers zich met ruwe cultures hebben moeten tevredenstellen, juist omdat zij zich niet van agarvoedingsbodems bedienden.

Het normale verloop van het isoleeren der cellulosesplitsers was nu meestal zóó, dat het betreffende grondmonster in natuurlijken vochtigen toestand zoo goed mogelijk gemengd werd, waarna met een deel van het monster groote diepe petrischalen van ongeveer 20 cm diameter gevuld werden. Eerst werd een laag van ca. 3 cm dikte aangebracht, regelmatig glad uitgespreid en licht aangedrukt. Hierop werd een rond stuk dun filtreerpapier (Durieux „Super") van 11 cm diameter gelegd en weer met 1 tot 2 cm van denzelfden grond bedekt en ook zacht aangedrukt. Daarop voegde ik aan den grond de gewenschte hoeveelheid water toe en bracht de schalen in den thermostaat bij ongeveer 20° of ongeveer 29° C., waar ik ze liet staan tot het papier voor het grootste gedeelte vergaan was. Gedurende dien tijd moest de vochtigheidsgraad van den grond zoo veel mogelijk constant blijven. De hierboven weergegeven handelwijze werd vaak vervangen door het begraven van ronde stukjes filtreerpapier in de vrije natuur, ook slechts enkele cm diep. Eenig voordeel boven de laboratoriummethode kon ik hiermee echter niet bereiken. Zoodra het papier voldoende aangetast was, wat in een vruchtbaren grond reeds na ca. 10 dagen het geval is, werd de bovenste grondlaag verwijderd en stak ik van het half vergane papier en van den daaraan grenzenden grond kleine stukjes uit. De zoo verkregen grond- en cellulosedeeltjes werden met steriel leidingwater of met gesteriliseerde voedingsoplossing (zie hieronder) in een kolfje van 100 cc inhoud vermengd, waarna van deze suspensie een rij opklimmende verdunningen gemaakt werd tot waarden van $1 : 10^6$ à $1 : 10^7$ toe, afhankelijk van den grond. Met de hoogere verdunningen werden op de gebruikelijke manier celluloseagarplaten gemaakt, die dan weer bij ongeveer 20° of 29° C. bewaard werden.

De andere helft van het oorspronkelijke grondmonster werd direct zonder eenige voorbehandeling gesuspendeerd, waarna ook hiermede zulke celluloseagarplaten bereid werden. Zoodra op al deze platen koloniën met heldere zones van opgeloste cellulose verschenen, kon men met een puntige entnaald deelen van deze koloniën uitsteken en in erlenmeyerkolfjes met steriele voedingsoplossing overbrengen. Hier werden de stukjes agar boven de vloeistof met behulp van een smalle, buigzame spatel tegen de glaswand zorgvuldig stuk gewreven en tenslotte in de oplossing gesuspendeerd. Van deze suspensie kon ik dan opnieuw een rij verdunningen maken en celluloseagarplaten vervaardigen. Kreeg ik ook dan nog geen reine cultures, dan werd de manipulatie nog één of enkele keeren herhaald.

Soms was het niet gemakkelijk om de betreffende organismen op deze wijze geheel rein te verkrijgen en moest ik mijn toevlucht nemen tot speciale maatregelen, om de laatste begeleidende organismen kwijt te raken. In enkele gevallen moest van den bovenstaanden gang van zaken zelfs geheel afgeweken worden. Zoo gelukte het bijv. niet, bij gebruik van grondsoorten, die zeer rijk aan organische stoffen waren, evenmin als met mest of compost, om de langzaam groeiende en kleine koloniën vormende vibrionen in voldoende mate te laten

groeien. Vaak werden zij geheel door de cytophagen, de sporenvormers, de schimmels en de actinomyceten overwoekerd. Dan moest een electieve cultuur op uit elkaar geplozen papier of op papierreepen in een voedingsoplossing worden ingeschakeld vóór de isoleering op celluloseplaten, waardoor alle andere groepen werden onderdrukt en slechts de vibrionen zich goed ontwikkelden. Overigens werd echter elk sterk electief werkend substraat zoo veel mogelijk vermeden.

Nog eenige bijzonderheden van zuiver practischen aard aangaande de bovenstaande werkwijze kunnen hier in het kort vermeld worden, daar zij van groote beteekenis zijn. Ten eerste komt men het gemakkelijkst tot het verlangde resultaat, wanneer men de platen zoo zwak mogelijk ent, ook al moet men daarbij zeer veel platen van dezelfde verdunning maken, daar men anders sommige minder talrijk optredende organismen in het geheel niet aantreft. Ik maak meestal 20 tot 25 parallelplaten, die dan alle zorgvuldig worden afgezocht. Kort voor het beëindigen van mijn onderzoekingen verscheen een publicatie van H. ENGEL [1]), waarin deze hetzelfde systeem met succes toepast bij het rein kweeken van nitrificeerende organismen. In het algemeen zou ik het overal aanbevelen, waar het er om gaat, een microbe te isoleeren uit een populatie, waarin het betreffende organisme in aantal naar verhouding zwak vertegenwoordigd is. Het lukt daarbij vrijwel elk organisme uit de gemengde populatie te isoleeren, slechts die organismen, welke zich alleen in symbiose met anderen normaal kunnen ontwikkelen, worden op deze wijze over het hoofd gezien, en aangezien de symbiose bij de celluloseaantasting in den grond een zeer groote rol speelt, moest ik naast de boven beschreven snelle isoleering van zelfstandig optredende microbensoorten ook steeds de in symbiose levende soorten opzoeken, waarbij juist zeer dik geënte celluloseagarplaten gebruikt dienen te worden.

Een ander punt dat aandacht eischt, is, dat de ontwikkelingssnelheid der verschillende cellulosesplitsers zeer verschillend is. Er komen daaronder zeer langzaam en traag groeiende vormen voor, en toch zijn deze vaak juist degenen, die in de natuur van beteekenis zijn: de echt autochtone soorten. Om deze organismen niet geheel over het hoofd te zien moet men de platen zeer lang in de thermostaat laten. Nadat de snelgroeiende vormen zich allang weelderig ontwikkeld hebben en overgeënt zijn, kunnen er nog in den loop van eenige weken nieuwe koloniën bij komen, die ook door een heldere zone omgeven zijn. Eerst na 5 tot 6 weken kan men aannemen, dat er geen verdere cellulose splitsende koloniën meer zullen verschijnen. Tot de langzaamste soorten behooren de myxobacteriën, de proactinomyceten en sommige soorten der echte actinomyceten, terwijl de snelstgroeiende cellulosesplitsers onder de schimmels worden aangetroffen. Bepaalde actinomyceten, de meeste cytophagen en eenige vibrionen groeien op celluloseagarplaten ook zeer snel, zoodat hun koloniën reeds drie dagen na het enten zichtbaar worden.

De lange incubatietijd maakt het noodzakelijk om het uitdrogen der agarplaten te voorkomen, in hoofdzaak omdat de platen steeds zeer dun moeten zijn, daar anders de celluloseoplossing om de kleine koloniën heen niet zichtbaar is. Wel kan men uit twee lagen bestaande platen maken, waarbij een dunne laag wit-troebele celluloseagar op een dikke laag heldere agar met dezelfde voedingszouten wordt uitgegoten. Zulke platen drogen niet alleen veel langzamer in, maar hebben ook het voordeel, dat de voedingszouten niet zoo snel uitgeput

---

[1]) ENGEL, H. u. SKALLAU, W.: Die Reinkultur nitrificierender Bakterien". Zentralbl. f. Bact., etc.; II, 97, 1937, 305.

zijn en de koloniën dus weelderiger uitgroeien. Hun bereiding is echter lastiger en biedt meer gelegenheid voor luchtinfecties. Daarom gebruikte ik meestal toch slechts dunne platen van één laag van 1 tot 2 mm dikte (10 cc agar in een petrischaal van ca. 10 cm diameter), maar bewaarde ze vochtig in zinken doozen. Het doelmatigst zijn hiervoor niet te kleine, goed sluitende doozen met dubbelen bodem, waarvan de binnenste geperforeerd is en voor het reinigen geheel verwijderd kan worden. Tusschen de beide bodems bevindt zich water. In deze doozen kunnen zelfs de dunste agarplaten wekenlang bewaard worden zonder uit te drogen, alleen moet men de doozen nu en dan desinfecteeren, daar in de voortdurend vochtige atmosfeer schimmelsporen zich zeer gemakkelijk ontwikkelen en de geheele ruimte op den duur infecteeren.

Wanneer een electieve kweek in een vloeibaren voedingsbodem gewenscht was, gebruikte ik òf de klassieke en reeds vaak omschreven methode van de streepjes filtreerpapier in reageerbuizen, waarbij het papier gedeeltelijk in de vloeistof hangt en gedeeltelijk erboven uitsteekt, òf kolfjes met een voedingsoplossing en geheel daarin ondergedompelde cellulose. Er zij op gewezen, dat de reepen in de reageerbuizen niet te smal moeten zijn. Zij mogen $^1/_3$ van den omtrek der buis innemen. De ontwikkelingsruimte wordt hierdoor vergroot en het papier blijft beter aan het glas kleven en scheurt bij den vloeistofspiegel niet zoo gemakkelijk af zoodra het verteert. Bij het werken met ondergedompelde cellulose bleek het wenschelijk te zijn, geen stukjes onbehandeld filtreerpapier te gebruiken, maar een papje van stukgekookt papier. Deze pap kan men in voorraad klaarmaken, drogen en fijn uit elkaar geplozen bewaren. Voor de cultures worden dan erlenmeyerkolfjes van ca. 100 cc gebruikt. Per kolfje moet men niet meer dan 25 cc voedingsoplossing gebruiken om zoo veel mogelijk aërobe omstandigheden te scheppen. Van de cellulose wordt ca. 1 % toegevoegd. De ingedroogde vezels vallen bij het steriliseeren vanzelf uiteen en een zwak omschudden is reeds voldoende om de geheele inhoud der kolfjes in een gelijkmatige losse cellulosebrij te veranderen.

Zeer belangrijk is bij deze beide methodes de keuze van het papier. Ten eerste komen natuurlijk slechts geheel zuivere papiersoorten in aanmerking. Zij mogen geen verontreinigingen bevatten en de cellulosevezels moeten zoo min mogelijk chemisch veranderd zijn. Bovendien verdient het aanbeveling fijnvezelig, zuiver wit en compact maar dun filtreerpapier te gebruiken, aangezien de aantasting van het papier en de ontwikkeling der organismen hierbij het duidelijkst zichtbaar is. Ik gebruikte meestal „Super" van Durieux.

§ 3. BEREIDING EN GEBRUIK VAN DE CELLULOSEAGAR.

Wat het gehalte aan cellulose betreft, is het in den loop van mijn onderzoek gebleken, dat reeds zeer geringe hoeveelheden voldoende zijn. KELLERMAN c.s. (84), die voor het eerst de celluloseagar met succes gebruikte, en ook alle latere onderzoekers, die zich van dezen voedingsbodem hebben bediend, streefden naar een zeer hooge cellulose-concentratie, om melk-witte platen te verkrijgen. Men verwachtte, dat de gevormde oplossingsvelden duidelijker tegen de onveranderde agar zouden afsteken, naarmate de laatste witter en troebeler zou zijn. Deze opvatting bleek echter foutief te zijn. De cellulose is een zoo energierijke stof, dat reeds heel kleine hoeveelheden voldoende zijn om een weelderige ontwikkeling te verzekeren, wanneer de verdeeling maar voldoende fijn en gelijkmatig is. De heldere oplossingsvelden blijven bij hooge concentratie der cellulose

dus zoo klein, dat ze in het algemeen nauwelijks om de koloniën heen zichtbaar worden. De groeiende kolonie kan immers slechts een beperkte hoeveelheid cellulose oplossen, vóór de uitputting van de overige voedingsstoffen of de vorming van schadelijke splitsingsproducten iedere verdere groei verhindert. Breede duidelijke oplossingszones vormen zich dan ook alleen, wanneer slechts weinig cellulose in de agar is verdeeld. Ik gebruik meestal celluloseagar met slechts ca. ¼ % cellulose. De platen zijn dan wel niet „melk-wit" zooals KELLERMAN, WINOGRADSKY en anderen hen beschrijven, maar slechts licht troebel; de celluloseaantasters ontwikkelen zich hierop echter voortreffelijk en de ontstane oplossingsvelden zijn groot en steken voldoende tegen de om. geving af. Slechts in uitzonderingsgevallen verwerkte ik ½ % cellulose in de agar.

Wat de soort der gebruikte cellulose betreft, kan men in de litteratuur vaak de meening verkondigd vinden, dat eigenlijk slechts de natuurlijke, georganiseerde cellulose gebruikt mag worden, aangezien opgeloste en weer neergeslagen cellulosesoorten chemisch sterk veranderd zijn en hun omzetting dus niet voor die van de natuurlijke cellulose in de plaats mag worden gesteld. In het begin streefde ik er dan ook naar natuurlijke cellulose: watten of filtreerpapier, fijn te malen. De elasticiteit der chemisch onbeïnvloede cellulosevezels maakt echter elk stukwrijven of -malen zeer moeilijk, zoowel in natten als in drogen toestand. Tenslotte gelukte het met behulp van een kleine porceleinen laboratoriumkogelmolen door zeer langdurig malen cellulose in natten toestand fijn te verdeelen, zoodat het verkregen product voor het ongewapende oog een homogene melk-witte vloeistof leek, die zich ook zonder moeilijkheden tot celluloseagar liet verwerken [1]). Bij microscopische waarneming zag men echter duidelijk, dat de cellulosedeeltjes toch nog veel grooter waren dan de bijna onzichtbaar kleine vormlooze deeltjes der gepraecipiteerde cellulosesoorten. De oplossingsvelden om de koloniën heen vormden zich op met deze cellulose bereide agar dan ook langzamer en onregelmatiger dan bij gebruik van gepraecipiteerde cellulose. De gemalen cellulose was dus niet geheel en al bevredigend, zoodat ik van den beginne af aan daarnaast ook gepraecipiteerde soorten toepaste. Daarbij bleek mij in den loop des tijds, dat bij geen der talrijke onderzochte cellulosesplitsers verschillen in aantastbaarheid der verschillende cellulosevormen waarneembaar waren. Voor de aantastbaarheid is uitsluitend de dispersiteitsgraad beslissend. Ik heb geheel in overeenstemming met de bevinding van OTTO (129) geen enkel geval ontmoet, waarbij een organisme wel de oxy- of de hydro-cellulose, maar niet de natuurlijke plantenvezels kon aantasten of omgekeerd. De structuur van het cellulosemolecuul wordt bij de oxydatie of de hydratatie dus niet zoo sterk veranderd, dat de cellulolytische enzymen daardoor gemakkelijker of moeilijker erop kunnen inwerken.

Afgezien van de principieele beteekenis van deze waarneming voor de verklaring van het chemisme der enzymatische cellulosesplitsing, beteekent zij voor het practische vraagstuk van het werken met cellulose oplossende organismen, dat men rustig iederen vorm der cellulose gebruiken kan en zich daarbij door zuiver technische overwegingen kan laten leiden zonder dat men zich behoeft af te vragen, of een waargenomen omzetting van één cellulosevorm ook voor alle andere geldt. Daardoor kon ik het gebruik van gemalen cellulose geheel verlaten

---

[1]) Bij het begin van het onderzoek, toen wij nog niet over een kogelmolen beschikten, wendden wij ons hiervoor tot Prof. TENDELOO te Wageningen, die zoo vriendelijk was het werk op zich te nemen.

en in het vervolg uitsluitend met gepraecipiteerde cellulosesoorten werken. Onder de verschillende gepraecipiteerde producten gaf ik in den regel de voorkeur aan de volgens het voorschrift van SCALES (163) bereide hydrocellulose, aangezien de bereiding ervan zeer eenvoudig en goedkoop is.

Verder kan gepraecipiteerde cellulose ook bereid worden door het oplossen van de natuurlijke cellulose in koperoxyde-ammoniak-oplossing (oplossing van SCHWEIZER) of in geconcentreerde oplossingen van neutrale zouten (volgens NORTHRUP), waaruit de cellulose dan weer neergeslagen wordt met verdund zuur, respectievelijk door plotselinge sterke verdunning met water (122). Een voordeel van laatstgenoemde methoden ten opzichte van het oplossen in zwavelzuur is de veel geringere verandering, die het cellulosemolecuul daarbij ondergaat. Het oplossen der cellulose in sterke zuren is eigenlijk geen echte oplossing, maar de eerste phase van de hydrolytische afbraak. Een gedeelte der cellulose verliest men daarbij dan ook altijd, daar het niet meer neerslaat. Het is dus duidelijk, dat het ontstane neerslag hierbij geen natuurlijke cellulose is, maar een hydrolyseproduct van niet constante samenstelling. De hydrocellulose heeft ook een veel kleiner moleculairgewicht dan natuurlijke cellulose en staat tot de natuurlijke cellulose ongeveer in dezelfde verhouding als dextrine tot zetmeel. De oplossende werking van koperoxyde-ammoniak en van zoutloogen berust daarentegen op een slechts oppervlakkige hydratatie van bepaalde carbonylgroepen of lactonbindingen, zonder dat de lange keten van het cellulosemolecuul verbroken wordt. In beginsel wordt het cellulosemolecuul hierbij dus niet aangetast. De zoo ontstane cellulose kan men — volgens de opvattingen van SCHWALBE (165) — het best als cellulosehydraat beschouwen, waarbij bepaalde hydroxylgroepen geoxydeerd zijn tot carbonyl- of carboxylgroepen. Daar het echter, zooals gezegd, gebleken is, dat nóch de enzymatische oplosbaarheid, nóch haar waarde voor de microben veranderd worden door een geringe hydrolyse, is het bovenvermelde voordeel van het cellulosehydraat boven de hydrocellulose practisch van geen beteekenis, zoodat ik in den loop van mijn onderzoek eigenlijk uitsluitend met de hydrocellulose van SCALES werkte.

Het lijkt mij raadzaam, om hier in het kort de bereidingswijze der verschillende soorten van gepraecipiteerde cellulose te vermelden om den lezer eventueel verder zoeken in de litteratuur te besparen, maar vooral ook omdat de oorspronkelijke recepten vaak onvoldoende bleken te zijn uitgewerkt, en ik eerst na eenig experimenteeren en na vele mislukkingen tot de beste en meest productieve wijze van werken ben gekomen.

Methode van Scales (gewijzigd).

10 gr vetvrije watten worden vochtig gemaakt, waarna het overtollige water uitgeknepen wordt. Deze natte watten pluist men in niet te groote vlokken uiteen en brengt ze in een kolf van 1 L inhoud. Daarna giet men in de kolf een tot op 55 à 60° C. afgekoeld mengsel van 200 cc geconcentreerd (± 98 %) zuiver zwavelzuur en 120 cc water en schudt dan krachtig om, tot alle watten opgelost zijn. Onder het schudden wordt de vloeistof eerst erg taai en visceus, zoolang de vezels nog niet geheel opgelost, maar slechts opgezwollen zijn, maar dan wordt alles weer vloeibaarder en tegelijkertijd verdwijnen de wattenvlokken geheel. Zoodra deze toestand bereikt is, wat meestal reeds binnen een minuut het geval is, giet men de inhoud van de kolf plotseling uit in een groote overmaat (minstens 700 cc) koud water en roert meteen krachtig om. De hydrocellulose slaat dan

dadelijk als een melkwit, wolkachtig praecipitaat neer. Wenscht men een heel zuiver neerslag, zonder vezels of andere in het zuur niet opgeloste verontreinigingen, dan moet men de wattenoplossing niet onmiddellijk, maar door een grof glazen zuigfilter van Schott und Gen., Jena, in het water gieten. Hierbij moet men er echter op bedacht zijn, dat de visceuze oplossing veel te langzaam door het filter loopt, zoodat men dit op een zuigflesch bevestigen en onder sterk zuigen filtreeren moet. Het doelmatigst is het om tijdens het schudden der wattenvlokken met zuur, het noodige water door het zuigfilter in de flesch te gieten onder voortdurend zuigen. Wanneer men nu, nog vóór het laatste water door het filter is geloopen, de celluloseoplossing er op giet, wordt deze met vol vacuum doorgezogen en gelukt het, om de oplossing zóó snel te filtreeren, dat het verkregen rendement zeer hoog is. Met eenige oefening kan men op deze wijze 60 % en meer van de opgeloste watten terugwinnen. Het vochtig maken der watten vóór men het zuur opgiet is noodzakelijk, daar droge watten zich soms met een gelatineuze laag van halfopgeloste watten omgeven, maar binnenin met lucht gevuld blijven en dan slechts zeer langzaam uiteenvallen. In plaats van watten kan men natuurlijk ook filtreerpapier of elke andere soort zuivere cellulose nemen, maar door de losse structuur der watten werkt het zuur daarop bijzonder snel in, zoodat men juist met watten het beste succes heeft. Na het praecipiteeren der cellulose laat men deze bezinken in hooge, smalle vaten en hevelt de bovenstaande vloeistof af, waarop de vaten weer met water worden bijgevuld en omgeroerd. Nu laat men de cellulose weer bezinken, en herhaalt deze behandeling tot de vloeistof geen merkbare reactie op SO_4'' meer geeft. De zure reactie en de reduceerende suikers zijn dan uitgewasschen. Dit decanteeren duurt soms zeer lang — eenige dagen — daar de cellulose langzamer en onvollediger bezinkt naarmate zij schooner wordt, zelfs wanneer men warm water gebruikt voor het uitwasschen. Men kan tenslotte ook volstaan met een onvolledig uitwasschen van het zwavelzuur, als de gevormde suikers maar geheel verwijderd zijn. De laatste rest van het zuur kan men dan nog met $MgCO_3$ neutraliseeren. Het $MgSO_4$ dat hierbij ontstaat kan men bij de bereiding der voedingsbodems in rekening brengen, daar alle gebruikelijke voedingssubstraten toch $MgSO_4$ bevatten.

Koperoxyde-ammoniak-methode.

30 gr $CuSO_4 . 5aq.$ wordt in $1\frac{1}{2}$ L warm gedestilleerd water opgelost. Daarop voegt men geleidelijk ammonia toe tot er geen neerslag van $Cu(OH)_2$ meer ontstaat. Het vlokkige neerslag wordt afgefiltreerd en met water uitgewasschen tot het filtraat geen reactie op SO_4'' meer geeft. Het beste is om hiervoor fijne glazen zuigfilters van Schott u. Gen., Jena, te gebruiken. Nu lost men het praecipitaat in geconcentreerde ammoniakoplossing op tot een gezamenlijk volume van $\frac{1}{2}$ L. Bij deze intensief blauw gekleurde, visceuze oplossing — SCHWEIZER's reagens genaamd — voegt men 10 gr uitgeplozen zuivere watten (ontvet) of gesnipperd filtreerpapier en roteert het geheel daarop in een schudmachine gedurende eenige uren. Daarna filtreert men weer door een grof glasfiltertoestel om eventueel onopgeloste vezels en verontreinigingen te verwijderen en verdunt de oplossing dan met water tot 5 L. Daarop voegt men geleidelijk onder voortdurend roeren zooveel geconcentreerd zoutzuur toe tot de kleur der vloeistof en van het intusschen gevormde neerslag van blauw tot groenachtig omslaat. Nu roert men flink, opdat de gevormde zuurstofbelletjes uit het vlokkige celluloseneerslag kunnen ontwijken en dit bezinken kan. Na bezinking hevelt

men de heldere vloeistof af en vult weer met water bij. Bij deze bereidingswijze moet het uitwasschen zeer volledig gebeuren, daar de koperionen zelfs in heel zwakke concentratie nog schadelijk zijn. Ook hierbij verdient het aanbeveling warm water voor het uitwasschen te gebruiken.

Zoutloog-methode.

Men maakt een heete geconcentreerde oplossing van het zout in kwestie. Bij zouten, die kristalwater bevatten, zooals bijv. bij het door mij gebruikte $FeCl_3 . 6aq.$ behoeft men in het geheel geen water toe te voegen, want het zout smelt bij verwarming in het eigen kristalwater. In deze warme, geconcentreerde zoutloog lost men onder voortdurend roeren geleidelijk zooveel zuivere cellulose (watten of filtreerpapier) op, dat de vloeistof niet al te visceus wordt, en giet deze oplossing dan plotseling in een groote overmaat koud water. De cellulose scheidt zich daarbij als een fijn vlokkig praecipitaat af, dat daarna op de gewone wijze door decanteeren wordt uitgewasschen. Het verkregen product is ongeveer gelijk aan het met koperoxyde-ammoniak bereide en is dus een cellulosehydraat. Van alle metalen, die bij deze methode gebruikt kunnen worden, is volgens mijn meening ijzer het meest geschikt. IJzerzouten zijn goedkoop en absoluut onschadelijk, ook wanneer ze niet kwantitatief worden uitgewasschen. Wel is de hiermee verkregen cellulose niet wit maar roestbruin gekleurd door het adsorptief gebonden ijzeroxyde, schadelijk is dat echter in het geheel niet. Het is alleen eenigszins hinderlijk, omdat de in de celluloseagar gevormde oplossingsvelden door de bruine kleur van de agar niet zoo duidelijk waarneembaar zijn. Zwaardere metaalionen worden wel niet in zoo sterke mate adsorptief aan de cellulose gebonden als ijzer, zooals trouwens ook met koper bij de bereiding met koperoxyde-ammoniak het geval is, maar zij zijn vaak veel schadelijker.

Tenslotte zij er nog op gewezen, dat VAN ITERSON (66) reeds de z.g. „Viscosereactie" gebruikte tot het bereiden van fijn gepraecipiteerde zuivere cellulose. Aangezien ik deze omslachtige methode zelf echter nooit heb toegepast, kan hier geen nauwkeurig recept gegeven worden en kan ik over de voor- en nadeelen ervan ook geen eigen oordeel uitspreken.

Welken der zooeven genoemde wegen men ook kiest ter bereiding van gepraecipiteerde cellulose, steeds is het rendement niet van te voren bekend. Men moet na het laatste afhevelen dus het gehalte der vloeistof aan cellulose bepalen door een klein monster in te dampen en de droogrest te wegen. Daarbij blijkt soms, dat de cellulose zoo langzaam en los bezinkt, dat het eindproduct te veel verdund is en nog geen ½ % cellulose bevat. In zulke gevallen moet men dan zijn toevlucht nemen tot centrifugeeren of tot indampen op een waterbad.

Alvorens de behandeling van den celluloseagar af te sluiten moet nog gewezen worden op een zeer onaangename eigenschap van dezen voedingsbodem, die geheel onafhankelijk schijnt te zijn van de wijze van bereiding der gepraecipiteerde cellulose. De celluloseagar vertoont n.l. vaak een zeer snel verloopende uitvlokking der colloidale cellulose. Een zekere neiging tot uitvlokken heeft cellulose in agar altijd, maar meestal blijft het bij de vorming van zóó kleine vlokken, dat de agar voor het ongewapende oog volkomen homogeen troebel lijkt; de vlokjes zijn dan slechts bij sterke vergrooting zichtbaar. Soms echter gaat dit samenballen zoo ver, dat alle cellulose, die zich in de agar bevindt zich in zichtbare vlokken verdeelt met heldere agar er tusschen (fig. 1). Het is duidelijk, dat zulk

een onregelmatige verdeeling der cellulose zeer ongewenscht is. Wat als de eigenlijke oorzaak van die sterke agglutinatie moet worden beschouwd, is tot op heden nog onbekend; het verschijnsel treedt schijnbaar geheel zonder regelmaat op. Ook blijft het niet beperkt tot één bepaalde samenstelling van de agar, maar komt bij alle door mij gebruikte celluloseagarvoedingsbodems nu en dan voor. Zelfs in stijfselagar en calciumcaseïnaatagar vertoont zich hetzelfde verschijnsel af en toe. Het schijnt dus, dat iedere fijn verdeelde onoplosbare stof in agar soms plotseling agglutineeren kan. Al mijn pogingen om door verhooging of verlaging van de gezamenlijke electrolytenconcentratie in het voedingsmedium of door toevoeging van een onschadelijke electrolyt ($CaSO_4$) het vlokken tegen te gaan mislukten: de agglutinatie werd daardoor nóch versterkt, nóch onderdrukt [1]).

Daar het in den loop der tijden gebleken is dat het uitvlokken door langzaam afkoelen en stollen versterkt wordt, en juist kort vóór het stollen optreedt, zorgde ik er voor, de voedingsbodems na het steriliseeren zoo snel mogelijk af te koelen. De vooraf bereide reageerbuisjes met 10 cc agar per buis werden daartoe, zoodra zij uit de autoclaaf genomen konden worden, dadelijk in stroomend koud water gezet. En ook gedurende het enten lette ik er op, dat de reageerbuizen met de in kokend water gesmolten agar voor het enten zoo kort mogelijk in het waterbad van 38°—40° C bleven. Bovendien is het mij opgevallen, dat, terwijl krachtig roeren of schudden de ontstane vlokken weer doet verdwijnen, zacht heen en weer bewegen van de nog juist vloeibare agar het vormen van vlokken in de hand werkt. Daarom moest van het omzwaaien der cultuurdoozen na het ingieten van de agar voor een regelmatige verdeeling der kiemen worden afgezien en veranderde ik de methode zoodanig, dat het druppeltje entvloeistof niet meer in de cultuurschalen gepipetteerd werd, maar in de reageerbuizen met de afgekoelde agar. Deze werden dan eerst flink maar kort geschud en dan in de schalen uitgegoten. Hierin werd de agar dan echter niet meer aangeraakt voor hij gestold was. Door al deze maatregelen gelukte het, de agglutinatie vrijwel te voorkomen.

§ 4. GEBRUIK EN BEREIDING VAN KIEZELZUURPLATEN.

Voor het kweeken en isoleeren van cellulosesplitsers gebruikte ik de kiezelzuurplaten haast niet, wel echter in enkele gevallen voor voedingsproeven, waarbij elke andere energiebron naast de cellulose vermeden moest worden. Daarom moet hier de bereiding van de kiezelzuurgelplaten in het kort toch vermeld worden. Voor mijn doeleinden is het recept van WINOGRADSKY het beste gebleken. Men kan de verhouding tusschen waterglas en zoutzuur en ook beider concentratie zeer sterk laten varieeren en verkrijgt toch gelen die nog goed stollen, maar hun elasticiteit en hun watergehalte wordt hierdoor wel zeer sterk beïnvloed. Binnen zekere grenzen is het, zooals reeds gezegd, wenschelijk een gel samen te stellen, dat zoo eleastisch en waterrijk mogelijk is, en het recept van WINOGRADSKY voldoet juist aan deze eischen. Ik citeer het hier in het kort:

Zoo zuiver mogelijk Na-waterglas wordt met gedestilleerd water verdund tot op een s.g. van 1,07 (= ca. 17½ vol. %). Zuiver zoutzuur wordt eveneens

---

[1]) Prof. TENDELOO te Wageningen betuig ik hierbij mijn oprechten dank voor zijn raadgevingen met betrekking tot deze onderzoekingen.

met gedestilleerd water verdund tot op een s.g. van 1,1 (= ca. 20 gew. % HCl). Beide oplossingen mengt men in gelijke volumina met elkaar, daarbij het silicaat bij het zoutzuur gietend, niet omgekeerd, daar anders de vorming van kluitjes niet uitgesloten is. Het proces van het stijf worden duurt nu eenige uren, zoodat men zonder overhaasting het mengsel in de cultuurschalen kan gieten, waarin men het dan gedurende ca. 24 uur rustig laat staan. Dan worden de platen minstens 48 uur lang in stroomend water uitgeloogd. Voor het gebruik kan men de zoo toebereide platen nog trachten te steriliseeren, door ze hoogstens ½ minuut in hevig kokend water onder te dompelen. Daarna overgiet men ze met de vereischte hoeveelheid zoutenoplossing en laat die op een gesloten waterbad bij ten hoogste 55° C verdampen. De voedingszouten diffundeeren dan door de geheele gellaag. Men moet niet meer dan 2 tot 3 cc zoutoplossing per plaat van ± 10 cm diameter nemen. De concentratie der oplossing moet dus voldoende hoog zijn om in de gel het gewenschte gehalte der voedingszouten te verkrijgen. De zoutoplossing kan vooraf gesteriliseerd worden. Bij het drogen van de platen moet men erop letten, dat ze niet te lang op het waterbad blijven, daar anders gemakkelijk scheuren ontstaan en de gel brokkelig wordt. Tenslotte worden de platen met vochtig steriel filtreerpapier bedekt.

De genoemde steriliteitsmaatregelen maken het mogelijk op deze wijze inderdaad zeer zuivere cultures te krijgen. Geheél rein zijn ze echter nooit, omdat het onderdompelen in kokend water gedurende ½ minuut de sporen en de meest resistente organismen niet doodt. Voor het verkrijgen van reine cultures zijn kiezelzuurplaten dus niet bruikbaar, tenzij na koude sterilisatie in den damp van antiseptische middelen. Kiezelzuurgelplaten verdragen deze sterilisatie echter zeer slecht, aangezien het noodzakelijke herhaalde evacueeren gedurende en na het eigenlijke steriliseeren de platen te sterk doet uitdrogen, zoodat zij een netwerk van scheuren vertoonen en onbruikbaar worden.

In de enkele gevallen, waarin ik geprecipiteerde cellulose in de kiezelzuurgel wilde verdeelen, moest ik van het recept van WINOGRADSKY afwijken om een zeer snel stollend gel te verkrijgen, waarin de cellulose niet merkbaar bezinkt tijdens het vast worden. Hiertoe mengde ik gelijke volumina van een eenigszins geconcentreerdere waterglasoplossing met een s.g. van 1,1 (= ± 25 vol. %) met veel zwakker zoutzuur van slechts 1,012 s.g. (= ± 2½ % HCl), waarin 0,5 % cellulose werd verdeeld. Het stollen trad hierbij bijna oogenblikkelijk in, zoodat men niet tevoren kon mengen, maar de beide oplossingen apart in de cultuurschalen moest gieten om ze dan zoo snel mogelijk door omzwaaien te vermengen vóór ze hard werden. Hierbij kon men reeds een kwartier na het gieten der platen beginnen met ze te spoelen, en door het veel lagere gehalte aan Cl-ionen waren ca. 12 uur hierbij meestal reeds voldoende. Overigens werden deze platen net zoo behandeld als die welke volgens het recept van WINOGRADSKY bereid waren.

§ 5. DE CHEMISCHE SAMENSTELLING DER VOEDINGSBODEMS.

Hierover kan ik kort zijn, daar de cellulosesplitsers in dit opzicht geenszins abnormale eischen stellen. Na eenig experimenteeren kwam ik tenslotte tot de volgende samenstelling der voedingszouten, die in alle substraten — cellulose-agar, voedingsoplossingen, kiezelzuurgel, e. a. — verwerkt werden:

0,1 %	K_2HPO_4	De pH stelde zich hierbij na sterilisatie op ca. 8,1 in.
0,05 %	$MgSO_4 . 7aq$.	
0,03 %	NH_4NO_3	

Deze samenstelling bleek vrijwel steeds bruikbaar te zijn. Slechts in enkele gevallen moest de minerale stikstofbron door een organische vervangen, of de organische naast de minerale gegeven worden. Dan was pepton meestal de beste vorm van organische stikstof.

Dat ik mij tot de kwantitatief voornaamste elementen kon beperken en alle spoor-elementen kon weglaten, is het gevolg van het gebruik van het plaatselijke leidingwater en niet van gedestilleerd water. Dit noord-hollandsche leidingwater is n.l. zeer hard en rijk aan zouten. Ter oriënteering zij hier de analyse van dit water meegedeeld: (in mgr per L, als het gemiddelde van de seizoenwisselingen)

Droogrest	± 300 (bij 130° C gedroogd)		Mn_3O_4	±	0,03
Cl'	±	40	CO_2 (vrij)	±	5
Na'	±	25	CaO	±	100
NaCl	±	65	MgO	±	10
NO_2'	sporen		vrije O_2	±	6
NO_3'	±	2,5	Cu	±	0,005
PO_4'''	sporen		Ni	±	0,00015
NH_4'	±	0,2	Co	±	0,0003
Fe_2O_3	±	0,1	Mo	±	0,0001
J_2	±	0,003			
B	±	0,009			

Een hooger gehalte der voedingsbodems aan NaCl, dat in de litteratuur zoo vaak wordt aanbevolen, bleek overbodig te zijn, soms zelfs nadeelig.

Het NH_4NO_3 kan zonder bezwaar ook door KNO_3 of een ander nitraat worden vervangen, maar niet door $(NH_4)_2SO_4$, daar hierdoor vaak een verhooging van de aciditeit intreedt tijdens de ontwikkeling der microben. Een buffer in den vorm van fijn verdeeld krijt is meestal ongewenscht, daar dit de voedingsbodems troebel maakt en in vloeibaar milieu toch zeer onvolledig werkt, omdat het op den bodem bezinkt.

Voor het kweeken van schimmels werd vaak een zwak zure voedingsbodem gebruikt, namelijk met een pH van 6,2. Hiervoor werd als stikstofbron $(NH_4)_2SO_4$ gebruikt en het tweebasische kaliumphosphaat vervangen door het eenbasische.

De beide zooeven genoemde zoutmengsels — het normale, neutraal tot alkalische, en het zure — hebben bij al mijn onderzoekingen goed voldaan en het is mij niet gelukt de samenstelling zoo te veranderen dat men daardoor een nog betere ontwikkeling der microben kreeg.

En toch zijn deze recepten uit theoretisch oogpunt bezien niet bevredigend. Bij hen vindt men namelijk de fout, die ook de meeste in de litteratuur aanbevolen voedingsbodems hebben en die altijd aan de opmerkzaamheid ontsnapt: men geeft tegelijkertijd phosphaat en $Mg^{\cdot\cdot}$ en meestal ook $NH_4^{\cdot}$. Daarbij wordt altijd een neerslag van $Mg_3(PO_4)_2$ gevormd en vaak ook van de heel moeilijk oplosbare magnesiumammoniumphosphaten. Bij agarvoedingsbodems is dat niet zoo erg, omdat het fijne neerslag evenals de cellulose gelijkmatig in de agar verdeeld wordt, maar in een voedingsoplossing hoopt het zich als een laagje op den bodem op, terwijl de vloeistof veel minder voedingszouten bevat dan het recept aangeeft. Slechts de omstandigheid, dat de concentraties der zouten

zeer sterk kunnen worden gevarieerd zonder merkbaren invloed op de microorganismen, maakt het mogelijk om met de bovengenoemde recepten goede resultaten te verkrijgen. Men kan dus ook gerust in plaats van K_2HPO_4, $MgSO_4$ en NH_4NO_3, al van te voren KNO_3 en magnesiumammoniumphosphaat geven, wanneer het laatste maar voldoende fijn is.

Lang niet alle cellulose splitsende microben zijn in staat op de tot nu toe beschreven volkomen synthetische voedingsbodems te groeien. Sommigen verlangen naast cellulose nog enkele andere organische verbindingen, zooals eiwitten of oplosbare koolhydraten; maar een heel groote groep van cellulosesplitsers kan wel voor haar energiewinning volstaan met cellulose, doch komt slechts met behulp van bepaalde „groeistoffen", die vaak de rol van vitaminen of auxinen spelen, tot ontwikkeling. Over dit verschijnsel zal echter in het vijfde hoofdstuk nader worden gesproken. Hier kan er alleen op gewezen worden, dat in al deze gevallen specifieke voedingsoplossingen bereid moesten worden, waarvan de bereiding tegelijk met de beschrijving der microben in kwestie nauwkeurig zal worden aangegeven.

§ 6. BEPALING VAN HET KIEMGETAL.

Hierover kan ik kort zijn, daar er in het vierde hoofdstuk op teruggekomen zal worden. Het is zonder meer duidelijk, dat zoolang het kweeken der verschillende cellulosesplitsers op verschillende voedingsbodems en onder verschillende omstandigheden moet geschieden, men ze ook onmogelijk allen tegelijk kan tellen. Ook bij het tellen moet men eenige methoden naast elkander gebruiken, waarbij telkens slechts een gedeelte der cellulosesplitsers geteld kan worden. Voor het tellen van actinomyceten, proactinomyceten, bacillen, basophiele schimmels, myxobacteriën, vibrionen en cytophagen gebruikte ik de plaatmethode op gewone celluloseagar. De acidophiele schimmels telde ik eveneens op celluloseagarplaten, maar op de zure modificatie. Het aantal cytophagen kon men soms het best in vloeibaar voedingssubstraat met een reep papier bepalen, volgens de klassieke verdunningsmethode. De vibrionen ten slotte werden vaak niet alleen op platen maar tevens volgens hetzelfde verdunningssysteem, doch in erlenmeyerkolfjes met papierbrij in de voedingsoplossing geteld.

Afgezien van de fouten die de plaat- en de verdunningsmethode als zoodanig eigen zijn (zie hoofdstuk IV), moet men bij het tellen van de cellulosesplitsers nog met enkele specifieke moeilijkheden rekening houden. Zoo wordt de plaatmethode zeer gehinderd door de mogelijkheid van ontwikkeling van nog andere, niet tot de cellulosesplitsers behoorende organismen, terwijl bij het tellen in de reageerbuisjes met papierstrooken zich twee omstandigheden op onaangename wijze doen gelden: ten eerste worden de papierstrooken vaak geheel door schimmels overwoekerd, ook wanneer men een voedingsoplossing met duidelijk alkalische reactie gebruikt, en ten tweede ontwikkelen de meeste microben zich alleen wanneer zij in onmiddellijk contact met de cellulose staan, dus slechts als de kiemen *op* het papier kleven, doch niet wanneer zij vrij in de vloeistof rondzweven. Men vindt hierbij dus altijd veel te lage waarden. Bij contrôleproeven met reine cultures kon deze fout in de methode met zekerheid worden aangetoond.

Het bepalen van het kiemgetal van de verschillende cellulose aantastende organismen is en blijft dus een zwak punt. Een bevredigende oplossing van dit probleem te vinden is mij niet gelukt. Waar dus verderop bij de behandeling

van de verspreiding en de beteekenis der verschillende organismen in den grond (hoofdstuk IV) hun aantal wordt meegedeeld, moet men deze getallen niet als absolute, direct bepaalde waarden opvatten, maar als de waarschijnlijkste getallen, die ik op grond van ervaring uit talrijke, op verschillende wijze uitgevoerde bepalingen heb afgeleid. Een grootere nauwkeurigheid kunnen zij niet geven. Hun waarde moet dus in hoofdzaak daarin gezocht worden, dat zij een inzicht geven in de relatieve beteekenis der verschillende cellulosesplitsers.

Een nauwkeurige omschrijving van mijn werkwijze bij de tellingen volgens de plaat- of de verdunningsmethode behoeft niet gegeven te worden, daar ik geheel volgens de algemeen bekende gestandaardiseerde methoden te werk ga. In den regel vervaardig ik bij de plaattelling 10 parallelplaten en bij de verdunningsmethode 5 parallelkolfjes of -buisjes per verdunning.

§ 7. KWANTITATIEVE BEPALING DER CELLULOSEONTLEDING.

Kwantitatieve opgaven omtrent de ontleding der cellulose door de bestudeerde microben vindt men in de litteratuur slechts zelden. In den regel vergenoegde men zich met het vaststellen van de ontleding zonder meer. Op groote schaal heeft eigenlijk alleen KALNINS (80) de celluloseontleding kwantitatief bestudeerd. Hij maakte daarbij gebruik van een voedingsvloeistof, waarin vrij groote gevouwen stukken filtreerpapier ondergedompeld waren. De gewichtsvermindering van het papier na uitspoelen en drogen was een maat voor de celluloseontleding. Ongeveer dezelfde werkwijze werd ook toegepast door SANBORN (156, 157), SIMOLA (168) en door WAKSMAN (193). Steeds werd dus in *vloeibaar* milieu gewerkt, met als gevolg een zeer ongelijke bevoordeeling van sommige microben ten opzichte van andere. Vloeistofcultures bieden slechts voor enkele soorten gunstige levensvoorwaarden — vooral voor de bacillen en een deel der cellvibrionen, terwijl de meeste organismen (cytophagen, polyangiden, actinomyceten, etc.) daarin niet groeien. Op vaste voedingsbodems daarentegen zijn alle cellulosesplitsers even goed in staat te groeien, zoodat vaste voedingsbodems veel meer geschikt zijn voor een kwantitatief vergelijkend onderzoek der celluloseontleding.

Ik koos daarvoor dan ook, na enkele oriënteerende proefnemingen, de boven reeds omschreven agarvoedingsbodem, waarin nu echter geen cellulose gesuspendeerd was. Nu konden zorgvuldig uitgeloogde, gewogen stukjes filtreerpapier óp deze agar gelegd worden en beënt met het te onderzoeken organisme. Na verloop van den vereischten incubatietijd werd de rest van het papier van de agar afgespoeld en na zorgvuldige wassching en droging opnieuw gewogen. Ik gebruikte hierbij reageerbuizen met schuin gestolden agar, waarop kleine gesteriliseerde strookjes filtreerpapier gelegd werden. Het werken in reageerbuizen had boven dat in petrischalen het voordeel van een veel gemakkelijker behoud der steriliteit en ook het afspoelen der papierresten was hierbij handiger. Dit laatste geschiedde met een spuitflesch en een nikkelinespateltje of glasstaafje, waarbij alles in getarreerde porceleinen filterkroesjes gespoeld werd, waarin dan het uitwasschen en drogen geschiedde.

Een optimale ontleding der cellulose wordt bereikt bij het gebruik van heel kleine stukjes papier; dan toch wordt een zoo gunstig mogelijke verhouding tusschen voedingszouten en reactieproducten gehandhaafd, ook bij een ver-

gaande ontleding van het papier. Ik gebruikte in den regel streepjes van het dunne filtreerpapier van Durieux „Super" van slechts 2 × ½ cm. Zij wogen ca. 7,7 mgr. De reageerbuis werd met ca. 8 cc agar gevuld, zoodat een groote voedingsreserve ontstond en dus de cellulose en niet andere levensstoffen als limiteerende factor optrad. Het indrogen van den agar tijdens de incubatie moest voorkomen worden door het plaatsen der buizen in een vochtige atmosfeer of door het toevoegen van enkele druppels water na verloop van ± 14 dagen.

De met bovenstaande methode verkregen uitkomsten waren zeer bevredigend, en — wat vooral van belang is — zeer goed reproduceerbaar, zoodat in den regel goed kloppende duplobepalingen bereikt konden worden. Bij vergelijking met de door KALNINS, SIMOLA of WAKSMAN verkegen ontledingspercentages, bleek mijn methode in vrijwel alle gevallen hoogere uitkomsten te leveren, en in sommige gevallen zelfs véél hoogere. Vrijwel alle in de volgende hoofdstukken vermelde cijfers van de celluloseontleding zijn op deze wijze verkregen, waarbij de samenstelling van den voedingsbodem vaak al naar behoefte aanmerkelijk gevarieerd kon worden (toevoeging van suikers, pepton of groeistoffen naast de gewone zouten).

Slechts één nadeel kleeft aan deze methode: de niet oplosbare reactieproducten, die door sommige cellulosesplitsers — zooals de cytophagen — soms in groote hoeveelheid gevormd worden, worden hierbij meegewogen en drukken dus de ontledingspercentages niet onaanzienlijk; ook de organismen zelf zijn door het uitwasschen niet van het papier te scheiden, hetgeen vooral bij de myceliumvormende schimmels en actinomyceten van belang is. Deze fouten heeft mijn werkwijze dus gemeen met de andere methodes in voedingsvloeistof.

De boven besproken bepalingen hebben betrekking op werk met reine of althans gezuiverde cultures. In den grond en dergelijke substraten heb ik mij bediend van de methode van CHARPENTIER (24, 25, 26), die ik in vrijwel ongewijzigden vorm toegepast heb. Zij behoeft hier dan ook niet opnieuw beschreven te worden. Helaas bleek deze methode echter alleen in humusarme gronden voldoende nauwkeurig te zijn, terwijl in humusrijkere gronden naast de cellulose te veel humuszuren uit het SCHWEITZER'S-reagens door het zuur neergeslagen worden, zoodat de cellulose daarbij geheel overschaduwd wordt. In de meeste vruchtbare gronden moest ik dus volstaan met een empirische bepaling van de ontleding van filtreerpapierschijven volgens CHRISTENSEN (27, 28, 29). De uitvoering dezer bepaling was dan zoodanig, dat in den te onderzoeken grond in groote petrischalen schijven filtreerpapier begraven werden, zooals op pag. 13 aangegeven werd bij het bespreken van de isoleering van celluloseontleders. Daarna werd de graad van aantasting van het papier periodiek nagegaan en noteerde ik het aantal dagen, dat noodig is voor het bereiken van een volledige ontleding of van een bepaalden graad van aantasting.

BESCHRIJVING DER CELLULOSE ONTLEDENDE ORGANISMEN.

Zooals reeds in het hoofdstuk over de methodiek werd medegedeeld, heb ik getracht, zooveel mogelijk verschillende cellulosesplitsers te isoleeren. Inderdaad gelukte het mij daardoor, achtereenvolgens ongeveer alle in de litteratuur bekende cellulose aantastende bacteriën te vinden als ook eenige nieuwe soorten. Voor men zich met de vraag gaat bezig houden, welke rol en relatieve beteekenis al deze microben in de natuur hebben, moeten zij stuk voor stuk besproken en nauwkeurig gekarakteriseerd worden. Deze beschrijving moet eenerzijds een uitbreiding en aanvulling van reeds door anderen gegeven beschrijvingen zijn, anderzijds echter ook als critiek op hun gegevens dienen, namelijk in al die gevallen, waarin mijn opvattingen van die van vroegere onderzoekers afwijken. Ik heb echter niet gestreefd naar een volledige beschrijving van die organismen, welke reeds eerder uitvoerig beschreven zijn.

§ 1. EUBACTERIALES.

Reeds dadelijk kan worden aangestipt, dat het vermogen om cellulose aan te tasten onder de *Eubacteriales* zeer verspreid is: zoowel onder de *Bacteriaceae* als onder de *Pseudomonadaceae* en de *Bacillaceae* vindt men deze eigenschap. Slechts onder de *Coccaceae* is zij nog niet met zekerheid aangetoond.

Het juiste plaatsen van al de waargenomen organismen in he systeem was soms niet gemakkelijk. Er moet nl. meteen de nadruk op gelegd worden, dat het onderzoek van de cellulose splitsende bacteriën het mij onmogelijk heeft gemaakt om mij bij één der vele opgestelde systemen aan te sluiten. Onder de cellulose splitsende bacteriën komen namelijk zóó veel overgangen tusschen systematisch ver uit elkaar gelegen groepen voor, en vindt men zóó veel gevallen, waarbij in één organisme twee eigenschappen verbonden zijn, die anders als karakteristiek voor twee principieel verschillende groepen in het systeem waren aangegeven, dat twijfel aan de systematische waarde van deze eigenschappen vaak niet te onderdrukken is.

Zoo heb ik, naast typische bacillen met peritriche zweepdraden en endosporenvorming, typische vibrionen met lophotriche zweep-

draden en duidelijk schroefvormigen lichaamsbouw, en typische actinomyceten met wijdvertakt mycelium ook vormen gevonden, die overgangen van de peritriche naar de lophotriche zweepdraden vertoonden, en zeer vele vibrionen, die zóó kort en recht waren, dat men ze even goed ook tot de *Coccaceae* of tot de *Bacteriaceae* had kunnen rekenen. Ook ontbraken de van zweepdraden voorziene vormen met levendige beweging onder de actinomyceten niet, waarbij het mycelium in korte, bacterium- of monasvormige brokstukjes uit elkaar viel, zooals dat in den laatsten tijd in andere physiologische groepen vaak beschreven is (52, 186, 187). Tenslotte liet ook de diagnose volgens de Gram-kleuring mij vaak in den steek, zoodat ik b.v. in de groep der korte vibrionen naast elkander positieve en negatieve vertegenwoordigers aantrof. In de volgende beschrijving zal ik daarom in de eerste plaats de typische vertegenwoordigers van bepaalde morphologische eenheden beschrijven, om daarna de overgangsvormen in het kort te vermelden.

a. Vibrionen.

Tot de meest voorkomende cellulosesplitsers behooren de echte vibrionen, die reeds meermalen beschreven zijn, o. a. door GRAY en CHALMERS, WINOGRADSKY, DUBOS, STAPP en BORTELS, IMSENETSKY en SOLNTZEWA (51, 214, 43, 174, 62). Het is dan ook niet noodig de door al deze onderzoekers aangegeven, algemeen erkende eigenschappen van deze organismen hier opnieuw op te sommen. Slechts enkele minder algemeen bekende eigenschappen zullen vermeld worden.

Morphologische kenmerken.

Het zijn meestal zeer kleine, uitermate beweeglijke, korte en slechts zwak gekromde vibrionen, die bij het ouder worden nog korter en onregelmatiger van vorm worden, zoodat in oudere cultures de voor vibrionen karakteristieke vorm nog maar nauwelijks te herkennen is. Het is daarom niet te verwonderen, dat vele onderzoekers in deze organismen in het geheel geen vibrionen zien, maar ze tot de *Bacteriaceae* rekenen (o. a. KELLERMAN). In vitale jonge cultures zijn ze echter wel karakteristieke *Pseudomonadaceae* volgens de terminologie van KLUIJVER en VAN NIEL [1]). Langere en duidelijk spiraalvormige soorten, dus echte spirillen, schijnen onder de cellulosesplitsers niet voor te komen. Typische vertegenwoordigers van deze groep zijn weergegeven in fig. 2, 3 en 4, terwijl de fig. 5, 6 en 7 hun groeiwijze op celluloseagar toonen.

---

[1]) A. J. KLUYVER en C. B. VAN NIEL, Zentralbl. f. Bakt. etc., II, 94, 369, 1936.

Voor de verdere morphologische karakteriseering van deze vibrionen zij er nog op gewezen, dat zij steeds stompe, afgeronde uiteinden hebben, hoewel het bij verscheidene stammen regel is, dat de cel in het middel iets dikker is dan aan de einden. WINOGRADSKY vermeldde deze bijzonderheid reeds (214). Als de versmalling van de uiteinden geprononceerd is, kan men bij oppervlakkige beschouwing den indruk van spitse uiteinden krijgen, wat bijzonder opvallend is bij eenige stammen, waarbij het chromatine in het midden der cel geconcentreerd is, zoodat de uiteinden der cellen moeilijk kleurbaar zijn (fig. 2 en 3). Toch zijn de uiteinden rond en niet spits zooals bij de cytophagen. WINOGRADSKY vat hen samen in het geslacht „*Cellvibrio*". In dit verband moet ik trouwens waarschuwen tegen het gebruik van dezen naam. Hij kan wel als een aanduiding voor deze groep van organismen dienen, maar als werkelijke geslachtsnaam is hij onbruikbaar, daar men in de groep der vibrionen naast cellulolytisch actieve, ook ontelbaar vele andere soorten aantreft, die ten opzichte van cellulose volkomen onwerkzaam zijn en toch nòch morphologisch, nòch overigens physiologisch van de *Cellvibrio*-soorten te onderscheiden zijn, terwijl anderzijds onder de actieve cellvibrionen vaak zeer groote morphologische verschillen optreden. Een door het geheele microbenrijk zoo veel voorkomend, maar in geen enkele groep voor alle soorten geldend, kenteeken als de cellulosesplitsing moet van polyphyletischen oorsprong zijn, en kan daarom hoogstens voor de karakteriseering der species, maar nooit voor die der hoogere systematische eenheden gebruikt worden. Deze overweging wil ik overigens niet slechts tot de groep der vibrionen beperken, maar tot alle cellulosesplitsers uitstrekken, zoodat ik liefst elke aanduiding der cellulosesplitsing in de nomenclatuur wil vermijden, behalve bij de soortnamen van het binomiale systeem.

De lengte der cellen verschilt niet alleen bij de verschillende soorten, doch is ook binnen één enkelen stam zeer variabel. Ten eerste neemt zij met het ouder worden der cultuur snel af, zoodat vele der *Cellvibrio*-stammen in oude cultures heel kort, bijna coccenvormig worden, maar ook vindt men tegelijkertijd zeer verschillende cellen — heel korte en veel langere — bij elkaar.

Het korter worden der cellen met den leeftijd gaat steeds met een vormverandering gepaard. De regelmatige staafjesvorm gaat steeds meer verloren en men ziet tenslotte in heel oude cultures een bonte mengeling van zeer verschillende, kortere, langere, dikkere, dunnere, opgezwollen en zelfs onregelmatig hoekige cellen, die gedeeltelijk door slijm tot grootere conglomeraten aaneengekleefd zijn. In dit stadium van involutie, waarbij de organismen overigens ook veel moeilijker

kleurbaar zijn geworden, hebben zij eigenlijk alle karakteristieke en duidelijke vormen verloren. Vermoedelijk heeft dit seniele stadium der cultures WINOGRADSKY ertoe geleid om aan de cellvibrionen een vermogen tot autolyse toe te schrijven. Een werkelijke autolyse heb ik bij hen echter nocit kunnen waarnemen, want ten eerste blijven zulke oude cultures nog maanden lang kiemkrachtig, en bovendien verdwijnen de cellen niet, maar worden slechts minder duidelijk.

Het aangeven van de absolute afmetingen der bacteriën acht ik van geringe beteekenis, daar deze te zeer afhankelijk zijn van de uitwendige levensvoorwaarden. Ter algemeene oriënteering kunnen echter de volgende getallen worden opgegeven: de langste vertegenwoordigers bereiken op celluloseagar in heel jonge cultures een maximale lengte van ruim 3 μ, terwijl de meeste individuen daarbij niet langer dan 2 μ zijn. Vaker komen echter stammen voor, die nooit langer dan ruim 2 μ worden, en in 't algemeen nauwelijks langer dan $1\frac{1}{2}$ à 2 μ zijn. Bij het ouder worden neemt de lengte der cellen snel nog meer af en meestal worden zij dan ook iets dunner, totdat tenslotte slechts ovale individuen overblijven van nauwelijks $1\frac{1}{2} \times 1$ μ. In het jeugdstadium bedraagt de dikte der staafjes $\frac{1}{2}$ à 1 μ. Al deze maten gelden slechts voor de soorten met groote cellen. Daarnaast komen echter ook talrijke fijnere, kleinere cellvibrionen voor, die op celluloseagar nooit grooter dan hoogstens $1\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$ μ worden (fig. 8). Of de kleinere stammen een afzonderlijke groep vormen betwijfel ik, daar ook overgangsvormen bestaan.

De plaatsing der zweepdraden is bij de typische cellvibrionen uitgesproken lophotrich, meestal zelfs monotrich. (fig. 9 en 9a). De beweeglijkheid is bij jonge cultures zeer groot. De meeste cellen schieten met zulk een snelheid door het preparaat, dat nòch hun vorm, nòch de aard van hun beweging daarbij duidelijk waargenomen kan worden. Maar reeds zeer spoedig beginnen vele individuen onbeweeglijk te worden en in eenige dagen oude cultures ziet men slechts enkele bewegende exemplaren te midden van een massa onbeweeglijke.

In verschillende oudere publicaties worden ook de macroscopische kenmerken uitvoerig bij de beschrijving behandeld. Daar deze kenteekenen echter meestal niet constant zijn en ook door omstandigheden van buitenaf sterk beïnvloed worden, zou ik ze liefst zoo weinig mogelijk in aanmerking willen nemen. De vorm der koloniën op agar is bij de cellvibrionen echter zeer karakteristiek. Zij vormen namelijk nooit duidelijk lensvormige gladde koloniën, maar altijd min of meer wolkachtige met vervloeide omtrekken (fig. 10). De vorm van bacteriekoloniën in agar hangt in de eerste plaats daarvan af, of de betrokken bacterie zich als een compacte massa ontwikkelt, de agar om zich

heen uit elkander splijtend, om dan de ontstane scheur op te vullen, of dat de afzonderlijke celletjes de agar binnendringen en de kolonie op die manier verdeeld in de agar laten groeien. De cellvibrionen behooren tot de tweede categorie, hoewel vaak overgangsvormen optreden, waarbij het binnenste compacte gedeelte der kolonie min of meer lensvormig van bouw is, terwijl een laag van in de agar binnengedrongen cellen de lens als een wolk omhult (fig. 11 en 12). Vermoedelijk is de verklaring voor het gemakkelijke binnendringen van afzonderlijke cellen der cellvibrionen te zoeken in het feit, dat zij allen de agar tot op zekere hoogte kunnen afbreken. Wel zijn slechts enkele soorten daartoe in zóó hooge mate in staat, dat de agarsplitsing als een van hun specifieke eigenschappen in het oog loopt, maar geheel onwerkzaam zijn ook de overige cellvibrionen niet. Op de agaroppervlakte spreiden de koloniën der cellvibrionen zich meestal zeer vlak uit als vochtig-glanzende verhevenheden, met gegolfden rand. Daarbij zinken zij, vooral aan de randen, eenigszins in de agar in, zoodat zeer karakteristieke vormen ontstaan (fig. 13). Dit inzinken van de koloniën in de agar is typeerend voor cellvibrionen en myxobacteriën, terwijl de sporenvormende bacillen en de actinomyceten en schimmels dit niet doen. Of het inzinken een gedeeltelijke vervloeiing van de agar of slechts een dehydratatie is, waardoor het volume kleiner wordt, is niet zonder meer te zeggen.

Ten slotte nog een paar woorden over de kleur der cellvibrionen. WINOGRADSKY en ook STAPP en BORTELS en IMŠENETSKY en SOLTZEWA deelen mede, dat de meeste cellvibrionen duidelijk en levendig gekleurd zijn; meestal geel, oranje tot bruin of groenachtig. Deze opvatting moet ik tegenspreken. Verreweg de meeste cellvibrionen zijn bijna kleurloos of slechts bleek geelachtig, bruinachtig of groenachtig gekleurd. Maar er komen inderdaad ook veel intensiever gekleurde rassen voor. Nu heeft de isoleeringstechniek van WINOGRADSKY met stukken filtreerpapier op kiezelzuurplaten er toe geleid, dat hij juist de sterkst gekleurde vertegenwoordigers het gemakkelijkst kon herkennen en isoleeren, zoodat hij onbewust een schifting naar de kleur heeft uitgevoerd. Werkt men echter zonder een dergelijke voorkeur, en isoleert men de cellulosesplitsers op celluloseagar, zich daarbij naar het optreden van oplossingsvelden richtend, dan merkt men op, dat de zwak gekleurde vertegenwoordigers verreweg het talrijkst zijn. De intensieve gele kleur is volgens mijn meening eerder karakteristiek voor de cytophagen dan voor de vibrionen.

De hierboven gegeven beschrijving van de cellvibrionen geldt slechts, zooals reeds gezegd is, voor de typische vertegenwoordigers. Daarnaast komen echter ook sterk afwijkende soorten voor. Zeer

algemeen zijn daaronder de zeer kortcellige typen, waarbij de cellen niet eerst bij het ouder worden, maar reeds in jeugdstadia zeer kort, soms zelfs bijna rond zijn (fig. 14 en 15). Tot dit coccenachtige type behooren o. a. zeer krachtige cellulosesplitsers; het zijn echter meestal uitgesproken omnivore soorten. Het meest vindt men ze in opeenhoopingen van organische stof: mest, compost, molm, enz. Al deze korte vormen komen, wat hun dikte betreft, overeen met het grovere type onder de lange vibrionen, waarmee zij door alle overgangen verbonden zijn. De kleine, fijne soorten, waarover al gesproken is, staan daarentegen tot op zekere hoogte apart.

Een andere groep van de norm afwijkende soorten vormen de bijna of zelfs geheel rechte, betrekkelijk langcellige stammen, die bovendien soms niet zuiver lophotrich geplaatste zweepdraden hebben, maar talrijke, op willekeurige plaatsen van het lichaam ingeplante ciliën vertoonen, juist zooals dat reeds door KALNINS (80) beschreven en afgebeeld is. Deze soorten, die overigens veel minder talrijk zijn, behooren tot de minder krachtige cellulosesplitsers. Zij komen in vrijwel alle grondsoorten voor naast de typische cellvibrionen. Ook zij zijn wat hun grootte aangaat steeds vergelijkbaar met de grovere cellvibrionen.

Hoe groot de verschillen tusschen de afzonderlijke vertegenwoordigers van de geheele groep der cellvibrionen ook mogen zijn, ik geloof toch niet, dat een verdeeling der groep in kleinere eenheden en tenslotte in soorten en stammen gemakkelijk vol te houden is. Daarvoor zijn de overgangsvormen te talrijk. Een gedetailleerde indeeling zou slechts mogelijk zijn, wanneer men zijn toevlucht neemt tot verscheidene niet-constante en niet-principieele kenmerken, zooals die, welke KELLERMAN gebruikt heeft, toen hij reeds in 1912 (84) tot classificatie en naamgeving van de cellulose aantastende bacteriën overging. Hoogstens zou ik de volgende vier groepen willen onderscheiden:

I. Relatief groot-cellige vormen (celdikte van $\pm$ 1 μ), die weer gesplitst kunnen worden in:

a. typische vibrionen, in jonge cultures minstens 3 $\times$ zoo lang als dik,

b. zeer korte, soms bijna coccenvormige soorten, overigens echter geheel analoog aan *a*;

c. niet of nauwelijks zichtbaar gekromde vormen, soms met peritrich geplaatste zweepdraden, die als een overgangsvorm naar de *Bacteriaceae* of naar *Proactinomyces* te beschouwen zijn.

II. Zeer klein-cellige vormen (celdikte van $\pm \frac{1}{2}$ μ).

De hoofdgroepen I en II zijn betrekkelijk scherp begrensd, de onderverdeeling in *a*, *b* en *c* moet echter uitsluitend als een aanduiding van uitersten worden beschouwd.

Voedingsphysiologische kenmerken.

In physiologisch opzicht zijn de cellvibrionen in de eerste plaats door de cellulosesplitsing gekarakteriseerd. De cellulose is voor hen zoowel energie- als koolstofbron, daar de meesten van hen normaal groeien op substraten met zuivere cellulose als eenige voedingsstof. En toch komt deze eigenschap bij hen in zeer verschillende mate tot uiting. Naast energieke cellulosesplitsers vindt men ook soorten, die nauwelijks als zoodanig kunnen worden beschouwd en zich normaal slechts ten koste van andere stoffen ontwikkelen. Reeds de grootte der oplossingsvelden op celluloseagar geeft aanwijzingen omtrent de sterkte der splitsing (zie fig. 5, 6 en 7).

Kwantitatief is de cellulosesplitsing door de cellvibrionen tot nu toe eigenlijk alleen door KALNINS (80) uitvoerig onderzocht. Hij heeft deze bepaling ook uitgestrekt tot verschillende voedingsoplossingen en reacties van het substraat. Het vraagstuk is door hem dus reeds vrij breed aangepakt en toch kunnen zijn resultaten niet als algemeen geldig worden opgevat, want ten eerste werkte hij slechts met de uitgesproken omnivore vertegenwoordigers en bovendien paste hij slechts één methode toe, terwijl men met andere methoden tot geheel andere uitkomsten kan geraken. Bovendien is de door hem toegepaste methode volgens mijn ondervinding al zeer ongelukkig gekozen. Hij entte n.l. kolven met voedingsoplossing, waarin gevouwen stukken vloeipapier gedaan waren, met reine cultures van de organismen in kwestie en bepaalde na een incubatietijd van 14 dagen, na filtreeren en drogen, het gewicht van het papier. Deze werkwijze geeft niet de maximale aantasting. Ik maakte gebruik van de in het hoofdstuk over de methodiek nader aangegeven werkwijze met de papierreepjes op schuin gestolde agar in reageerbuizen, waarmede ik steeds voortreffelijke resultaten verkreeg.

De hoogste ontledingscijfers, die ik bij cellvibrionen op deze manier kon verkrijgen, bedroegen 50 tot 60 % van het oorspronkelijk aanwezige papier. Daarnaast vond ik echter ook veel stammen, die maar enkele procenten tot oplossing konden brengen. In tabel I zijn eenige representatieve *Cellvibrio*-stammen vereenigd, die allen op dezelfde wijze onderzocht werden op de gewone agar met 5 % compostextract. De incubatietijd bedroeg ca. een maand, wat evenwel voor de cellvibrionen niet eens noodzakelijk is, aangezien zij — in tegenstelling tot de cytophagen — zeer snel groeien en zich binnen de eerste 14 dagen snel ontwikkelen en ook snel de cellulose aantasten, daarna echter even snel iedere verdere activiteit verliezen.

Tabel I.

Percentages van afgebroken cellulose bij enkele *Cellvibrio*-stammen.

Stam No.	IV_{1a}	IV_{11}	IV_{12}	$IV_{N.O.P.\ 1}$	IV_8	IV_{8L}	I_5	Contrôle niet geënt
Afgebroken cellulose in gew. %	58	6	52	46	23	36	54	1.5

De in deze tabel bijeengebrachte stammen zijn representatief voor bepaalde typen: IV_{1a}, IV_{12}, $IV_{N.O.P.\ 1}$ en I_5 vertegenwoordigen de morphologisch normale vibrionen, terwijl IV_8 een uiterst kortcellige cocvormige soort, IV_{8L} daarentegen een langcellige, maar bijna rechte, bacterieachtige soort weergeeft. IV_{12} tast behalve cellulose ook agar aan en is vermoedelijk identiek met *Microspira agarliquefaciens* GRAY en CHALMERS (51). $IV_{N.O.P.\ 1}$ is een vertegenwoordiger der semi-anaërophiele soorten, die ook bij sterk gereduceerde zuurstofspanning voortreffelijk groeien, terwijl I_5 tenslotte een soort voorstelt, die zich alleen in symbiose met begeleidende organismen ontwikkelt; in dit geval was dan ook aan de voedingsbodem een extract van de begeleidende bacterie toegevoegd (zie Hoofdstuk V).

De hierboven weergegeven getallen zijn gemiddelde waarden van vaak herhaalde bepalingen. De mate van celluloseaantasting is dus een specifieke, constante eigenschap voor elken stam afzonderlijk, doch slechts zoolang de voedingsbodem precies dezelfde samenstelling heeft en zoolang men met geheel zuivere cultures werkt, want meng-cultures of ruwe cultures geven meestal hoogere uitkomsten voor de cellulosesplitsing, ook wanneer er slechts één cellulose aantastende soort in voorkomt. Hierop zal in het laatste hoofdstuk nader worden ingegaan.

Voegt men oplosbare voedingsstoffen in grootere hoeveelheden toe, dan verkrijgt men geheel andere resultaten. De eerste twee rijen van tabel II bevatten eenige getallen voor glucose- en peptonhoudende voedingsbodems. Laat men daarentegen als tegenovergestelde uiterste ook de geringe, in het compostextract aanwezige, hoeveelheden op-losbare stoffen weg, zoodat de cellulose nu werkelijk als eenige energie-bron dienst doet, dan dalen alle uitkomsten voor de cellulosesplitsing aanzienlijk, terwijl eenige stammen dan in het geheel niet meer willen groeien (Zie de derde rij in tabel II).

Tabel II.

Percentages van afgebroken cellulose bij enkele *Cellvibrio*-stammen bij toevoeging van glucose of pepton en in agar zonder grondextract.

Stam No.	IV_{1a}	IV_{11}	IV_{12}	$IV_{N.O.P.\ 1}$	IV_8	IV_{8L}	Contrôle niet geënt
0.25 % glucose	2,0	1,5	2,5	33	34	6	1,5
0,25 % pepton	2,5	2,0	2,0	36	43	15	2,0
„synthetische" gewasschen agar-voedingsbodem	36	1,5	37	22	13	7	1,5

Daarbij moet echter dadelijk worden opgemerkt, dat de stammen IV_{1a}, IV_{11} en IV_{12} op glucose en op pepton in het geheel niet groeiden, terwijl $IV_{N.O.P.\ 1}$, IV_8 en IV_{8L} zich integendeel door deze stoffen juist krachtiger ontwikkelen, maar dan de cellulose vaak óf niet, óf slechts in verzwakte mate aantasten. Dit verschil is naar mijn meening het belangrijkste punt van uitgang, om de physiologische activiteit en de beteekenis der cellvibrionen als cellulosesplitsers te kunnen beoordeelen. Daarop moet ook hun indeeling in physiologische groepen berusten.

Dit vraagstuk is reeds vaak opgeworpen. In de litteratuur vindt men hierover vele mededeelingen, die met elkander in strijd zijn. Naast de publicaties van WINOGRADSKY (216), DUBOS (43, 44), STAPP en BORTELS (174) en anderen, volgens welke de cellvibrionen nauw gespecialiseerd en volkomen op cellulose aangewezen zijn, heeft men de tegenovergestelde meening van KELLERMAN (84), KALNINS (80) en anderen, die er omnivore organismen in zien, die vaak de cellulose pas aantasten wanneer oplosbare voedingsstoffen ontbreken. Deze tegenstrijdigheid is ongetwijfeld zóó te verklaren, dat elk der genoemde onderzoekers altijd maar met één van beide groepen werkte. Brengt men evenwel voldoende afwisseling in de isoleeringstechniek, zoodat men zeer veel verschillende cellvibrionen in zuivere cultuur verkrijgt, dan merkt men spoedig op, dat zich daaronder zoowel vormen bevinden, die zich sterk op cellulose specialiseeren als ook volkomen omnivore, met alle overgangen daar tusschen.

Ik heb ook een vrij duidelijke correlatie kunnen vinden tusschen de morphologische eigenschappen en de physiologische activiteit der cellvibrionen: de meer of minder specifieke cellulosesplitsers kwamen uitsluitend onder de typische vibrionen voor, terwijl de kortcellige en de rechte, bacteriënachtige vormen meestal veel minder

kieskeurig waren. Dergelijke omnivore soorten komen evenwel ook onder de echte vibrionen voor: STAPP en BORTELS (174) deelen mee, dat hun cellvibrionen behalve cellulose ook zeer goed stijfsel kunnen gebruiken. Zij zijn dus niet zoozeer op cellulose in het bijzonder, als wel in het algemeen op koolhydraten met groot moleculair gewicht aangewezen. Ik heb echter verscheidene stammen verkregen, die ook stijfsel ternauwernood aantasten en inderdaad slechts op cellulose tot normale ontwikkeling kunnen worden gebracht. Hiertoe behooren o. a. de bovengenoemde stammen IV_{1a} en IV_{11}. Daarnaast vond ik eveneens enkele stammen, die in staat waren agar min of meer aan te tasten. De in de voorafgaande tabellen voorkomende stam IV_{12} is mijn krachtigste agarsplitser. Merkwaardigerwijze is deze stam, hoewel niet uitsluitend op cellulose aangewezen, toch niet in staat zich met stijfsel te voeden, terwijl ik daarnaast stammen vond, die zich geheel en al gedroegen als die van STAPP en BORTELS, en naast cellulose ook stijfsel konden gebruiken, maar geen oplosbare suikers en ook geen agar.

Tabel III.

Overzicht van de bruikbaarheid van enkele stoffen als voeding der cellvibrionen.

Stam No.	IV_{1a}	IV_{11}	IV_{10}	IV_{12}	$IV_{N.O.P.\ 1}$	IV_8	IV_{8L}	I_5
Cellulose	++++	+	++++	++++	+++	++	+++	++++ [1]
Agar-agar	–	++	–	+++	+	–	–	–
Stijfsel	+	–	+++	–	++	+++	++	–
Glucose	–	–	+	+	+++	++++	++++	+
Pepton	–	–	+	+	–	+++	+	–

Alle min of meer specifieke cellulosesplitsers worden door oplosbare koolhydraten en organische stikstofverbindingen sterk in hun ontwikkeling geremd. Een gehalte van slechts 0,25 % druivensuiker is, zooals hierboven reeds vermeld werd, soms al voldoende om iederen groei onmogelijk te maken, maar de remmende invloed der oplosbare organische verbindingen is bij deze organismen toch niet zeer geprononceerd, in elk geval niet zóó sprekend, als bij de verderop te noemen cytophagen, maar toch groot genoeg om als een specifieke eigenschap te gelden. In tabel IV is de invloed van glucose en van pepton, toegevoegd aan de celluloseagar, op de stammen IV_{1a} en IV_{10} vermeld.

[1]) Alleen in symbiose met andere organismen.

Tabel IV.

De ontwikkeling der stammen IV_{1a} en IV_{10} op celluloseagar met stijgend gehalte aan glucose resp. pepton.

Concentratie glucose	0 %	0,01 %	0,05 %	0,1 %	0,25 %	0,5 %	1 %
IV_{1a}	++++	++++	+++	++	+	–	–
IV_{10}	++++	++++	++++	++	++	+	–
Concentratie pepton	0 %	0,01 %	0,05 %		0,25 %	0,5 %	
IV_{1a}	++++	++++	++		–	–	
IV_{10}	++++	++++	+++		+	–	

IV_{1a} is dus aanmerkelijk gevoeliger dan IV_{10}.

Een sterkere schadelijke werking van oplosbare organische verbindingen komt zelden voor. Zelfs de echte autotrophen kunnen meestal nog vrij hooge concentraties verdragen, zooals o. a. door het onderzoek van KINGMA BOLTJES [1]) over de nitrificeerende organismen duidelijk aangetoond is. Ook de prototypen der specifieke cellulosesplitsers, de cytophagen, groeien nog bij 0,1 % glucose. Ongeveer dezelfde resultaten als met glucose verkreeg ik ook met manniet.

Geen der overige physiologische eigenschappen der cellvibrionen heb ik zoo uitvoerig onderzocht als de cellulosesplitsing. Slechts die eigenschappen, welke bij de cellulosesplitsing van beteekenis zijn, of die, welke hun bestaansmogelijkheid in den grond bepalen, zijn voor het onderhavige onderzoek van belang, en slechts deze werden door mij onderzocht.

In de eerste plaats eenige woorden over de *stikstofvoeding*. De echte specifieke cellulosesplitsers bleken niet in staat te zijn organische stikstofverbindingen te verwerken. Hoogere concentraties (0,25 %) van pepton of asparagine hadden zelfs een remmende werking. Alleen ureum kon door hen gebruikt worden en werd ook in veel hoogere concentraties verdragen (tot 0.5 %). De beste stikstofbronnen voor hen zijn nitraten en ammoniumzouten, welke laatste evenwel op den duur een merkbare daling van de pH-waarden in het voedingssubstraat veroorzaken, zoodat de ontwikkeling bij gebruik van ammoniumzouten veel eerder tot stilstand komt dan in nitraathoudende media. In zoo-

[1]) T. Y. KINGMA BOLTJES; „Onderzoekingen over nitrificeerende bacteriën" (Dissert.), Delft, 1934.

verre kan ik mij dus geheel aansluiten bij de door STAPP en BORTELS (174) voor hun beide vertegenwoordigers van de cellvibrionen gevonden gegevens. Daarnaast heb ik echter talrijke omnivore soorten ook op pepton en asparagine, ja zelfs op albumine of caseïne als eenige stikstofbron tot weelderige ontwikkeling kunnen brengen, zonder dat de cellulosesplitsing merkbaar in het gedrang kwam. Ja, enkele stammen verlangen zelfs organische stikstofbronnen en ontwikkelen zich met nitraten of ammoniumverbindingen slechts gebrekkig. KALNINS (80) heeft dergelijke soorten ook reeds opgemerkt. In tabel V zijn de gegevens over den invloed van verschillende stikstofbronnen op de ontwikkeling en op de cellulosesplitsing van eenige stammen bijeen gebracht. Deze getallen hebben betrekking op gewasschen agarvoedingsbodems zonder compostextract.

Tabel V.

De ontwikkeling en de percentages der afgebroken cellulose van enkele *Cellvibrio*-stammen bij verschillende stikstof-voeding.

Stam No.	$NaNO_3$		$(NH_4)_2SO_4$		Ureum		Pepton		Albumine	
	Ontwikk.	afgebr. cell. %	Ontwikk.	afgebr. cell. %	Ontwikk.	afgebr. cell. %	Ontwikk.	afgebr. cell. %	Ontwikk.	afgebr. cell. %
IV_{1a}	++++	36	++++	22	+++	17	–	1.5	–	2.0
IV_{1b}	++++	37	++++	27	++++	33	+	1.5	–	1.5
IV_4	++	13	+	7	++++	42	++++	41	++	37

(In ongeënte contrôlebuizen verloor het papier ca. 1,5 % aan gewicht). De stikstofgift bedroeg overal 0,01 gew. %, berekend als N. Deze getallen demonstreeren weer duidelijk de groote verschillen, die tusschen de extreme vormen bij de cellvibrionen voorkomen.

Een andere, zeer belangrijke vraag is die van de *zuurstofbehoefte*. De gegevens hierover in de litteratuur zijn vaak tegenstrijdig. DUBOS (44) en WINOGRADSKY (216) zien in de cellvibrionen wel echte aërophiele organismen, maar zij zijn toch van meening, dat zij, in tegenstelling tot de cytophagen, aan den luchttoevoer geen bijzonder hooge eischen stellen, en het in ieder geval ook met een eenigszins verlaagde zuurstofspanning kunnen doen. IMŠENECKY en SOLNTZEWA (62) daarentegen willen juist in de cellvibrionen sterk aërophiele organismen zien, terwijl zij de cytophagen ook nog op den bodem van hoog gevulde reageerbuizen tot ontwikkeling konden brengen. STAPP en BORTELS (174) laten zich over de zuurstofbehoefte der cellvibrionen niet uit.

Mij is het bij de cellulosesplitsers in het geheel niet gelukt, bijzonder aërophiele soorten aan te toonen. De cellvibrionen, als groep beschouwd, bleken hierin zeer geringe eischen te stellen. Enkele soorten groeien weliswaar niet bij een tot op de helft teruggebrachte zuurstofspanning, maar wel kunnen zij allen tot 2—3 cm diep in de agar groeien, en ontwikkelen zich ook in ondiepe lagen voedingsvloeistof zonder speciale aëratiemaatregelen zeer goed. Vele — en daaronder zeer actieve vertegenwoordigers — zijn micro-aërophiel, daar zij bij zeer lage zuurstofspanningen (20 mm kwik) toch nog goed groeien. Hierdoor wordt het ook begrijpelijk, hoe er in anaërobe cellulosegistingen zoo vaak o. a. ook cellvibrionen voorkomen, zelfs als reeds herhaaldelijk overgeënt is. In zwarte en naar H_2S riekende modder in slooten en andere wateren heb ik ook steeds dergelijke meso-aërophiele soorten kunnen aantreffen, zelfs op een diepte van 15 tot 20 cm onder de modderoppervlakte. Het in de tabellen I en II opgenomen organisme $IV_{N.O.P.1}$ is een typische vertegenwoordiger van zulke soorten. Het is uit den bodem van het IJselmeer bij Blokzijl geïsoleerd.

Het bovenstaande moet echter zoo opgevat worden, dat, al kunnen sommige cellvibrionen ook met weinig zuurstof volstaan, hun optimale groei toch pas bij een volledige zuurstofspanning plaats heeft. In principe zijn alle cellvibrionen dus aërophiele organismen. In tabel VI zijn de ontwikkeling en de cellulosesplitsing van den typischen micro-aërophielen stam $IV_{N.O.P.1}$ bij verschillende zuurstofspanningen weergegeven. Alle getallen hebben betrekking op bepalingen na een incubatietijd van 10 dagen op den gewonen agarvoedingsbodem met compostextract.

Tabel VI.

De ontwikkeling van stam $IV_{N.O.P.1}$ en de percentages der daarbij afgebroken cellulose.

Zuurstofspanning in mm kwik	Volle spanning (± 150 mm)	75 mm	25 mm	10 mm	5 mm	2 mm
Ontwikkeling	++++	++++	+++	+	+	–
Afgebroken cellulose in %	46	26	7	2	1.5	1.5

(In ongeënte contrôlebuizen verloor het papier ± 1.5 % van zijn oorspronkelijk gewicht).

Ook was het van belang, de voor den groei en de activiteit gunstigste *reactie* vast te stellen. KALNINS (80) is de eenige, die nader op deze vraag ingaat. Maar aangezien hij uitsluitend met de weinig specifieke

soorten gewerkt heeft, was het gewenscht, de typische specifieke soorten daarop te onderzoeken. De ontwikkeling der organismen werd hierbij op de gewone celluloseagar met compostextract bepaald, terwijl de oplossing van het papier met behulp van de gebruikelijke methode vastgesteld werd, echter zonder gebruik van mestextract. De reactie van de agar werd door gebruik van KH_2PO_4 of K_2HPO_4 en door toevoeging van NaOH, resp. H_2SO_4, op de gewenschte pH gebracht. Alle onderzochte stammen groeiden het best bij een pH van 7 tot 8. Tot een pH van 6,0 naar den zuren, en van 8,5 naar den alkalischen kant kon gewoonlijk nog wel, hoewel zwakke, groei worden aangetoond, hoogere of lagere zuurgraden maakten echter elken groei onmogelijk. (Zie tabel VII).

Tabel VII.

Percentages afgebroken cellulose van enkele stammen bij verschillende pH.

	Begin-pH van de voedingsagar						
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
IV_{16}	1,5	1,5	16	36	58	53	7
IV_{12}	1,5	3,5	19	43	52	17	1,5
$IV_{N.O.P.\ 3}$	1,5	1,5	3,5	12	32	34	16

Als belangrijkste resultaat van dit onderzoek kan genoemd worden, dat de bij de omnivore cellvibrionen verkregen uitkomsten van KALNINS (80) ook voor de specifieke soorten geldig bleken te zijn, dus dat de geheele groote en overigens zeer heterogene groep der cellvibrionen zich ten opzichte van de reactie zeer uniform gedraagt. Wel moet er meteen de nadruk op gelegd worden, dat mijn isoleeringen meestal bij een pH van 7,5 werden uitgevoerd, waardoor eventueel voorkomende acidophiele resp. alcalophiele soorten buiten beschouwing zijn gebleven. Toch houd ik het niet voor waarschijnlijk, dat er zulke soorten bestaan of dat zij een groote rol spelen, want anders zouden zij in zure, humeuze gronden op den voorgrond treden, en daar komen cellvibrionen in 't geheel niet voor.

De voor deze proeven gebruikte voedingsbodem was zeer zwak gebufferd, zoodat de begin-pH soms zeer spoedig veranderde, namelijk bij gebruik van nitraat steeg en bij gebruik van ammoniumsulfaat daalde. STAPP en BORTELS (174), die een voedingsbodem gebruikten van ongeveer dezelfde samenstelling als de mijne, hechten zeer veel gewicht aan dit feit. Zij verkregen bij het gebruik van ammoniumsulfaat als stikstofbron nauwelijks eenige ontwikkeling, daar deze geringe groei

reeds voldoende was om de pH van 7,1 tot 6,3 te doen dalen, zoodat elke verdere ontwikkeling onmogelijk werd. In beginsel kan ik mij bij hun opvattingen aansluiten, maar zóó scherp als zij het weergeven, heb ik het nooit kunnen waarnemen. Steeds verkreeg ik ook op ammoniumsulfaathoudende voedingsbodems een goede ontwikkeling en de pH daalde daarbij pas langzamerhand tot de laagste waarde van ca. 6,0. Vermoedelijk bezit mijn voedingsbodem toch een sterkere buffering dan de hunne.

Verder is ook het vraagstuk van de vorming van zuren uit de cellulose van beteekenis. STAPP en BORTELS (174) hebben een dergelijke zuurvorming bij hun stammen niet kunnen vaststellen. KALNINS (80) daarentegen gelooft een zekere, zij het ook slechts zwakke, zuurproductie bij de meeste van zijn organismen te hebben kunnen waarnemen. Ik controleerde deze kwestie op mijn gebruikelijke agarvoedingsbodem, waarin evenwel de stikstof in den vorm van ammoniumnitraat was toegediend, waardoor ik zooveel mogelijk de storende vorming van H_2SO_4 of NaOH onderving. De meeste onderzochte stammen verminderden daarbij de pH eenigszins, maar zelden tot waarden lager dan 6,0. De krachtigste zuurvorming vond ik bij de omnivore, coccenachtige stammen, terwijl de typische, op cellulose gespecialiseerde vibrionen ternauwernood eenige verzuring veroorzaakten en nooit pH-waarden lager dan 6,5 vertoonden. Welke afbraakproducten zij dan wel uit de cellulose doen ontstaan, blijft nog steeds een open vraag, want vaste slijmachtige stoffen worden door hen ook al haast niet gevormd, zoodat zij maar weinig vaste stof opbouwen en de cellulose dus vrijwel geheel tot oplosbare producten afbreken.

Ik heb geen pogingen gedaan om zuurvorming uit andere koolhydraten dan cellulose aan te toonen. De publicatie van KALNINS (80) bevat hierover echter talrijke mededeelingen.

Een nauwkeurige bepaling van de *temperatuursgrenzen* der cellvibrionen werd door mij niet uitgevoerd, en alle bovengenoemde kwantitatieve opgaven hebben betrekking op een temperatuur van 28—30° C, waarbij ook alle isoleeringen geschiedden. Daarom moet men met de mogelijkheid rekening houden, dat zich bij andere temperaturen heel andere stammen als de krachtigste cellulosesplitsers kunnen opwerpen. Alleen heb ik de ontwikkeling van vrijwel alle stammen, behalve bij de gebruikelijke temperatuur van 28—30° C, ook bij ± 15° C onderzocht, aangezien een temperatuur van 28—30° C in de natuur in ons klimaat slechts bij wijze van uitzondering voorkomt. Zonder uitzondering groeiden al mijn stammen ook bij 15° C goed — hoewel langzamer dan bij 28—30°. Uitgesproken thermophiele

organismen komen daaronder dus niet voor, wat overigens volstrekt niet bewijst dat er geen thermophiele cellvibrionen bestaan. Mijn resultaten komen goed overeen met de bevindingen van WINOGRADSKY, DUBOS, KALNINS en STAPP en BORTELS.

Evenmin als de temperatuureischen werd de *resistentie tegen indrogen* nauwkeurig door mij onderzocht. Alleen toevallig kon ik herhaaldelijk vaststellen, dat op papier geheel ingedroogde cultures nog wekenlang kiemkrachtig bleven. Hoewel de meeste cellvibrionen dus een luchtdrogen toestand uitstekend verdragen, zijn ze niet in grooten getale aanwezig in het zwevende stof in de lucht, want nog nooit is het mij gelukt om op openstaande celluloseagarplaten cellvibrionen door luchtinfectie te verkrijgen. Het zijn altijd alleen schimmels en actinomyceten en bij uitzondering bacillen, welke men op die manier vangen kan, maar nooit vibrionen, cytophagen of myxobacteriën.

Tenslotte zij hier nog gewezen op een volgens mij zeer belangrijk punt, namelijk op de behoefte van de meeste cellvibrionen aan verschillende „groeistoffen" en „sporen-elementen". Deze eigenschap, die ook onder de overige groepen van cellulosesplitsers vaak voorkomt, zal in het laatste hoofdstuk nader besproken worden.

b. Sporenvormers (bacillen).

Deze organismen zijn onder de cellulosesplitsers van minder beteekenis dan de vibrionen en de myxobacteriën; zij zijn in den normalen bodem tenminste minder talrijk. Langen tijd waren zij zelfs totaal onbekend en pas KELLERMAN c.s. (84, 85, 86) hebben een grooten, typischen *Bacillus* beschreven naast de vele kleine bacteriën. Maar ook later vindt men mededeelingen over sporenvormers slechts sporadisch: KALNINS (80) en HOROWITZ-WLASSOWA (60) hebben ieder een dergelijke soort gevonden, maar kenden hun geen groote beteekenis toe, terwijl verschillende onderzoekers, zooals WINOGRADSKY (216), IMŠENECKY en SOLNTZEWA (62), STAPP en BORTELS (174) DUBOS (43) en anderen, nooit sporenvormers hebben gevonden. WINOGRADSKY legt er zelfs den nadruk op, dat hij in normalen grond in het geheel geen bacillen kon vinden. Zij behooren volgens zijn opvatting niet tot de autochthone microflora van den bodem. Alleen MEYER (118) en nog meer SIMOLA (168) staan op een ander standpunt, daar zij verschillende cellulose splitsende aërobe bacillen gevonden hebben, waaronder mesophiele en thermophiele vormen voorkomen. SIMOLA vond zelfs niet anders dan bacillen, waarvan hij eenige soorten uitvoerig beschreef. Hij kent hen een zeer voorname beteekenis bij de cellulosesplitsing toe. Ik heb ze in bijna alle grondsoorten aangetroffen, zoowel

in goed geluchte als ook in met water verzadigde op den bodem van zoet en brak water, echter steeds in geringer aantal dan de vibrionen of de myxobacteriën.

Morphologische eigenschappen.

Onder de cellulose splitsende bacillen komen verschillende typen voor, die zoo sterk van elkaar afwijken, dat het niet mogelijk is, ze allen samen te beschrijven. Daarom heb ik een poging gewaagd een voorloopige indeeling in groepen op te stellen. Gemakkelijk was het niet, omdat er steeds veel overgangsvormen aangetroffen worden. Toch kan men drie typen vrij duidelijk herkennen.

Het eerste en meest voorkomende type — dat ik voortaan kortheidshalve als „Clostridium-type" zal aanduiden — omvat alle groote, rechte soorten met lange cellen en relatief kleine langwerpige sporen, die zich eindstandig tot onregelmatig excentrisch in de cellen vormen, waarbij deze soms duidelijk opzwellen. Deze vormen hebben de neiging om, bij het ouder worden, onder gunstige omstandigheden spoelvormig tot citroenvormig op te zwellen, dus den clostridiumvorm aan te nemen (fig. 16 en 17). Sommige soorten nemen ook plectridiumachtige vormen aan. Meestal zijn de cellen van deze organismen niet heel lang in vergelijking met hun dikte, in elk geval niet in de rijpere periode, gedurende de sporulatie; alleen in jonge cultures komen bij overvloedige voeding soms veel langere elementen voor, zelfs tot zeer lange, gekromde draden toe (zie fig. 18 en 19).

Tot het tweede type behooren de slanke, lange en soms duidelijk gekromde vormen met ovale — soms bijna ronde — eindstandige sporen. Deze sporenvormers blijven altijd lang, ook in den tijd der rijping van de sporen (zie fig. 20). Ik duid ze in het vervolg aan als het „lange type".

Tot het derde type reken ik tenslotte de soorten met min of meer lange, soms zelfs buitengewoon lange, en in enkele gevallen min of meer duidelijk ingesnoerde en gekromde sporen. In jonge cultures zijn ook deze soorten zeer lang en slank en soms iets gebogen. Ten tijde van de sporenvorming worden de cellen korter en dikker, evenwel zonder clostridiumachtig op te zwellen en vormen dan lange sporen, die zeer groot zijn in vergelijking met de cel waarin zij ontstaan (vaak meer dan de helft der cellengte). Het „lange sporen-type" zullen deze soorten verder genoemd worden (fig. 21).

Deze typen zijn ook in hun wijze van groeien verschillend: het „clostridium"-type splijt de agar en vormt daarin lensvormige koloniën, die vaak meer of minder gecompliceerde conglomeraten van uit één centrum uitstralende lenzen vormen en bij oppervlakkige beschouwing

een sterachtigen indruk maken (fig. 22 en 23). Op het oppervlak van de agar en ook tusschen agar en glas verspreiden deze organismen zich betrekkelijk langzaam als een duidelijk zichtbare, dikke, slijmrijke laag met een verdikten rand. De cellulose wordt door hen duidelijk zichtbaar binnen een betrekkelijk scherp begrensde zone om de koloniën heen gesplitst (fig. 24). De beide andere typen daarentegen groeien verspreid in de agar, splijten deze daarom ook niet, maar vormen min of meer spherische, wolkachtige koloniën, die soms een oneffen oppervlakte vertoonen en er dus bloemkool- of druiventrosachtig uitzien (fig 25 en 26). Op en onder de agar verspreiden zij zich meestal zeer snel en ver, maar vormen daarbij slechts zeer dunne vliesjes, die vaak ternauwernood zichtbaar zijn. De cellulose wordt vaak slechts gedeeltelijk opgelost, zoodat zeer groote, onregelmatige oplossingsvelden met onscherpe randen ontstaan, die ook in het midden niet geheel helder zijn (fig. 27 en 28).

Dezelfde drie typen kan men ook onder de anaërophiele soorten vinden, alleen is de zaak daar nog iets gecompliceerder door het voorkomen van dikke vormen met lange sporen, die toch niet clostridiumachtig opzwellen. De typische organismen van OMELIANSKI (123, 124, 125), die hij met trommelstokken vergelijkt, zijn karakteristieke vertegenwoordigers van het „lange" type, terwijl de door KHOUVINE (88, 89) en MEYER (118) geïsoleerde soorten kortere vertegenwoordigers van hetzelfde type zijn, of tot het „clostridium"type behooren. Het „lange sporentype" is onder de obligaat-anaërobe soorten nog onbekend.

Bij een nauwkeurige beschrijving der sporenvormers moet men steeds rekening houden met den tamelijk ingewikkelden levenscyclus van deze organismen, want de jonge cellen zijn heel anders gevormd dan de oudere, waarin de vorming van endosporen begint. Bovendien is wel nauwelijks één bacteriegroep zoo variabel ten gevolge van invloeden van buitenaf als de bacillen. Dezelfde soort kan er op verschillende voedingssubstraten zóó verschillend uitzien, dat men ze ternauwernood als dezelfde soort herkent. Daarom zijn in de onderstaande beschrijving alleen de op de gewone celluloseagar (met of zonder toevoeging van compostdecoct) groeiende vormen opgenomen, behalve in sommige afzonderlijk vermelde gevallen.

Bij de beschrijving van de cellvibrionen werd er reeds op gewezen, dat een nauwkeurige opgave van de grootte weinig zin heeft, daar ze zeer weinig constant is. Voor de bacillen geldt dit in nog sterkere mate. Zij vertoonen niet alleen zeer verschillende afmetingen al naar de levensomstandigheden, maar ook in één en dezelfde cultuur vindt men zeer sterk uiteenloopende grootten en vormen door elkaar. Verder valt het ook op, dat bij de meeste cellulose splitsende bacillen steeds

twee afmetingen naast elkander in dezelfde cultures optreden: groote en voornamelijk vrij dikke staafjes, en veel kortere en fijnere (fig. 29 en 30). Tusschenvormen komen wel voor, maar zijn toch zeldzaam. De aanwezigheid van twee grootten heb ik bij de meeste vertegenwoordigers der „clostridium"- en der „lange" groep kunnen constateeren, zoowel onder de aërophiele als onder de anaërobe soorten, maar niet bij de „lange sporen" groep. Ter oriënteering over het verschil in grootte zijn in tabel VIII de lengte- en breedtematen van eenige typische vertegenwoordigers weergegeven. Alle maten hebben betrekking op zeer jonge cultures, ten hoogste 36 uur oud, op de gebruikelijke celluloseagar met compostdecoct gekweekt.

Tabel VIII.

Afmetingen van normale individuen van enkele bacillen-stammen op celluloseagar.

		Clostridiumgroep			Lange groep		Lange sporen groep
		IV_n	IV_{Cl}	$IV_{R.\ IIa}$	IV_3	$IV_{R.\ III}$	IV_7
Grove staafjes (gewone vorm)	lengte	2—7	2—7	2—8	3,5—8,0	niet waargenomen	2—6
	breedte	0,5—0,8	0,5—0,7	0,7—1,0	0,5—0,8		0,5—1,0
Fijne staafjes	lengte	niet waargenomen	1,5—7	1—3	1,5—6	1,5—20	niet waargenomen
	breedte		0,3	0,3	0,2	0,3	

De vaak optredende, zeer lange draden zijn in deze tabel niet opgenomen, ze zijn veel langer dan de maximale afmetingen die hier genoemd zijn. Zooals men ziet is het verschil heel duidelijk, vooral in de breedte, wanneer men de enkele tusschenvormen buiten beschouwing laat, wat in deze tabel ook gebeurd is.

Aanvankelijk kon ik er niet toe besluiten om de beide klassen van afmetingen als bij elkaar behoorend op te vatten, maar dacht aan een infectie van de bacillencultures met kleine bacteriën of vibrionen. Zeer spoedig merkte ik echter op, dat ook in zeer streng gepasteuriseerde cultures (tot 10 min. bij 100° C) toch weer deze twee vormen tegelijk en naast elkander optraden, en dat zij ook beiden sporen vormden en zich ook verder geheel op gelijke wijze gedroegen. De gedachte aan een infectie van buitenaf moest dus opgegeven worden, maar ik meende toen met een mengcultuur van twee verwante stammen te maken te hebben. Ook dit bleek onjuist te zijn, aangezien ook de, volgens de

methode van BURRI verkregen, één-cel-cultures van twee stammen, die dit verschijnsel zeer duidelijk demonstreerden (IV_{Cl} en $IV_{R.\,IIa}$), ook dan nog de beide grootte-typen opleverden. Tenslotte isoleerde ik onlangs een stam uit de „lange"-groep, die alleen in de kleine vorm optrad, en toch zeer overvloedig sporen vormde ($IV_{R.\,III}$). Of men hier te doen heeft met meer of minder constante mutilaten of slechts met door invloeden van buitenaf bepaalde modificaties durf ik nog niet te beslissen, maar ik hel over tot de laatste opvatting, omdat dit dualisme niet altijd optreedt. Vaak valt een der beide groottetypen geheel weg, of komt alleen tijdelijk tot ontwikkeling en verdwijnt weer bij het ouder worden. Het best kan men de twee grootten naast elkander bestudeeren in agarcultures. Op papier in voedingsoplossingen komen zij veel minder vaak tot uiting. Bovendien treft men elke grootte in een agarpreparaat gewoonlijk min of meer gelocaliseerd aan — de kleine staafjes vaak *in* de agar en de grovere vrij rondzwemmend in het vocht. Het is niet onmogelijk, dat juist de in de agar binnengedrongen cellen in hun groei geremd zijn en kleiner blijven. In hun vorm en bouw zijn de kleine staafjes ongeveer gelijk aan de groote, tenminste in jonge cultures. In oudere worden ze meestal veel korter en zijn dan zoowel vóór als gedurende de sporenvorming vaak zichtbaar gebogen. Bij het „*Clostridium*"-type zwellen de kleine staafjes niet op. In oudere cultures zien de kleine staafjes er daarom ongeveer uit als vibrionen of kleine „zwermers". Ook wat hun grootte aangaat zijn ze aan de vibrionen gelijk en alleen de sporenvorming bewijst, dat men met geheel andere organismen te maken heeft [1]).

De zweepdraden bij de normale cellulose splitsende bacillen zijn peritrich, zooals bij de meeste bacillen (fig. 31). Alleen is het opvallend, dat eenige stammen hun beweeglijkheid reeds zeer spoedig verliezen, waarbij dan ook de meeste ciliën verdwijnen. De trommelstokachtige bacillen zijn ook in heel jonge cultures maar zwak en langzaam beweeglijk en vertoonen in overeenstemming hiermee ook slechts weinig ciliën. De „*Clostridium*"- en „lange sporen"-typen zijn evenwel op geschikte voedingsbodems in hun jeugd altijd zeer beweeglijk, hoewel de beweging gewoonlijk veel rustiger en langzamer is dan die der vibrionen.

Zooals reeds uit de indeeling der cellulose splitsende bacillen in de drie bovengenoemde groepen blijkt, hebben de meeste soorten duidelijk langwerpige, soms zelfs zeer lange sporen. Rond of bijna rond zijn de sporen alleen in de „lange" groep, dus bij de bacillen van het „trommelstok"-type. Minder uniform is de plaats der sporen in de

---

[1]) Na het voltooien dezer onderzoekingen verscheen in Centralbl. f. Bact., Par., etc., II, 1939, 101, 41 een artikel van J. C. APPELBY, die een soortgelijk verschijnsel beschrijft.

cellen. Men vindt namelijk zoo ongeveer alle mogelijkheden van absoluut eindstandige tot bijna centrale ligging vertegenwoordigd. De afbeeldingen 20 en 32 eenerzijds en 17 en 21 anderzijds geven de uitersten weer. Bij het vermelden der grootte van de endosporen moet men er steeds rekening mede houden, dat de groote en de kleine staafjes ook naar verhouding grootere en kleinere sporen vormen, waardoor de afmetingen der endosporen gewoonlijk zeer sterk uiteenloopen. In den regel vormen de endosporen zich op de schrale cellulose-voedingsbodems zeer vroeg en algemeen, terwijl men op glucose- en peptonhoudende voedingsbodems weinig sporen aantreft, daarentegen wel een overvloedigen groei met rijkelijke slijmvorming en zeer lange en groote cellen. Dit zijn trouwens zeer algemeen voorkomende en reeds lang bekende feiten, die niet alleen bij de cellulose splitsende, maar bij alle bacillen kunnen worden geconstateerd. Vele vertegenwoordigers van het „Clostridiumtype" en eenige van de „lange sporen"-groep vormen op cellulose reeds in 12 uur oude cultures talrijke sporen en 24 uur na het uitzaaien ziet men zoo goed als uitsluitend vrije sporen. De staafjes zijn dan al verdwenen. Daarentegen gaan andere soorten van dezelfde groepen en de meeste vertegenwoordigers van de „lange" groep eerst veel later tot sporulatie over, en soms ook dan nog slechts in enkele procenten van het totale aantal individuen. Op suikerhoudende voedingsbodems vormen enkele soorten in het geheel geen sporen, al laat men ze ook maandenlang staan.

Vele der door mij geïsoleerde bacillen vormen sporen, die dikker zijn dan de cellen waarin ze ontstaan, zoodat deze laatste om de sporen heen opzwellen. De afbeeldingen 32 en 37 toonen zulke stammen.

Het kiemen der sporen op versch substraat vertoont geen bijzonderheden. De vrij lange sporen loopen altijd in het midden, dwars op hun lengteas, uit. Bij de gebogen sporen vormt zich de kiembuis steeds aan de concave zijde, zoodat paddenstoelachtige vormen ontstaan.

Tot nu toe heb ik nog eenige afwijkende, pas eenigen tijd geleden geïsoleerde, soorten van sporenvormende cellulosesplitsers in het geheel niet genoemd. Het gaat om eenige onder elkaar verwante stammen, die in gewone grondsoorten naar het schijnt niet of slechts zelden voorkomen; ik heb ze daarin althans nooit gevonden. Wel heb ik ze echter vaak uit zeebodemmonsters geïsoleerd, namelijk uit de bovenste sliklagen van de diepere geulen der Waddenzee. Heel jonge cultures op celluloseagar doen zich voor als lange, min of meer duidelijk gebogen staafjes tot draden of spiralen; dus soms als echte groote spirillen. De windingen zijn soms heel vlak en lang, soms echter hoog en tegelijk lang, (fig. 33). Op dezen leeftijd zijn vele individuen schroefachtig beweeglijk op de manier der spirillen, maar de bewegingen zijn zelden

levendig. Bij het ouder worden verkorten de cellen zich spoedig; zij blijven daarbij meestal duidelijk gebogen, zoodat typische vibrionenvormen ontstaan (fig. 34 en 35). Ook in dit stadium zijn vele individuen beweeglijk, soms zelfs levendiger dan de lange jonge spirillen. Nu begint echter zeer spoedig de sporenvorming, die soms door een clostridium- of plectridiumachtig opzwellen der cellen begeleid wordt. Men krijgt zoo cultures, waarin breede, misvormde, en normale *Vibrio*-achtige cellen met en zonder sporen naast elkander voorkomen (fig. 36, 37, 38). Langzamerhand gaat vrijwel 100 % der cellen tot sporenvorming over, waarna alle andere vormen verdwijnen en slechts vrije sporen overblijven.

Deze organismen vormen dus zóó rijkelijk endosporen, die ook een lange verhitting op 100° C goed verdragen, dat het buiten twijfel is, of zij behooren tot de bacillen ondanks hun vibrio- tot spirillenachtig voorkomen. In jonge cultures, waarin lange spiralen voorkomen, is de overeenkomst het meest opvallend, ook wat hun grootte betreft: hun breedte varieert namelijk van 0.3 tot 0.6 μ, terwijl hun lengte zeer verschillend is en van 2 tot 6 μ bij de korte vibrio-vormen tot meer dan 20 μ bij de lange spiralen bedragen kan. Ten slotte vertoonen zij vaak ook dezelfde ongelijkmatige verdeeling der chromatine in de cellen met dwarsbanden, als de echte vibrionen (fig. 34). Wat betreft hun groei, kolonievorming en physiologische kenmerken zijn ze daarentegen echte bacillen. Zelfs het voorkomen van twee verschillende grootten, dus het optreden van kleine „zwermers" naast de gewone groote cellen, dat zoo karakteristiek is voor de meeste cellulose splitsende sporenvormers, kon ik bij hen waarnemen (fig. 30).

Deze organismen schijnen dus een tusschenvorm te zijn; zij zijn zoowel bacillen als ook vibrionen. In den beginne aarzelde ik langen tijd vóórdat ik deze gevolgtrekking maakte. Daar evenwel nóch de scherpste pasteuriseeringen, nóch andere maatregelen de vibrionen konden uitroeien en tenslotte ook „één-cel-cultures" steeds weer den bovengenoemden levensloop hadden en alle daarbij voorkomende vormen vertoonden, moest ik ten slotte wel het bestaan van dergelijke intermediaire organismen aannemen. Na het beëindigen van dit werk verscheen de publicatie van R. L. STARKEY [1]) over de sporenvorming en de morphologische eigenaardigheden van *Vibrio desulfuricans*; deze heeft mij in mijn opvattingen gesteund. Mijn vibrioachtige bacillen komen namelijk in vele punten overeen met de door STARKEY beschreven bijzondere vormen van *Vibrio desulfuricans*. Zoo b.v. hebben de lange gebogen vormen, zooals STARKEY ze op zijn afbeeldingen 14*a*—14*d*

[1]) STARKEY, R. L.; Archiv für Mikrobiologie, 9, 1938, p. 268.

en 15*b* weergeeft, bedrieglijk veel gelijkenis met het jeugdstadium van mijn bacillen, en in 't algemeen van vele cellulose splitsende bacillen uit de „lange" groep, terwijl de gestabiliseerde thermophiele modificatie van *V. desulfuricans*, (STARKEY's afbeeldingen 5, 6, 7, 9*b*, 11, 12, 13 en 15*a*) geheel en al overeenkomt met de oudere stadia van mijn sporenvormende vibrionen of in het algemeen met de kleine vorm (= de z.g. „zwermers") der bacillen. De duidelijk spiraalvormig gewonden vormen van mijn organismen komen tenslotte overeen met zijn fig. 3. Zoo scherpe en geprononceerde spiralen als STARKEY ze vond, heb ik echter niet kunnen waarnemen. Wel kon ik een overeenstemming constateeren tusschen de plaatsing der zweepdraden van beide organismen; in beide gevallen zijn het overgangen van echte peritriche tot monotriche ciliën, waarbij vaak veel onregelmatige rangschikkingen met de daaruit resulteerende tuimelbeweging voorkomen.

Tenslotte zij er hier nog in het kort op gewezen, dat ik onlangs toevalligerwijze een andere sporenvormende vibrio geïsoleerd heb, die morphologisch zeer veel gelijkenis met de bovengenoemde cellulose splitsende soorten vertoont, maar geen cellulose kan aantasten. Het is een organisme met zeer lage voedingseischen, dat in zuiver minerale voedingsagar, die voor het kweeken van hoogere planten bereid was, vaak als een tegen verhitting resistente infectie werd opgemerkt, zoodra er een weinig grondextract aan deze agar werd toegevoegd. Een nadere beschrijving van dit organisme moet voorloopig achterwege blijven, daar het nog niet voldoende onderzocht is.

Voedingseischen der sporenvormers.

Als cellulosesplitsers zijn de bacillen zeker minstens even actief als de vibrionen, alleen is hun vermogen om cellulose aan te tasten zeer weinig constant en wordt het in hooge mate door verscheidene factoren van buitenaf beïnvloed.

Terwijl men bij het werken met vibrionen zeer gemakkelijk te reproduceeren resultaten krijgt, zijn de percentages der cellulosesplitsing bij de bacillen altijd zeer sterk wisselend, schijnbaar geheel willekeurig, ook bij de nauwkeurigste inachtneming van constante levensomstandigheden. Eerst na langdurig experimenteeren gelukte het mij om de oorzaak van deze wisselvalligheid vast te stellen. De meeste bacillen bleken namelijk zeer gevoelig te zijn voor de bij het steriliseeren steeds in kleine hoeveelheden gevormde splitsingsproducten van de agar. De maximale temperatuur en de duur van het steriliseeren zijn daarom beslissend voor de ontwikkeling en de cellulosesplitsing door deze organismen, en zelfs onbeteekenende afwijkingen van de

norm brengen zeer sterke reacties bij de sporenvormers teweeg. Hoe voorzichtiger de agar gesteriliseerd werd, hoe beter zij zich daarop ontwikkelden. Bovendien zijn de bacillen zeer dankbaar voor een toediening van verschillende groeistoffen en groeien ze op zuiver „synthetisch" substraat steeds veel minder goed, terwijl verschillende soorten zelfs alleen in symbiose met andere organismen in staat zijn, zich met zuivere cellulose te voeden. In het laatste hoofdstuk wordt nader op dit punt ingegaan.

Onder optimale omstandigheden, dus op zeer voorzichtig gesteriliseerde agar en onder toediening van compostextract, verkreeg ik ook bij de sporenvormers met de gestandaardiseerde papierproef reproduceerbare uitkomsten. In tabel IX zijn de desbetreffende cijfers voor eenige vertegenwoordigers bijeen gebracht.

Tabel IX.

Percentages afgebroken cellulose bij enkele stammen van sporenvormers.

Stam No.	IV_n	IV_{Cl}	IV_3	IV_7	$IV_{N.O.P.7}$	I_1	Rpt.VII
Afgebroken cellulose in gew. — % van het toegediende papier	51	22	23	17	47	42	53

IV_n, IV_{Cl}, $IV_{N.O.P.7}$ en I_1 behooren tot het „clostridium"-type, IV_7 tot het „lange type", IV_3 tot het „lange-sporen"-type en Rpt. VII tot de vibrioachtige bacillen.

Zooals men ziet, komen de krachtigste splitsers voor in de „clostridium"-groep, die over het algemeen de belangrijkste is onder de aërobe cellulose splitsende bacillen, en bij de vibrioachtige sporenvormers, terwijl de „lange" en de „lange sporen"-groepen een geringere activiteit ontwikkelen. Stam I_1 is een obligate symbiont en groeit alleen in gemeenschap met bepaalde andere organismen.

Een merkwaardige eigenschap van de bacillen is verder, dat zij het papier nooit tot het laatste toe oplossen, nòch op agar, nòch in vloeibaar substraat. Terwijl de vibrionen, cytophagen, en schimmels onder gunstige omstandigheden en bij groot overschot aan voedingszouten (kleine stukjes papier) het papier vrijwel geheel verteren, gelukte het mij niet, bij de bacillen meer dan 80 % van het papier in oplosbare producten om te zetten en de meeste stammen beperkten zich tot een oplossing van slechts 50 à 60 %. Het papier verdween dan ook nooit geheel en al; er ontstonden daarin zelfs geen geheel doorzichtige gaatjes. Altijd werd het alleen maar sterk aangetast en slap gemaakt;

een geraamte van de oorspronkelijke vezels bleef evenwel altijd over. Deze onoplosbare rest bestond uit primaire fibrillen der cellulosevezels, die overigens voor het grootste deel opgelost waren. Of het hier een chemisch meer resistente fractie der cellulose betreft, of dat men te maken heeft met een, op mechanische bijzonderheden berustend, grooter weerstandsvermogen der overblijvende fibrillen, durf ik voorloopig niet te beslissen: eenerzijds toch is het, ook na zorgvuldig uitwasschen en overbrengen op versche agar niet gelukt de papierrest geheel op te lossen, maar anderzijds waren dezelfde bacillen in staat, de geprecipiteerde cellulose in de celluloseagar voor 100 % op te lossen, en georganiseerde cellulose, die in de kogelmolen zeer fijn gemalen was, werd des te beter door hen in de agar opgelost, naarmate zij fijner was. Deze twee waarnemingen zijn met elkander in tegenspraak.

Vermoedelijk moet de verklaring gezocht worden in een zwakkere werking der door de bacillen afgescheiden cellulase, wat ook in overeenstemming zou zijn met hun geringere specificiteit ten opzichte van de cellulose. Werkelijk obligate cellulosesplitsers komen immers — voor zoover bekend is — onder de sporenvormers niet voor, en alleen al het feit, dat hun ontwikkeling op cellulosevoedingsbodems meestal eerst met behulp van oplosbare koolhydraten op gang gebracht moet worden, bewijst, dat men er geen echte celluloseaantasters in kan zien. Zeer demonstratief komt deze geringere affiniteit tot de cellulose tot uiting in het geleidelijke begin der zichtbare cellulosesplitsing op celluloseagar: terwijl bij de vibrionen en cytophagen duidelijke oplossingszones rondom de entstrepen reeds ontstaan vóór een duidelijke groei te herkennen valt, gebeurt een en ander bij de bacillen juist in omgekeerde volgorde. Zij werken dus betrekkelijk langzaam op de cellulose in. Maar heeft zich eenmaal een jonge cultuur voldoende ontwikkeld en zijn alle overige voedingsstoffen uitgeput, dan kunnen soms in korten tijd zeer groote hoeveelheden cellulose opgelost worden.

De bovenstaande uiteenzetting moet in zooverre worden beperkt, dat zij wel voor de meeste soorten opgaat, maar dat eenige bijzonder actieve micro-aërophiele stammen uit de „clostridium"-groep en ook enkele der vibrioachtige stammen zeer snel de cellulose aantasten en reeds binnen de 12 uur zichtbare oplossingszones rondom de entstrepen vormen, ook wanneer de voedingsbodem daarbij veel oplosbare koolhydraten bevat, dus b.v in celluloseagar met compostdecoct. Deze soorten, waartoe o. a. de in tabel IX genoemde stam Rpt. VII behoort, blijven dus zeer zeker niet achter bij de vibrionen. Zij behooren tot de meest actieve cellulosesplitsers, die er zijn.

Bovendien vond ik ook enkele stammen, die geen hooge concentraties

aan oplosbare organische verbindingen verdroegen en het weelderigst groeiden op onoplosbare stoffen, zooals b.v. op cellulose of op amylum. Toch blijven dat uitzonderingen. In tabel X is de ontwikkeling van eenige stammen op celluloseagar met stijgend glucosegehalte en op eenige suikerhoudende voedingsbodems weergegeven. In deze tabel zijn met opzet zoowel uitgesproken omnivore als ook min of meer op onoplosbare stoffen aangewezen stammen bijeengebracht.

Tabel X.

Ontwikkeling van enkele sporenvormende stammen op suikerhoudende voedingsbodems.

	Celluloseagar						Glucose-agar	Amylum-agar	Voedingsbodem voor *B. radicicola*
	Zonder glucose	Met glucose							
		0.05 %	0.1 %	0.25 %	1 %	3 %			
IV_7	+++	+++	++	++	+	–	+	++	+
IV_3	++	++	+	+	–	–	+	++	–
$IV_{R.\ IIa}$	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
IV_n	+++	+++	+++	++++	+++	++	++++	++++	+++

Alle hierbij gebruikte voedingsbodems bevatten compostextract. De glucose- en de amylumagar zijn van dezelfde samenstelling als de celluloseagar, alleen is de cellulose vervangen door 0.25 % glucose subs. amylum. De voedingsbodem voor *B. radicicola* bevat behalve de gebruikelijke zouten 1½ % manniet en 10 vol. % gistextract.

Zooals men ziet werken hooge glucosegehalten (meer dan 1 %) altijd remmend op de ontwikkeling, lagere concentraties zijn evenwel slechts voor de stammen IV_3 en IV_7 schadelijk, terwijl de beide andere daardoor juist gunstig beïnvloed worden en hun optimale ontwikkeling in celluloseagar bij ca. 0.25 % glucose hebben. Zonderling genoeg zijn de meer specifieke stammen, zooals IV_3 en IV_7, toch in staat om zich ook zonder cellulose te voeden, zooals men uit de laatste drie kolommen in de tabel kan zien. Het groot-moleculaire stijfsel is daarbij het best voor hen geschikt. Streng specifieke cellulose-splitsers zijn ook zij dus niet, maar de cellulose is voor hen toch de aangewezen natuurlijke energiebron. Het is dan ook principieel onjuist om alle sporenvormers slechts als gelegenheidssplitsers te beschouwen.

Deze „echte" cellulosesplitsers onder de sporenvormers zijn echter zeer onopvallende, langzaam groeiende organismen. In de bovenstaande tabel is reeds duidelijk te zien, dat zij zich nòch op zuivere celluloseagar, nòch op suikerhoudende voedingsbodems weelderig ontwikkelen: op z'n vroegst worden zij na 5 of 6 dagen zichtbaar.

Hierin moet vermoedelijk ook de reden gezocht worden voor het feit, dat zij veel minder bekend zijn dan de omnivore soorten. Alle tot nu toe in de litteratuur genoemde aërophiele cellulose splitsende bacillen behooren namelijk tot het snel groeiende omnivore type, terwijl de eenigszins specifieke cellulosesplitsers tot nu toe alleen uit de gelederen der anaërophielen bekend waren. Ook ik vond in het begin alleen de vitale omnivore soorten. Eerst bij een gevarieerde kweektechniek, waarbij tenslotte op celluloseagar geïsoleerd werd, verkreeg ik ook verscheidene langzaam groeiende maar min of meer specifieke soorten. Men moet daarvoor juist de kleinste en minst opvallende koloniën in de eerste uitzaaiingen der ruwcultures uitzoeken tusschen de veel imposantere en ook talrijkere der omnivore soorten.

Bij de morphologische indeeling der sporenvormers in drie groepen werd reeds gezegd, dat deze groepen zich ook in physiologisch opzicht onderscheiden. De snel groeiende, algemeen voorkomende vormen behooren nl. allen tot het „clostridium"-type, terwijl de langzame, specifieke vormen in de beide andere groepen behooren. Interessant is de waarneming, dat de vertegenwoordigers der „clostridium"-groep meestal uitgesproken aërophiel zijn, terwijl de cellulosesplitsers van de „lange" en de „lange sporen"-groep steeds min of meer microaërophiel genoemd kunnen worden. In tabel XI zijn enkele gegevens over de ontwikkelingsmogelijkheden van de sporenvormers op celluloseagar bij verminderden zuurstofdruk weergegeven:

Tabel XI.

Ontwikkeling van enkele sporenvormers bij verminderde zuurstofspanning.

	Volle spanning (± 150 mm)	± 75 mm	± 25 mm	± 10 mm	± 2 mm	absoluut anaëroob
IV_n	+++	+++	+++	+	–	–
IV_7	+++	+++	+++	++	++	+
IV_3	++	++	++	++	+	+

IV_n behoort tot het „clostridium"-type, IV_7 tot het „lange sporen"-type en IV_3 tot het „lange" type.

Recapituleerend kan men de sporenvormende cellulosesplitsers dus ook in physiologisch opzicht in groepen indeelen: namelijk in algemeen verspreide, snel groeiende omnivore organismen — die zich met oplosbare suikers even goed als, of zelfs nog beter dan met cellulose kunnen voeden — en langzamer groeiende, maar meer of

minder op cellulose en verwante stoffen aangewezen soorten. De eerste groep kan men feitelijk als „gelegenheidscellulosesplitsers" beschouwen, zooals WINOGRADSKY ze noemt, want ze tasten de cellulose pas aan, nadat alle oplosbare koolhydraten in den voedingsbodem uitgeput zijn. De vertegenwoordigers van de tweede groep echter worden in hun celluloseaantasting door oplosbare suikers wel geremd, maar ze tasten de cellulose toch ook dan duidelijk aan. De in tabel XII weergegeven percentages van cellulosesplitsing illustreeren deze bewering duidelijk:

Tabel XII.

Splitsingspercentage van papierreepen op voedingsagar met compostextract en stijgende hoeveelheden glucose.

Glucose-gehalte	0 %	0.05 %	0.1 %	0.25 %	1 %	3 %	ongeënte contrôle
IV_3	23	21	18	14.5	6.5	2.0	2.0
IV_n	51	29	16	4.5	2.0	2.0	2.0

Wat andere onoplosbare koolhydraten met groot moleculair gewicht betreft, werd stijfsel reeds als gunstige voedingsstof genoemd. Agarsplitsing werd door mij bij geen enkelen stam vastgesteld. Hierbij kon dus ook geen verschil tusschen de „omnivore" en de „specifieke" bacillen worden aangetoond. Andere stoffen van dezen aard werden niet bij het onderzoek betrokken.

In tegenstelling tot de vibrionen groeien alle sporenvormers voortreffelijk ook op organische stikstofverbindingen en verscheidene soorten kunnen zich zelfs alléén daarop ontwikkelen. De door KALNINS (80) geïsoleerde bacil behoorde ook reeds tot deze groep. Het zijn weer de omnivore, snel groeiende clostridium-achtige vormen, die de organische stikstof het meest noodig hebben. Bij de langzame, semi-specifieke soorten wordt de groei er veel minder door bevorderd; sommige zijn er zelfs totaal onverschillig voor.

Voor een der twee voornaamste minerale stikstofvormen — nitraat- en ammoniakstikstof — hebben de sporenvormers, voor zoover zij zich daarop trouwens kunnen ontwikkelen, geen merkbare voorliefde, alleen stijgt de zuurgraad in het voedingssubstraat bij gebruik van ammoniumzouten veel sneller dan wanneer nitraten worden gebruikt, zoodat de ontwikkeling op deze voedingsbodems eerder stagneert. Dat is overigens een algemeen verschijnsel.

De gevoeligheid van de cellulose splitsende bacillen voor de reactie is niet zoo groot als die der cellvibrionen. Naar den zuren kant kon

ik bij eenige stammen nog bij een pH van ± 5.0 een duidelijke ontwikkeling constateeren, terwijl andere stammen geen hoogeren zuurgraad dan een pH van ± 6.0 of slechts van ± 6.5 konden verdragen. Naar den alkalischen kant is hun ontwikkelingsmogelijkheid vrij uniform begrensd door een pH = ± 8.5. Deze resultaten zijn zeer goed in overeenstemming met die van KALNINS (80) en SIMOLA (168). De gemiddelde pH-grenzen voor de drie groepen zijn de volgende:

De „clostridium"-groep van ± 5.0 tot ± 8.5.
De „lange sporen"-groep van ± 6.0 tot ± 8.5.
De „lange" groep van ± 6.5 tot ± 8.0.,

terwijl de vibrioachtige bacillen zich bij een pH van ± 6.0 tot ± 9.0 kunnen ontwikkelen. Over het geheel zijn de bacillen dus aan de normale reactie als optimum gebonden. Uitgesproken zuurvaste soorten heb ik onder hen evenmin gevonden als onder de cellvibrionen.

Ook bleken zij zeer zwakke zuurproducenten te zijn. Op cellulosevoedingsbodems daalde de pH nooit beneden 5.5, maar ook uit glucose of saccharose werd slechts weinig zuur gevormd, zoodat de laagste pH-waarden, die ik daarbij vond, altijd nog tusschen 4.5 en 5.0 lagen. Ook in dit opzicht komen mijn resultaten overeen met die van SIMOLA (168) en KALNINS (80). De snel groeiende „clostridium"-soorten bleken de sterkste zuurvormers te zijn, de vertegenwoordigers der „lange" groep de zwakste.

De temperatuurgrenzen van hun ontwikkeling heb ik bij de sporenvormers evenmin als bij de cellvibrionen nauwkeurig bepaald; alleen heb ik ze bij 28°—30° C en bij ± 15° C gekweekt. Zij groeien bij beide temperaturen, bij 15° C evenwel zwak. Sommige „clostridium"-stammen en de meeste „lange" bevinden zich bij 15° dicht bij hun minimale temperatuur. Ook op deze plaats wil ik er de nadruk op leggen, dat mijn stammen steeds bij 28—30° C werden geïsoleerd, zoodat eventueel voorkomende thermophiele soorten niet werden verkregen. Maar verscheidene vroegere publicaties, o. a. die van SIMOLA (168), hebben het bestaan van uitgesproken thermophiele cellulose splitsende bacillen bewezen. SIMOLA vond ze ook onder de aërophielen.

Niet verwonderlijk is de zeer hooge verhittings- en uitdrogingsresistentie der bacillen. Alle door mij geïsoleerde sporenvormers (ook de vibrio-achtige) verdroegen zelfs zeer hooge en langdurige verhitting, als men maar sporenrijk materiaal gebruikte. Een verhitting in het waterbad, waarbij de organismen 5 minuten op 98°—100° C werden gehouden, werd door alle cultures doorstaan; vaak werkte deze behandeling zelfs stimuleerend. Een inwerking van dezelfde temperatuur gedurende 10 minuten, doodde reeds sommige vertegen-

woordigers der „clostridium"-groep, en 20 minuten waren reeds voor de meeste soorten letaal. Het taaist bleken de sporen der „lange" groep en van de vibrioachtige soorten te zijn, die zelfs 30 en sommige zelfs 45 minuten lang de kooktemperatuur verdroegen.

De luchtdroge toestand kan ook door vele sporenlooze microben zeer lang verdragen worden, maar de bacillen verdragen niet alleen luchtdroogte schier onbeperkt, maar ook een maximale uitdroging in den exsiccator boven geconcentreerd zwavelzuur werd meestal meer dan een jaar lang overleefd. Een der in 1934 geïsoleerde clostridium-achtige soorten liet ik als ingedroogde agarcultuur tot 1938 in een exsiccator boven geconcentreerd zwavelzuur liggen; toch bleek zij zelfs toen nog volkomen levensvatbaar te zijn en kiemde in groot aantal. De cellulosesplitsende bacillen blijven wat uitdrogings- en hitteresistentie betreft dus niet bij andere sporenvormers ten achter.

Voor ik van de sporenvormers afstap, moet nog de vraag beantwoord worden, of alle genoemde cellulose splitsende bacillen ook werkelijk speciale soorten zijn. Het zou namelijk volstrekt niet onmogelijk zijn, dat het zeer algemeen verspreide en goed bekende organismen zijn uit de familie der aërobe sporenvormers, waarvan nu echter blijkt, dat zij ook cellulose kunnen aantasten. Voor alle morphologisch eigenaardige soorten, zooals de vibrio- en trommelstokachtigen, en bij alle physiologisch op cellulose gespecialiseerde groepen, namelijk de langzaam groeiende stammen, kan deze vraag zonder twijfel positief beantwoord worden. De groote massa der omnivore, snel groeiende soorten echter is op geen enkele wijze gespecialiseerd en men zou hun cellulolytisch vermogen nooit herkennen zoolang men niet met cellulose werkt. Bij deze soorten is volgens mij op de hier gestelde vraag geen beslissend antwoord te geven. Integendeel, ik vermoed, dat verscheidene van deze algemeen verspreide soorten reeds vaak geïsoleerd en misschien zelfs beschreven zijn, zonder dat men gemerkt heeft, dat zij cellulose kunnen splitsen. Een ter contrôle ingesteld onderzoek van eenige der meest algemeene aërophiele bacillen, namelijk *Bac. subtilis* (2 stammen), *Bac. mesentericus* (2 stammen), *Bac. megatherium*, *Bac. vulgatus* en *Bac. mycoides* toonde aan, dat geen van hen in staat is cellulose aan te tasten. Tot een van deze soorten behooren mijn cellulosesplitsers dus niet.

Dezelfde vraag, die ik hier voor de bacillen heb opgeworpen, kan ook met betrekking tot de cellvibrionen, in hoofdzaak voor de omnivore soorten onder hen, worden gesteld. Ook daarvoor is zij niet gemakkelijk te beantwoorden; ik heb zelfs van ieder onderzoek daaromtrent afgezien.

§ 2. MYXOBACTERIACEAE.

a. Cytophaga.

In de cytophagen ziet men tegenwoordig algemeen de microben, die zich het meest hebben aangepast aan en gespecialiseerd op de cellulosesplitsing, en die men ook een groote rol bij de mineralisatie van plantaardige stoffen toeschrijft. Het lijkt mij doelloos, hier een beschrijving der cytophagen te geven, daar zij reeds herhaaldelijk gedetailleerd beschreven zijn. Slechts ter oriënteering is in Hoofdstuk I, pag. 15—16 de ook nu nog geldende omschrijving van HUTCHINSON en CLAYTON als een korte diagnose gegeven (fig. 39). Alleen dié vragen, waarin ik tot nieuwe of afwijkende resultaten gekomen ben, zullen uitvoeriger besproken worden [1]).

Morphologische bijzonderheden.

Omtrent de afmetingen der *Cytophaga's* dient er op gewezen te worden, dat tusschen de normale individuen met een gemiddelde lengte en breedte van 3 tot 6 × 0.2 tot 0.5 μ soms ook enkele veel langere individuen voorkomen (fig. 40).

Behalve de karakteristieke krommingsbewegingen hebben de cytophagen geen beweeglijkheid op de wijze der bacteriën. Ciliën ontbreken dan ook geheel. Slechts een zeer langzame, iets heen en weer schommelende kruipbeweging in de richting van hun lengteas bezitten zij. Deze wijze van bewegen is karakteristiek voor alle myxobacteriën.

In tegenstelling tot alle andere onderzoekers, die nooit speciale organen aan de uiteinden der cellen geconstateerd hebben, beeldt ROKITSKAJA (150) de cytophagen met zeer lange, dunne, spiraalvormig gewonden uitloopers af. Deze afbeeldingen zijn teekeningen en geen fotografische bewijsstukken. Daarom is het natuurlijk niet uitgesloten, dat bepaalde optische effecten ROKITSKAJA hierbij misleid hebben. Haar geheele werk is echter overigens zóó grondig en critisch, en de opgaven over de uitsteeksels zijn zóó positief en duidelijk, dat men deze laatste niet zonder meer als een vergissing bestempelen kan. Het is mij echter evenmin als alle andere onderzoekers gelukt dergelijke aanhangsels aan de uiteinden der cellen te zien, ook niet bij gebruikmaking van de ciliënkleuring in jonge, duidelijk beweeglijke preparaten. Aan den anderen kant geloof ik echter herhaaldelijk een zeer zwak maar snel heen en weer buigen van de uiterste celeinden te hebben

---

[1]) Voor nauwkeurige opgaven zij naar de volgende publicaties verwezen: HUTCHINSON en CLAYTON (61), WINOGRADSKY (214), DUBOS (43), DUBOS en WAKSMAN (202) KRZIEMIENIEWSKA (97, 98), ROKITSKAJA (150), ISSATSCHENKO en WACKENHUT (65), STAPP en BORTELS (174) en IMŠENECKY en SOLNTZEWA (62).

waargenomen, waarbij zeer kleine deeltjes soms in de vloeistof energiek heen en weer getrokken werden, zoodra ze in de nabijheid van het celeinde kwamen. Deze vaak herhaalde waarneming wijst er wel op, dat de celeinden der cytophagen misschien toch door middel van een soort van ciliën of hechtorganen verantwoordelijk zijn voor hun beweging. Ik herhaal echter, dat hierbij meer geraden moest worden dan werkelijk waargenomen. Het is daarom niet uitgesloten, dat alles slechts gezichtsbedrog was.

Zooals reeds op blz. 19—23 bij de behandeling der litteratuur over de cytophagen vermeld werd, bestaan er nog zeer verschillende opvattingen over het proces der encysteering en het ontkiemen der cysten. Volgens mijn eigen waarnemingen is daarbij uiterlijk zoo goed als niets te zien. Alles waar het om gaat speelt zich binnen in het plasma af. In den vorm der cellen ziet men slechts een geleidelijke verdikking en verkorting optreden, eerst tot clostridiumachtige figuren, die langzamerhand geheel rond worden en zoo de microcysten vormen. Bij ontkieming worden de ronde cysten langzamerhand weer lang en ontwikkelen zich tenslotte tot normale, dunne, spitse wormpjes. Tijdens de geleidelijke strekking zijn de cellen stomp aan de uiteinden, terwijl ze bij het opzwellen bij het begin der encysteering nog zeer langen tijd min of meer spitse uiteinden behouden (fig. 45—47 resp. 41—44). Eenig ander proces heb ik nooit kunnen waarnemen, hoewel ik verscheidene cytophagen onder verschillende uitwendige omstandigheden onderzocht heb. Zoo heb ik b.v. nooit iets van een omhulsel der cysten gezien, waar volgens KRZIEMIENIEWSKA (97, 98) de ontkiemende cel uit naar buiten treedt (zie pag. 19 Hoofdstuk I). Ik sluit mij daarom bij de opvatting van ROKITSKAJA (150) aan, die gelooft, dat het omhulsel der cyste nog vóór het ontkiemen wordt opgelost. Het gaat hierbij echter om zulke fijne processen, dat een exact waarnemen nauwelijks mogelijk is.

Ook heb ik nooit het kiemingsproces, zooals STAPP en BORTELS (174) en ook IMŠENECKI en SOLNTZEWA (62) dat beschrijven, kunnen waarnemen. Eveneens is de mededeeling van ISSATSCHENKO en WACKENHUT (65), als zouden de wormpjes in een kluwen opgerold reeds in de cysten gevormd worden en bij de ontkieming meteen in hun uiteindelijken slanken vorm uit de laatste naar buiten treden, volkomen in tegenspraak met alles wat ik heb kunnen waarnemen. Misschien moeten deze beide waarnemingen met de bijzondere vormen van het chromatine en de vaak aan de microcysten zichtbare „stompjes" in verband worden gebracht, die soms den indruk van een ontkieming door een dunne uitstulping of van een binnen in de cyste opgerold wormpje kunnen geven. Het chromatine kan in de cellen der cyto-

phagen namelijk zeer verschillende vormen aannemen, en het schijnt in den levenscyclus van deze organismen aan bepaalde veranderingen onderworpen te zijn. De KRZIEMIENIEWSKI's (97, 98, 104) en later nog uitvoeriger BADIAN (4, 5, 6) hebben deze metamorphosen nauwkeurig waargenomen en beschreven. In de cysten komt het chromatine meestal zeer sterk geconcentreerd voor als een klein compact lichaam. Het bevindt zich steeds excentrisch. Het is in zulke ronde organismen als de cysten niet gemakkelijk om de plaatsing van een zichtbaar lichaampje juist te beoordeelen. Bij vele jonge cysten bevindt zich het donkere chromatinelichaampje echter duidelijk in de peripherie (fig. 41 en 48).

Op deze plaats neemt men buiten op de cyste vaak een klein „stompje" waar (fig. 49), dat zich in het begin in de ontstaande cyste nauwelijks laat kleuren, eenige uren later echter kleurstoffen zeer sterk vastlegt, en dus waarschijnlijk eveneens uit chromatineachtige substantie is opgebouwd. Bij de vorming van het „stompje" wordt het chromatinelichaampje merkbaar kleiner en vormt tenslotte nog maar een voortzetting van het stompje binnen in de cyste, zoodat het dan den indruk maakt alsof er een staafje dwars door den cystenwand is gedrongen en halverwege daarin is blijven steken (fig. 50 en 51). Vermoedelijk moet men dit proces zoo uitleggen, dat het chromatine zich gedeeltelijk door den wand der cyste heen tot een uitwas of stompje uitstulpt. Vaak ziet men in dit stadium ook aan den tegenovergestelden kant der cyste een klein bultje en een verdikking van den wand, en soms kan men een zich sterker kleurende streep dwars door de geheele cyste heen van de eene pool naar de andere waarnemen (fig. 49). In heel jonge cysten is de plaatsing van het chromatine niet zoo regelmatig en vindt men vaak verscheidene chromatinelichaampjes, die echter alle peripherisch gelegen zijn. Bij het verdere rijpen der cysten, beginnen deze over hun geheele oppervlakte kleurstoffen zoo sterk te adsorbeeren, dat zij volkomen zwart worden en geen inwendige structuur meer laten zien (fig. 44); toch ziet men ook dan nog vaak de stompjes (fig. 50). In ongekleurde preparaten herkent men helaas van al deze vormen zoo goed als niets, daarom is het niet uitgesloten, dat veel van het zoo even beschrevene geen natuurlijke vormingen zijn, maar pas door het fixeeren en kleuren van het preparaat ontstaan is.

De vorming der cysten begint bij de cytophagen reeds zeer vroeg, hoewel daarin groote verschillen tusschen de afzonderlijke stammen optreden. De eerste cysten kan men vaak reeds 30 tot 40 uur na het overenten waarnemen en de spoelvormige overgangsstadia zelfs nog eerder; dus op een tijdstip, dat de vegetatieve ontwikkeling der cultuur nog zeer onvolkomen is. In dergelijke nog groeiende en actieve cultures ziet men daarom ook steeds cysten naast wormpjes, en pas in ouder

wordende inactieve cultures verdwijnen de laatste langzamerhand zoo goed als geheel.

STAPP en BORTELS (174) hebben reeds de z.g. „stervorming" der cytophagen beschreven (zie pag. 22 Hoofdstuk I). Later werd dit ook waargenomen door IMŠENECKY en SOLNTZEWA (62) en ook ik kon bij de meeste geïsoleerde cytophagenstammen duidelijk „sterren" waarnemen. STAPP en BORTELS deelen mede, dat de microcysten zich binnen in de „sterren" vormen, terwijl de buitenste cellenlagen als omhulsel optreden. Uit hun publicaties en die van IMSENECKY en SOLNTZEWA valt niet op te maken, of zij de cystenvorming alleen in de „sterren" mogelijk achten of ook daarbuiten bij de vrij in het substraat liggende cellen. Toch is deze vraag volgens mij belangrijk, daar een vergelijking der „sterren" met de vruchtlichamen der myxococcen alleen dan geheel gerechtvaardigd is, als de cystenvorming uitsluitend in de ophoopingen kan plaats vinden. Dat is echter volgens mijn waarnemingen niet het geval. Wel heb ik kunnen bevestigen, dat er in de „sterren" zeer veel cysten ontstaan, maar ik heb ook in den hangenden druppel vaak de cystenvorming kunnen waarnemen en schrede voor schrede kunnen volgen, ook in preparaten, waarin geen spoor van een „ster"-vorming te zien was. Ik wil de verklaring van deze „sterren" als myxobacteriën-vruchtlichamen volstrekt niet bestrijden, maar hun rol als zoodanig is zeker zeer gering.

Sinds de eerste beschrijving der cytophagen door HUTCHINSON en CLAYTON (61) werd hun wijze van groeien steeds op ongeveer gelijke wijze beschreven. Alle onderzoekers zijn het er over eens, dat de cytophagen geen zichtbare koloniën vormen, maar slechts het substraat zichtbaar veranderen en verkleuren. Op celluloseagar ontstaan dus heldere cirkelvormige oplossingsvelden, waarin niets te zien is (fig. 52). In sommige gevallen evenwel treden uitzonderingen op. Ten eerste bij het gebruik van suikerhoudende celluloseagar. Hierbij vormen zich in het midden der oplossingsvelden, die nu overigens veel kleiner blijven, onregelmatig gevormde wolkachtige ophoopingen van microben, zoodat soms 1 tot 2 mm groote duidelijk zichtbare koloniën ontstaan (fig. 53 en 54), die dan de karakteristieke kleur der betreffende cytophagensoort vertoonen. Bij nauwkeurig microscopisch onderzoek van dergelijke koloniën blijkt, dat dit volkomen normale koloniën zijn, alleen zijn de cellen er in het midden veel dichter opeen gepakt en vormen zij geen cysten.

Bij de door mij onderzochte stammen vormen zich zulke zichtbare koloniën bij een glucosegehalte van ± 0.1 %. Voert men het suikergehalte verder op tot ± 0.25 %, dan vormen zich zelfs in 't geheel geen oplossingsvelden, maar komen alleen duidelijk zichtbare koloniën

tot ontwikkeling, die in de agar onregelmatig lensvormig groeien en óp de agar bolle nat-glimmende druppeltjes vormen (fig. 55). Ook het microscopische beeld der cytophagen wordt door de suikertoevoeging sterk gewijzigd. Bij 0.1 % glucose zijn de cellen nog vrijwel normaal van vorm, hoewel zij onregelmatiger gekromd zijn, en de cystenvorming volkomen onderdrukt is. Bij 0.25 % glucose zijn de cellen echter al volkomen vervormd, vaak opgezwollen, vergroot en vertoonen bandvormige chromatineconcentraties (fig. 56 resp. 57).

Een geheel ander verschijnsel doet zich echter voor bij eenige cytophagenstammen bij oudere koloniën in agar, hoofdzakelijk wanneer de agarlaag dik is en de koloniën ver uit elkander gelegen zijn, dus bij een groot overschot aan voedingsstoffen. Hierbij ontwikkelen zich soms 2 à 3 weken na het uitzaaien, als de oplossingsvelden zich niet meer uitbreiden en bijna alle individuen al geëncysteerd zijn, plotseling zichtbare, kleine, lensvormige, intensief gekleurde koloniën in de heldere velden, meestal in het midden van deze laatste gelegen (fig. 58). Ook op het agaroppervlak verschijnen dan vaak kleine, nat glanzende, hoog gewelfde, ronde koloniën. Toen ik dit verschijnsel voor de eerste maal waarnam, dacht ik met satellietkoloniën te doen te hebben; het microscopische onderzoek weerlegde deze opvatting echter meteen: deze bacterie-achtige secundaire koloniën bestonden duidelijk uit cytophagenwormpjes, alleen waren ze hier eenigszins vervormd. De meeste cellen waren onregelmatig, soms zelfs hoekig gekromd of sterk opgerold, ze hadden een ietwat dikker, gezwollen uiterlijk en lieten zich niet zoo intensief kleuren als jonge, vitale, normale wormpjes. Het chromatine was zeer onregelmatig, als kleine korreltjes, aanwezig, zooals men het vaak in oude, afstervende cellen ziet. Iedere beweeglijkheid ontbrak — noch het kruipen, noch de krommingsbewegingen konden in deze koloniën ooit worden waargenomen. De cellen maakten daarom een volstrekt abnormalen, gedegenereerden indruk. Toch lieten zij zich goed overenten en leverden dan volkomen normale cultures op. Merkwaardig genoeg ontstonden in deze secundaire koloniën nooit cysten.

Wat de kleur der cytophagen betreft moet hier nog worden opgemerkt, dat de kleur der cellen zelf niet overeenkomt met die van het door hen aangetaste papier. Dit laatste wordt in de litteratuur meestal abusievelijk als de kleur der cytophagen aangegeven. De meeste cytophagen worden daarom ook eigeel tot vuil geelachtig genoemd. De vorming der zichtbare, zooeven beschreven koloniën maakte het mij echter mogelijk om de ware kleur der cellen zelf te zien, terwijl zij in de normale, betrekkelijk bacteriearme, koloniën onzichtbaar is. Daarbij bleek het, dat verreweg de meeste cytophagen niet geel, maar

vleeschkleurig of zalmkleurig tot oranje of bruin zijn, dus de kleur hebben van de meeste myxobacteriën. Geel, en soms zelfs intensief geel, zijn echter hun splitsingsproducten, waardoor het papier en tot op zekere hoogte ook de agar zich duidelijk geel kleuren, daar deze kleurstof ver door het substraat heen diffundeeren kan.

Physiologische bijzonderheden.

Sedert HUTCHINSON en CLAYTON neemt men algemeen aan, dat de cytophagen uitsluitend van cellulose kunnen leven, en alle andere koolhydraten en in 't algemeen alle andere organische verbindingen versmaden, ja meestal door hoogere concentraties daarvan zelfs geschaad worden. Ik zou daarin toch een zekere beperking willen aanbrengen: in suikerhoudende celluloseagar was de ontwikkeling der cytophagen wel degelijk mogelijk. Hierboven werd reeds medegedeeld, dat op suikerhoudende celluloseagar abnormale „zichtbare" koloniën ontstaan, die uit zeer dicht opeen liggende individuen bestaan. Een nauwkeurige telling der cellen in een kolonie is niet mogelijk, maar een vrij betrouwbare schatting is na het kleuren wel te maken. Daarbij bleek het, dat, bij een even dichten stand der koloniën in de agar, per kolonie in een suikerhoudenden voedingsbodem zeker 5 tot 10 maal zooveel individuen voorkwamen als in normale celluloseagar. Dit is dus juist in strijd met het verwachte, daar de oplossingsvelden hierbij kleiner blijven, zoodat minder cellulose wordt afgebroken. De glucose heeft dus de ontwikkeling der cytophagen duidelijk bevorderd, wat overigens ook daaruit blijkt, dat deze in suikerhoudende agar aanmerkelijk versneld is. In agar van dezelfde samenstelling, en met hetzelfde glucose-gehalte, maar zónder cellulose, bleef echter iedere ontwikkeling uit. Ik zou daarom de algemeene opvatting, dat de cytophagen geen andere organische verbindingen kunnen gebruiken dan cellulose in zooverre willen veranderen, dat zulks alleen opgaat in de gevallen, waarin de stof in kwestie alléén gegeven wordt, maar niet wanneer deze naast de cellulose ter beschikking staat. Zoo volkomen gespecialiseerd, als tot nu toe werd aangenomen, zijn de cytophagen dus niet.

De boven vermelde resultaten werden herhaaldelijk verkregen, waarbij zelfs van verschillende cytophagenstammen gebruik gemaakt werd. Als oplosbare suiker diende daarbij steeds glucose. Van andere organische verbindingen werd door mij hierbij alleen nog manniet onderzocht. Dit bleek echter volstrekt onwerkzaam te zijn op de ontwikkeling; het oefent echter volgens de onderzoekingen van STAPP en BORTELS (174) en ook volgens mijn eigen ervaringen een veel minder schadelijke werking op de cellulosesplitsing der cytophagen

uit. Verdere onderzoekingen zouden moeten aantoonen, of dit een toevallig verschijnsel is, of dat alle stoffen, die reeds bij geringe concentratie de cellulosesplitsing hinderden, tot op zekere hoogte ook als voedsel kunnen worden opgenomen.

De boven vermelde bevordering van den groei door druivensuiker is het opvallendst bij een gehalte van 0.05 tot 0.1 % suiker, terwijl 0.01 % nog ternauwernood van invloed is, en 0,25 % reeds elke ontwikkeling onmogelijk maakt. De schadelijke werking van de glucose op de cellulosesplitsing werd ook eerst bij 0.05 % merkbaar, terwijl 0.01 % glucose nog zonder invloed bleef. Alle door mij onderzochte cytophagenstammen zijn in dit opzicht dus minder gevoelig dan de *Cytophaga globulosa* van STAPP en BORTELS (174), die volgens hun mededeelingen reeds bij 0.01 % glucose haast geen cellulose meer splitst [1]).

Langen tijd werd algemeen aangenomen, dat de cytophagen bijzonder aërophiel zijn. IMŠENETSKY en SOLNTZEWA (62) zijn echter tegen deze meening opgekomen. Mijn proeven hebben ook nooit een bijzonder geprononceerde aërobiteit kunnen vaststellen, zoodat ik mij geheel bij hen kan aansluiten. Ik kon evenals deze onderzoekers in reageerbuizen tot 10 cm diep in vloeibare voedingssubstraten en tot 3 cm diep in agar groei en cellulosesplitsing verkrijgen. Een sterke daling van de zuurstofspanning wordt door de cytophagen echter niet verdragen. Zij zijn dus wel echte aërobionten, maar onderscheiden zich in dit opzicht niet merkbaar van andere aërophiele organismen.

Tenslotte moet er hier nog op gewezen worden, dat de cystenvormende cytophagen in tegenstelling tot de cellvibrionen en de bacillen slechts zelden een duidelijke behoefte aan groeistoffen toonen. Zij groeien in zuiver synthetische substraten vrijwel even goed als in voedingsbodems met plantaardige of dierlijke extracten of in symbiose met andere organismen. Geheel anders gedragen zich de cystenlooze stammen, die hieronder nader besproken zullen worden, want zij kunnen zonder groeistoffen in het geheel niet tot ontwikkeling komen.

Systematische indeeling.

De cystenlooze soorten zijn in jonge cultures morphologisch haast niet van de cystenvormende te onderscheiden. Zij behouden echter steeds onveranderd de echte „wormpjesvorm" (fig. 59 en 60). KRZIEMIENIEWSKA (97, 98) deelt mede, dat zij iets kleiner zijn dan de cystenvormende; andere onderzoekers hebben echter ook dit verschil niet waargenomen. Morphologisch beschouwde men dus de cysten-

[1]) Na het ter perse gaan van dit werk kreeg ik ter inzage enkele publicaties van R. Y. STANIER en van G. FÅHRAEUS, die beiden eveneens tot het inzicht komen, dat alle Cytophaga-stammen ook glucose kunnen opnemen. Zij hebben dit geheele probleem zelfs veel vollediger onderzocht.

looze soorten tot op heden als ongeveer gelijk aan het „wormpjes-stadium" van de cystenvormende, physiologisch echter hebben reeds STAPP en BORTELS (174) een zeer belangrijk verschil waargenomen, dat ook IMŠENETSKY en SOLNTZEWA (62) en ook ik volkomen konden bevestigen. Het lukte STAPP en BORTELS namelijk niet, de cystenlooze soorten op synthetische voedingsbodems rein te kweeken. Zoodra zij hun cultures geheel van de begeleidende organismen gezuiverd hadden, groeiden de cytophagen niet meer. Alleen bij aanwezigheid van bepaalde begeleidende organismen konden zij hen voortkweeken, zoodat zij genoodzaakt waren met mengcultures te werken. In het laatste hoofdstuk zal deze eigenschap der cystenlooze cytophagen nader besproken worden. Dat WINOGRADSKY (214), KRZIEMIENIEWSKA (97, 98) en DUBOS en WAKSMAN (202) deze bijzonderheid van de cystenlooze cytophagen niet vermelden, is waarschijnlijk hieruit te verklaren, dat zij òf geen zuivere cultures hadden, òf dat zij hun cultures niet langen tijd voortkweekten, òf geen synthetische voedingsbodems gebruikten.

Met behulp van de speciale methodes gelukte het mij langzamerhand, van alle gevonden cystenlooze cytophagen toch reine cultures te verkrijgen, waarin men hun morphologische kenmerken ongehinderd kon bestudeeren.

Na ze in zuivere cultuur bestudeerd te hebben, kon ik de cystenlooze cytophagen ook in verschillende grondsoorten nauwkeuriger onderzoeken. In de eerste plaats bleek daarbij, dat zij veel talrijker zijn en ook meer algemeen voorkomen dan de cystenvormende. Bovendien zijn de cystenlooze soorten minder kieskeurig en komen zij ook in grondsoorten voor, waarin de cystenvormende geheel ontbreken. De klassieke cystenvormende soorten komen eigenlijk alleen in de bovenste lagen van zuurstof- en basenrijke gronden voor, terwijl de cystenlooze ook in een veel zuurstofarmere omgeving, ja zelfs in den modder op den bodem van zoetwater voorkomen en ook veel hoogere zuurgraden verdragen. Zoowel in den grond, als op kunstmatige voedingsmedia in het laboratorium gelukte het nauwelijks een normale ontwikkeling van de cystenvormende cytophagen te verkrijgen buiten de pH-grenzen van 6.2 tot 8.5. De cystenlooze soorten groeiden daarentegen nog goed bij een pH van 5.8 en ook alcalitolerante stammen, die een pH van 9.0 nog verdroegen, kwamen onder hen voor. In bijzonder grooten getale komen de cystenlooze soorten voor in ophoopingen van organisch materiaal, dus in mest, compost, boschhumus en in humusrijken tuingrond.

Dat de veel algemeenere cystenlooze soorten later ontdekt werden dan de cystenvormende en door verscheidene onderzoekers zelfs geheel over 't hoofd werden gezien, moet vermoedelijk daardoor

worden verklaard, dat zij niet op de gewone wijze geïsoleerd kunnen worden en ook veel vlugger afsterven dan de cystenvormende. Terwijl de laatste — mits koel en vochtig gehouden — zeker niet vaker dan eens in de 3 à 4 maanden overgeënt behoeven te worden, moet men bij de cystenlooze soorten daarmee meestal niet langer wachten dan 3 tot 4 weken. Het ligt voor de hand om aan te nemen, dat dit snelle afsterven van de cystenlooze soorten door het ontbreken van het ruststadium — de cyste — wordt veroorzaakt.

Het ontbreken van cysten, de behoefte aan toevoer van groeistoffen van buiten af en het snelle afsterven zijn overigens niet de eenige kenmerken, waarin de cystenlooze cytophagen zich van de cystenvormende onderscheiden. Er is ook een duidelijk verschil in de wijze van groeien: de cystenvormende soorten breiden zich nooit ongelimiteerd uit. Wanneer de heldere zones in de celluloseagar een bepaalde grootte bereikt hebben, die zelden meer dan 1 cm in Ø bedraagt, groeien zij niet meer. De cystenlooze soorten echter groeien steeds verder, totdat oplossingsvelden ontstaan, die zich soms over meer dan de halve agarplaat kunnen uitstrekken. Zij putten daardoor de voedingsbodem veel grondiger uit dan de cystenvormende. Heel kleine stukjes papier worden door beide soorten geheel en al verteerd, grootere echter alleen door de cystenlooze. Bovendien bemerkt een geoefend oog direct, dat bij de cystenlooze cytophagen de oplossingsvelden in de agar veel doorzichtiger zijn dan bij de cystenvormende. De laatste vormen namelijk een veel troebeler slijm, dat zich vaak min of meer ringvormig opeenhoopt, zoodat men soms heel duidelijk concentrische troebele ringen in de heldere koloniën kan zien. Bij de cystenlooze soorten treft men nooit iets dergelijks aan. Ook zijn de oplossingsvelden dieper in de agar ingezonken; zij tasten deze dus sterker aan. Tenslotte moet nog vermeld worden, dat zij gemiddeld meer gele kleurstof afscheiden dan de cystenvormende, zoodat daardoor de geheele voedingsbodem intensiever geel gekleurd wordt.

Behalve deze macroscopisch zichtbare verschillen, is er microscopisch-morphologisch ook verschil te zien. In de eerste plaats de grootte van de wormpjes. De cystenvormende soorten zijn altijd 3 tot 8 μ lang en ca. 0.4 μ dik, terwijl men onder de cystenlooze zeer verschillende grootten aantreft. Zij kunnen ongeveer even groot zijn, maar ook veel kleinere komen voor, die nauwelijks 2 tot 3 μ lang en 0.2 μ dik zijn. Hetzelfde geldt ook voor den vorm der wormpjes. De cystenvormenden hebben allen precies dezelfde vorm; zij zijn recht tot min of meer gebogen en vertoonen de reeds vaak beschreven „Cytophaga"-vorm. De cystenlooze soorten zijn echter veel onregel-

matiger en vertoonen vaak afwijkende vormen: hoekig gebogen, abnormaal kort en met stompe uiteinden, of S-vormig gebogen of spirillen-achtig gegolfd. Vooral de beide laatste vormen komen vaak voor. Het zijn zeker geen involutie- of seniliteitsverschijnselen, daar zij juist in jonge, beweeglijke cultures op normale voedingsbodems op den voorgrond treden (fig. 61). Deze gegolfde vormen zijn vaak net zoo duidelijk beweeglijk als de normale en kruipen, heen en weer zwaaiend en zich buigend en strekkend, soms relatief snel rond.

De vormenrijkdom der cytophagen is in 't algemeen veel grooter dan men op grond van de litteratuuropgaven zou verwachten. Men moet echter, om alle bovengenoemde verschijningsvormen te verkrijgen, de cytophagen op sterk gevarieerde media en onder zeer verschillende omstandigheden kweeken en hen daarbij voortdurend microscopisch controleeren.

Ook in physiologisch opzicht zijn de cystenlooze soorten veel variabeler dan de cystenvormende. Zoo kan hun verdraagzaamheid tegenover oplosbare organische stoffen zeer verschillend zijn. Tenslotte is mij zelfs gebleken, dat de cystenlooze soorten niet altijd obligate cellulosesplitsers zijn, want kort geleden isoleerde ik een zeer actieve en overigens karakteristieke cystenlooze *Cytophaga*, die echter behalve cellulose ook agar duidelijk aantastte. De entstrepen op agarplaten werden op den duur diepe putjes of kuiltjes en de agar werd op deze plaatsen week. Deze bijzondere soort, die men wel *Cytophaga agarliquefaciens* zou kunnen noemen, gedraagt zich overigens physiologisch volkomen normaal en is tegenover oplosbare suikers even gevoelig als de normale soorten.

Hoe is nu echter de systematische verhouding van de cystenvormende cytophagen tot de cystenlooze? Van de onderzoekers, die cystenlooze soorten hebben gevonden, roeren DUBOS en WAKSMAN (202) en ook STAPP en BORTELS (174) deze vraag in 't geheel niet aan. KRZIEMIENIEWSKA (98) legt er wel den nadruk op, dat men deze beide vormen scherp moet onderscheiden en stelt ook voor om hun verschillende namen te geven. Zij wil echter toch alle cytophagen tot één geslacht vereenigen. Deze eenheid zou dan dus hoofdzakelijk gegrond zijn op physiologische kenmerken. IMŠENETSKY en SOLNTZEWA (62) tenslotte, beschouwen de cystenlooze soorten slechts als variëteiten of rassen van de normale cystenvormende, die het vermogen om cysten te vormen verloren hebben. Ik kan mij in beginsel bij deze zienswijze aansluiten, wil echter juist de cystenlooze soorten als de normale onder de cytophagen beschouwen, terwijl de cystenvormende stammen slechts relicten voorstellen, die verraden, dat de cytophagen tot de myxococcen behooren. Het schijnt mij nl. onlogisch toe om

een groote, uit verschillende soorten opgebouwde groep als een onderdeel van een veel kleinere te beschouwen, die bovendien zóó homogeen is, dat men haar nauwelijks als een groep van verschillende soorten, maar beter als één soort kan beschouwen.

Door het verlies van het vermogen om cysten te vormen, nemen de cystenlooze cytophagen weliswaar een zeer speciale plaats onder de myxobacteriën in. Myxobacteriën, die geen cysten- of sporenstadium hebben, zijn namelijk overigens niet bekend. Hun cystenloosheid maakt dus den indruk van een zeer principieele eigenschap. Men moet hierbij echter bedenken, dat er ook geen myxobacteriëngeslachten zijn, waar de vorming van vruchtlichamen dermate gereduceerd en primitief is, als bij de myxococcen en speciaal bij de cytophagen, bij welke de „sterren" nauwelijks nog als vruchtlichamen beschouwd kunnen worden. Het behoeft dan ook niet te verwonderen, dat juist onder de cytophagen soorten voorkomen, die het vermogen tot cystenvorming geheel verloren hebben. Bovendien mag men ook niet vergeten, dat verreweg de meeste bekende myxobacteriën als zichtbare vruchtlichamen gevonden en herkend zijn en daaruit gekweekt werden, zoodat men onbewust altijd slechts dié soorten isoleerde en beschreef, welke goed ontwikkelde vruchtlichamen vormen. Het is echter niet uitgesloten, dat er bovendien nog talrijke primitiever ontwikkelde myxobacteriënsoorten voorkomen, die geen gecompliceerden levenscyclus vertoonen en evenals de cystenlooze cytophagen slechts in het vegetatieve wormpjes- of staafjesstadium voorkomen. Bij het slanke, puntige type van de myxobacteriën, waartoe ook de cytophagen gerekend kunnen worden, werd dit vermoeden reeds bewaarheid. Ik vond nl. toevallig myxobacteriën, die morphologisch precies op cytophagen geleken, maar geen gespecialiseerde stofwisseling hadden en cellulose niet konden aantasten. Zij leefden van andere organische verbindingen: suikers, polysacchariden, proteïnen, enz. Deze organismen, die hieronder nader omschreven zullen worden, vormen ook geen cysten en geen vruchtlichamen. Zij lijken zoo zeer op cytophagen, dat men hen terecht „Cytophagen, die geen cellulose splitsen" zou kunnen noemen. Maar met evenveel recht kan men hen ook rekenen tot myxococcen, die geen cysten en vruchtlichamen bezitten.

Cytophaga-soorten, die geen cellulose splitsen.

Het eerste van deze organismen vond ik bij het isoleeren van een zeer langzaam groeiende, veeleischende *Cellvibrio*-soort uit normalen mineralen grond van de Wieringermeer. Op de celluloseagarplaten vormden zich nl. o. a. oplossingsvelden, die overigens volkomen geleken op die van cystenlooze cytophagen, in het midden echter

duidelijk een zichtbare kolonie vertoonden. Bij nauwkeurig onderzoek en herhaalde overentingen bleek het, dat men hierbij met mengkoloniën te doen had, bestaande uit de betreffende *Cellvibrio*-soort en uit een *Cytophaga*. Deze laatste bleek echter na isoleering niet in staat te zijn de cellulose aan te tasten. Zij vormde slechts intensief vuil-geel gekleurde troebele koloniën, die trechtervormig in de agar inzonken. De agar werd sterk ontleed en half vervloeid, doch de cellulose bleef onaangetast. De groei op celluloseagar was maar zwak; door toevoeging van 0.05 % druivensuiker werd hij echter aanzienlijk verbeterd. Op cellulosevrije agar van overigens dezelfde samenstelling groeide het organisme even goed als bij aanwezigheid van cellulose. In dezen helderen voedingsbodem kon men de koloniën veel beter waarnemen. In het midden van de koloniën bevond zich de grootste opeenhooping van cellen; naar de randen toe nam het aantal geleidelijk af. (Fig. 62). De lengte van de wormpjes varieerde tusschen 2.5 en 5.5 μ en de dikte tusschen 0.2 en 0.3 μ. De vorming van cysten kon op geen enkelen voedingsbodem worden waargenomen; de wormpjes bleven steeds onveranderd, totdat zij langzamerhand door 't ouder worden der cultures afstierven. Een goed ontwikkelde „ster"-vorming kon ik ook niet waarnemen; opeenhoopingen tot kluwens kwamen in jonge cultures wel regelmatig voor, maar bij 't ouder worden vielen zij weer uiteen. Bij het onderzoek der physiologische eischen bleek, dat deze myxobacterie voornamelijk op koolhydraten met groot moleculair gewicht en op proteïnen goed groeide, doch van hoogere concentraties van oplosbare suikers een nadeelige werking ondervond. Haar optimale ontwikkeling bereikte zij op eiwit-(albumine) of peptonhoudende agar met 0.1 % druivensuiker en compostextract. Ook op gelatine ontwikkelde zij zich uitstekend en brak de gelatine daarbij sterk af, zoodat de entstrepen diepe inzinkingen werden; volledige vervloeiing trad echter niet op. Behalve agar heb ik van de hoogere koolhydraten alleen amylum gebruikt. De ontwikkeling was hierop eveneens zeer goed. Zonder op bijzonderheden in te gaan, kan dus worden gezegd, dat deze myxobacterie niet kieskeurig is. Zij is in elk geval niet opvallend gespecialiseerd, maar geeft wel de voorkeur aan onoplosbare, grootmoleculaire verbindingen, echter niet aan cellulose. Op de gewone bacteriologische voedingsbodems (vleeschwater-glucose, glucose-pepton, enz.) kreeg ik geen ontwikkeling. Ook kon slechts een zwakke groei verkregen worden in verdunde, waterige suikeroplossingen met de vereischte zouten en stikstof.

Eenigen tijd later isoleerde ik uit een tuincomposthoop een tweede dergelijke myxobacterie, die eveneens als een begeleidend organisme van een cellulosesplitser optrad. Deze ontwikkelde zich, in tegen-

stelling tot de zooeven beschreven soort, het gunstigst juist op oplosbare suikers, doch haast niet op de gewone cellulose-agar. Door haar voorkeur voor hoogere suikerconcentraties kon deze soort op alle gewone bacteriologische voedingsbodems gekweekt worden, zoowel op vleeschwater-glucose als op gistextract-pepton en op agar even goed als op gelatine of in vloeibare voedingsbodems. Gelatine werd sterk aangetast, maar er trad wederom geen volledige vervloeiing op. Ook agar en stijfsel werden eenigermate ontleed, want de koloniën vormden in de agar duidelijk kuiltjes en op amylumagarplaten vormden zich zones, die bij de J-reactie roodachtig-lila in plaats van blauw gekleurd waren. Als eenige bron van energie waren deze beide polysacchariden echter niet voldoende.

Morphologisch is ook dit organisme een typische cystenlooze *Cytophaga*, zelfs een van de best ontwikkelde en grootste soorten, die door haar snellen groei en de karakteristieke en fraai beweeglijke cellen zich uitstekend voor morphologische studiën leent. De grootte van de jonge cellen kan men gemiddeld op 3 tot 7 μ lengte en 0.3 tot 0.4 μ dikte stellen (fig. 63). Bij 't ouder worden van de cultuur worden de cellen korter en aanmerkelijk kleiner, hetgeen overigens een eigenschap is, die aan alle cytophagen eigen is.

Tenslotte vond ik kort geleden bij de analyse der microflora van het slik van een rivierbodem (monding van den IJsel) weer een vertegenwoordiger van deze myxobacteriën-groep. Deze kwam hier voor als het begeleidende organisme van een actieve cystenlooze *Cytophaga*. Zij liet zich op cellulosevrije agar gemakkelijk rein kweeken. Dezen derden vertegenwoordiger heb ik nog onvoldoende onderzocht. Hij schijnt ongeveer gelijk aan den eersten te zijn, doch onderscheidt zich hiervan in de kleur — grijsbruin — en is ook iets kleiner (3 à 4 μ lang bij nauwelijks 0.2 μ dik), (fig. 64) [1].

b. Polyangiden.

Zooals reeds bij het litteratuuroverzicht op blz. 24—26 werd medegedeeld, kent men sedert eenige jaren behalve de cytophagen ook andere celluloseontledende myxobacteriën, nl. van het type met stompe einden, want zoowel de KRZIEMIENIEWSKI's (104, 105) als ook IMŠENETSKI en SOLNTZEWA (63) hebben verscheidene van zulke organismen beschreven en overtuigend aangetoond, dat zij in staat zijn tot celluloseontleding. In het geheel zijn tot nu toe niet minder

[1]) Na het beëindigen van dit werk kreeg ik ter inzage enkele publicaties van R. Y. STANIER, die eveneens verscheidene dezer organismen geïsoleerd heeft. Zijn ervaringen komen grootendeels overeen met de mijne.

dan 10 soorten van zulke myxobacteriën beschreven. Zij lijken echter allen veel op elkaar en behooren stellig tot één of tot nauw verwante soorten. Ook ik vond bij de analyse van de cellulose ontledende microflora van compost en van normalen, basenrijken grond reeds sedert 1935 herhaaldelijk zonderlinge celluloseontleders, die zeer langzaam groeiden en daarbij door de ongewone gedaante hunner cellen opvielen. Aanvankelijk bemerkte ik niet, dat zij tot de myxobacteriën behoorden, maar toen ik bij nauwkeurige beschouwing de vorming van „vruchtlichamen" zag, kon ik al spoedig hun juiste plaats in het systeem vaststellen. Te zelfder tijd verschenen ook de bovengenoemde werken die mijn zienswijze bevestigden. Mijn polyangiden behooren in dezelfde groep als de daar beschrevene. Wellicht zullen verscheidene hunner soorten zelfs identiek blijken te zijn met de mijne. In enkele opzichten echter onderscheiden zich mijn organismen toch duidelijk van de overige; het is dus niet uitgesloten, dat men hier toch met enkele nieuwe soorten te doen heeft. Voorloopig heb ik van elke naamgeving aan mijn stammen afgezien, daar de geheele classificatie der myxobacteriën nog zeer weinig vast staat.

Systematiek.

Er zijn sedert de ontdekking der myxobacteriën in 1892 weliswaar verscheidene indeelingen voorgesteld; zij zijn echter voor het groote deel gegrond op de macroscopisch zichtbare kenmerken en op den bouw der „vruchtlichamen", zoodat zij zeer eenzijdig zijn. Voor een volledig overzicht der classificatie zij verwezen naar de speciale litteratuur over myxobacteriën; hier kunnen alleen de voornaamste punten in 't kort samengevat worden. De oudste indeeling is van THAXTER (180). Hij onderscheidde slechts 3 geslachten: *Myxococcus* met kogelronde microcysten en puntige op cytophagen gelijkende cellen, *Polyangium* met langwerpige op de vegetatieve cellen gelijkende microcysten en ongesteelde of in het substraat zich vormende „vruchtlichamen" en *Chondromyces*, gelijkende op *Polyangium*, echter met op stelen (*cystophoren*) zittende „vruchtlichamen". Toen men meer vertegenwoordigers der myxobacteriën leerde kennen, moest dit al te eenvoudige stelsel tenslotte verlaten worden. Een voorloopig bruikbaar, maar ook volstrekt kunstmatig opgebouwd stelsel werd daarna door JAHN (68) opgesteld. Hij onderscheidt 4 families, nl.:

1. *Archangiaceae* zonder goed gevormde vruchtlichamen van constanten vorm en met microcysten, die zich slechts onbelangrijk van de vegetatieve cellen onderscheiden.
2. *Sorangiaceae* met microcysten zooals bij de vorige familie. De vruchtlichamen bestaan uit echte macrocysten met een stevigen

wand, waarbij de grootere z.g. „primaire cysten" uit vele kleinere z.g. „secundaire cysten" opgebouwd zijn. De „secundaire cysten" liggen zóó dicht ineengedrongen, dat zij elkaar afplatten.

3. *Polyangiaceae*, ongeveer gelijk aan de vorige familie; de „secundaire cysten" zijn echter rond en liggen vrij naast elkaar.
4. *Myxococcaceae* met puntige cellen. Bij de inkapseling vormen zich kogelronde microcysten in zeer primitieve „vruchtlichamen". De families 1, 2 en 3 hebben stompe, staafvormige cellen.

Nog later werden door de KRZIEMIENIEWSKI's (100) twee grondtypen van myxobacteriën onderscheiden, nl. de *puntige* en de *stompe*, waarbij dus vooral gelet wordt op den vorm der jonge vegetatieve cellen. Lang niet alle onderzoekers zijn echter met de nieuwe voorstellen meegegaan, zoodat voorloopig nog een onontwarbare stelselloosheid heerscht, welke m. i. ten deele haar grond daarin vindt, dat verreweg de meeste myxobacteriën eerst gevonden en beschreven werden in het fructificeerende stadium.

Met het oog op het bovenstaande durf ik voorloopig de door mij geïsoleerde celluloseontleders niet in eenig geslacht onder te brengen. Daar zij duidelijk stomp zijn en ook zeer groote, nier- tot framboosvormig opgebouwde vruchtlichamen bezitten, vermoed ik, dat zij behooren tot de *Sorangiaceae* of de *Polyangiaceae*; ik wil ze voorloopig echter slechts *Polyangiden* noemen; hierbij gebruik ik de benaming, welke JAHN voor de geheele orde der myxobacteriën heeft voorgesteld, als aanduiding van het gedeelte ervan, dat stompe cellen heeft. Voor mij is het slechts van belang te weten, dat men dus in twee volstrekt verschillende groepen der myxobacteriën celluloseontleders heeft aangetroffen: onder de puntige de cytophagen, en onder de polyangiden de zoo juist genoemde organismen van IMŠENETSKY en SOLNTZEWA, van de KRZIEMIENIEWSKI's en van mij. Beide groepen zijn wijd verspreid en komen in daartoe geschikte grondsoorten in zoo groote hoeveelheid voor, dat zij zeker beide van primair belang zijn bij de ontleding der cellulose in de natuur. In hun aard zijn zij echter zeer verschillend.

Morphologische kenmerken.

Mijn polyangiden zijn in jonge, krachtige cultures zeer lange en slanke staafjes, die dikwijls meer of minder gebogen tot S-vormig gekromd zijn en daarom soms zelfs een op cytophagen gelijkenden vorm aannemen. De celeinden zijn echter steeds volkomen stomp, dikwijls zelfs iets verdikt. De afmetingen zijn in dit stadium ongeveer 2 tot 6 × 0.25 tot 0.3 μ (fig. 65). Deze afmetingen hebben betrekking op celluloseagarcultures met compostextract. Op suikerhoudende media worden de cellen echter nooit zoo lang. In de agar krommen de cellen

zich veel sterker dan in een vloeibaren voedingsbodem, zoodat men daarbij somtijds den indruk van in elkaar gestrengelde kluwens krijgt. Reeds zeer spoedig beginnen de cellen zich te verkorten en te verdikken, en nemen daarbij ook een veel onregelmatiger vorm aan. Dit proces kan, afhankelijk van de omstandigheden zeer verschillend verloopen. Opvallend is het echter, dat het chromatine zich daarbij in de cellen steeds meer of minder concentreert en zich ongeveer op dezelfde wijze verdeelt als bij de inkapseling van cytophagen (fig. 66 en 67). Men zou ook hier van een cystenvorming kunnen spreken, echter leidt de verkorting bij de polyangiden nooit tot regelmatige, volkomen ronde microcysten. De verkorting en verdikking der vegetatieve cellen gaat bij de polyangiden met celdeelingen gepaard, zoodat de lange, slanke, jonge cellen eerst in verscheidene deelen uiteen vallen, voordat deze laatste zich tot zeer korte en dikke lichamen vervormen (fig. 68). Het insnoeren en doorbreken der lange cellen geschiedt steeds op de plaatsen der chromatineconcentratie, terwijl de chromatinevrije, slecht kleurbare deelen van de cellen dik, ovaal of bijna rond opzwellen. Somtijds kon ik een analoog verloop ook bij de cytophagen waarnemen. Een klein deel der wormpjes vormde namelijk ook daar spoeltjes, welke ter plaatse van de chromatineophooping eerst ingesnoerd schenen en langzamerhand zelfs geheel doorbraken, zoodat uit één spoeltje tenslotte twee microcysten ontstonden. Bij de cytophagen is dit echter een uitzondering, terwijl de polyangiden deze deeling der lange cellen bij het inkapselen steeds doormaken. Bij dit samengestelde verloop der celdeeling en inkapseling ontstaan in de agar, waarin de afzonderlijke cellen meer of minder gefixeerd zijn, zeer zonderlinge en voor deze organismen karakteristieke groeivormen, waarbij de door de deeling ontstane stukken der cellen zeer ongelijkmatig van vorm en grootte zijn en door hun opzwellen in zekeren zin langs elkaar glijden en een bepaalden hoek ten opzichte van elkaar vormen. Men krijgt daardoor figuren, welke somtijds herinneren aan het voor proactinomyceten en corynebacteriën karakteristieke „Winkelwachstum" (volgens ØRSKOV (127)). De zoo ontstane „microcysten" zijn meestal 1.5 tot 3.5 μ lang en 1 tot 2 μ dik, terwijl zij zich in zeer oude cultures vervormen tot bijna ronde lichamen van ongeveer 2.5 μ in doorsnede.

Bij het geheele zooeven beschreven proces der inkapseling van vrij in het substraat liggende cellen zou men zich de vraag kunnen stellen of het hier wel een werkelijke microcystenvorming betreft, of misschien slechts een uiting van een ouderdomsverschijnsel, dus een involutie. De veranderingen, welke het chromatine bij dit proces ondergaat, pleiten echter niet voor deze laatste onderstelling en ook de omstandig-

heid, dat de dikker wordende cellen in het substraat zich steeds tot kleine groepen („sterren") vereenigen, wijst op een verloop, dat tenminste in zijn aanleg als microcystenvorming opgevat moet worden. Deze kleine groepen of klompjes, die in oudere koloniën in de agar steeds zichtbaar worden, hebben ook IMŠENETSKY en SOLNTZEWA (63) in de war gebracht, want zij beschrijven ze als een beginnende vorming van „vruchtlichamen", zonder er zich van te hebben overtuigd of deze kleine vormsels ooit tot groote vruchtlichamen uitgroeien. Dat blijkt echter niet het geval te zijn: de groote, echte macrocysten ontstaan geheel anders en worden van meet af aan reeds als groote en zeer dichte opeenhoopingen van in den beginne nog jonge en slanke cellen in het inwendige der koloniën aangelegd, nimmer echter aan den omtrek der koloniën, waar juist de kleine, involutieve groepen het meest aangetroffen worden (fig. 69 en 70).

Volgt men in een kolonie, in een helderen agarvoedingsbodem of in een hangenden druppel het ontstaan van een echte macrocyste, dan ziet men eerst alleen een plaatselijke opeenhooping van de vegetatieve cellen, welke in den beginne zeer onscherpe, onduidelijke omtrekken heeft. Na eenigen tijd wordt een gaandeweg duidelijker wordende grenslaag zichtbaar, die op den duur de cystenwand wordt. Binnen deze laag kan men verder niets meer onderscheiden, daar alles zich verdicht tot een compact, ondoorzichtig lichaam. De buiten de grenslaag aanwezige cellen worden op den duur óf in de laatste opgenomen, óf zij verdeelen zich weer in het substraat, zoodat de ontstane macrocyste dan geheel vrij in het substraat ligt en geen dichten zwerm van vegetatieve cellen meer om zich heen heeft (fig. 71). Verdere groei is dan niet meer mogelijk. Dikwijls ontstaan echter in grootere koloniën en in gunstige omstandigheden samengestelde macrocysten, die soms tot zeer groote (tot 1 à 2 mm) framboos- of niervormige lichamen uitgroeien (fig. 72 en 73). In deze gevallen verdwijnt, na de vorming van de eerste grenslaag, de dichte zwerm van vegetatieve cellen om de jonge macrocyste niet, maar verdicht zich nog meer, hoofdzakelijk aan één der zijden van de cyste. En spoedig vormt zich daar een nieuwe grenslaag, welke een tweede — tegen de eerste aanliggende — macrocyste omsluit. En dat kan zich nog vele malen herhalen, totdat de kracht der kolonie uitgeput is. Zulke samengestelde macrocysten zijn soms heel verschillend opgebouwd: men treft heel stijve, compacte vormen aan, waarin de afzonderlijke macrocysten betrekkelijk groot zijn en zich tot meer of minder ronde, gladde, in elkaar gedrongen lichamen vereenigd hebben (fig. 71 en 72), naast veel lossere, uit kleinere, afzonderlijke deelen opgebouwde vormen. Beide typen komen vaak in dezelfde kolonie naast elkaar voor (fig. 74).

De afmetingen der enkelvoudige en complexe macrocysten zijn zoo variabel, dat vaste maten niet opgegeven kunnen worden. Hoogstens zou medegedeeld kunnen worden, dat de afzonderlijke cysten niet kleiner zijn dan ongeveer 10 μ in doorsnede. De grootste door mij waargenomen samengestelde cysten echter bereikten ongeveer 2 mm in doorsnede.

Een vaste wand of omhulling der cysten, die uit verhard, structuurloos slijm bestaat, heb ik bij mijn polyangiden niet kunnen waarnemen. De „grenslaag" bestond steeds slechts uit zeer vast in elkaar gekleefde cellen, wat zoowel aan de korreligheid van haar oppervlakte, als ook aan de eveneens korrelige structuur der scheurranden te zien is (fig. 75). Toch is deze grenslaag vrij hard en taai, zoodat men haar wel als een echte wand kan beschouwen. Men moet steeds flink op het dekglas drukken, om een daaronder liggende macrocyste stuk te kunnen krijgen. Wordt ze stukgedrukt, dan valt de wand uiteen in hoekige brokstukken (fig. 76).

De in de macrocysten ontstane „sporen" (= microcysten) zijn de echte z.g. „sporen" der polyangiden, want de buiten de cysten ontstane microcysten, zooals ze boven beschreven zijn, kunnen niet als echte sporen beschouwd worden. De sporen in de macrocysten zijn nl. veel kleiner en slanker dan die, welke buiten de cysten gevormd worden. Bij het stukdrukken der macrocysten worden zij bij massa's, als geheele wolken er uit gedrukt. Aanvankelijk zijn ze voor het grootste deel tot dichte slijmmassa's aan elkaar gekleefd. Na enkele minuten ziet men echter meer en meer sporen zich van de slijmmassa los maken en in Brownsche beweging geraken, zoodat de stuk gedrukte cyste spoedig door een zwerm van zulke sporen omgeven is (fig. 76). Men ziet daarbij ook duidelijk, dat lang niet alle cellen in het inwendige van de cyste vervormd zijn tot de verdikte sporen met de karakteristieke chromatineconcentraties: er zijn ook talrijke slanke en zich gelijkmatig kleurende cellen, die volkomen op de normale, vegetatieve cellen gelijken, alleen iets korter zijn, namelijk ongeveer 1.5 tot 3.5 μ lang, bij een normale dikte van 0.25 tot 0.3 μ. Daar deze niet opgezwollen cellen, welke reeds vaak bij de myxobacteriën in de cysten opgemerkt en beschreven werden, dikwijls iets gekromd zijn, zien zij er net uit als kleine, slanke vibrionen. De eigenlijke sporen zijn in het algemeen 2 tot 3 μ lang en 0.5 tot 1.0 μ dik. Zij zijn meestal meer of minder ovaal tot stomp-spoelvormig en vertoonen in het inwendige een zeer onregelmatige verdeeling van het chromatine (fig. 77).

Van een sterk verhoogd weerstandsvermogen van de „sporen" kan bij de polyangiden niet gesproken worden. Evenals bij de cytophagen onderscheiden zich hierin nòch de „sporen" uit de cysten,

nòch de buiten de macrocyste ontstane microcysten duidelijk van de vegetatieve cellen. Op zichzelf is de weerstand tegen hitte bij de polyangiden vrij groot. Ik kon ze 10 minuten lang tot op 55° C verhitten, zonder eenige beschadiging op te merken. Den luchtdrogen toestand konden zij wekenlang uitstekend verdragen. Zij kunnen zich dus met stof snel en ver verspreiden.

Uit de algemeene litteratuur was mij bekend, dat de vorming van de macrocysten en bij de hooger ontwikkelde myxobacteriën ook van de geheele „vruchtlichamen" zeer sterk bepaald wordt door den voedingsbodem. De KRZIEMIENIEWSKI's (104) hebben bij hun celluloseontledende soorten hetzelfde opgemerkt. Meestal ontwikkelden zich de „vruchtlichamen" het best op niet gesteriliseerden mest of op mesthoudende substraten. Daarom was het niet uitgesloten, dat de boven aangegeven ontstaanswijze der macrocysten slechts voor de „onnatuurlijke" celluloseagar geldt, terwijl er op meer natuurlijke substraten geheel andere vruchtlichamen zouden ontstaan. Ik entte mijn cultures dus ook op verscheidene andere voedingsbodems, zoowel op z.g. „natuurlijke" (mest, aarde, boschhumus), als ook op de gebruikelijke bacteriologische media (vleeschagar, gistextract-glucose, enz.). De vorming der macrocysten bleek daarbij ook bij mijn stammen duidelijk afhankelijk te zijn van den voedingsbodem; hun vorm en wijze van ontstaan was echter in beginsel steeds dezelfde. De grootste en weligste macrocysten vormden zich op gesteriliseerden konijnenmest, waar ik somtijds vruchtlichamen van 2 tot 3 mm grootte aantrof. Maar ook de geconcentreerde bacteriologische voedingsbodems waren gunstig voor hun vorming; zij ontwikkelden zich daarop nl. al zeer vroeg en groeiden op tot zeer groote lichamen. Het traagst verliep de vorming op de armere, synthetische substraten, zooals op de celluloseagar. Bovendien vormden zich hier dikwijls vele kleine in plaats van enkele groote cysten.

De vorm der koloniën in de celluloseagar en de vorming van de cysten hierin is overigens zeer kenmerkend en levert ook enkele gegevens voor soortaanduidingen. Ik kon nl. een paar verschillende kolonievormen onderscheiden. Er moet dadelijk op gewezen worden, dat mijn polyangiden bij de kolonievorming zich individueel in de agar boren en deze niet splijten. Het indringen in de agar kan zeer traag geschieden, zoodat slechts kleine, compacte koloniën ontstaan; het kan echter ook veel sneller verloopen, waarbij zich groote, maar veel doorzichtigere koloniën vormen. In de compacte, kleine koloniën vormen de macrocysten zich meestal als een zeer dichte, groote klomp in het midden — soms is het zelfs slechts één samengestelde, centrale cyste; in de breede koloniën vindt men daarentegen naast een kleinere,

centrale cyste (of groep van cysten), nog vele zeer kleine cysten, welke òf vrij onregelmatig door de geheele kolonie verspreid zijn, òf zich tot een concentrischen gordel groepeeren op eenigen afstand van den rand der kolonie.

Dit verschil in kolonietype mag niet altijd als soort-kenmerk worden beschouwd; men treft de verschillende koloniën soms ook naast elkander in reine cultures van één soort aan. Ook overgangsvormen zijn niet zeldzaam. Het hangt dus mede van de uitwendige omstandigheden af, welk kolonie-type tot ontwikkeling komt. Hoe armer het substraat aan voedingsstoffen is, des te breeder en losser worden de koloniën. In de schrale voedingsbodems vormt zich een zeer groote zwerm van vegetatieve cellen, waarin eerst veel later de kleine macrocysten ontstaan. Na hun vorming blijft echter het substraat toch nog troebel, daar vele cellen ook dan nog buiten de cysten blijven en gaandeweg de bovenbeschreven, buiten de cysten ontstaande sporen vormen. Dit laatste geschiedt hoofdzakelijk aan den omtrek der kolonie, waar de meeste cellen zich verzamelen, zoodat zich daar een donkere rand vormt.

De vier verschillende stammen der cellulose ontledende polyangiden, welke ik geïsoleerd heb, gelijken veel op elkaar, zoodat zij nauwelijks als afzonderlijke soorten kunnen gelden. Microscopisch zijn zelfs in het geheel geen verschillen waar te nemen. Stam IV heeft alleen iets kortere en dikkere vegetatieve cellen dan de andere stammen. Ook de kleur is bij allen dezelfde, nl. vuil oranje tot geel. Slechts in de structuur der agarkoloniën en in de ontleding van de cellulose zijn eenige verschillen aanwezig: de stammen I en II vormen op de schrale celluloseagar, waar zij breed uitloopende koloniën bezitten, steeds een duidelijken ring van talrijke kleine macrocysten (fig. 78 en 79), of in elk geval zeer veel kleine cysten tot nabij den rand der kolonie (fig. 80); stam III daarentegen gaat over het geheel zeer moeilijk tot vorming van macrocysten over; gebeurt dit echter wel, dan vormt zich slechts één groote in het midden der kolonie (fig. 81); stam IV wederom heeft naast een groote centrale cyste steeds nog een beperkt aantal middelgroote cysten om de centrale heen gegroepeerd, somtijds tot vrij ver naar buiten toe (fig. 82). De stammen I, II en IV zijn sterke celluloseontleders, die duidelijke oplossingsvelden in de celluloseagar te voorschijn roepen, waarbij stam IV het sterkst werkzaam is (fig. 83); stam III daarentegen ontleedt de cellulose veel zwakker en is over het geheel genomen de traagste en minst opvallende vertegenwoordiger.

Voedingsphysiologische eigenschappen.

De voedingsphysiologie van de cellulose ontledende polyangiden heb ik slechts zeer oppervlakkig onderzocht. Het weligst en snelst

groeien zij op veelzijdig samengestelde, niet te voedingsrijke media, die oplosbare koolhydraten bevatten. De concentratie van deze laatste mag echter niet te hoog zijn. Op de zeer geconcentreerde, gebruikelijke bacteriologische voedingsbodems is hun ontwikkeling nog mogelijk, maar toch reeds zeer abnormaal: de vegetatieve ontwikkeling is geheel teruggedrongen en er vormen zich eigenlijk alleen groote, samengestelde macrocysten. Maar ook op zeer schrale voedingsbodems, zoo b.v. op leidingwater-agar zonder eenig organisch bestanddeel, is een, zij het ook zeer trage, ontwikkeling mogelijk. Deze polyangiden hebben dus een opvallend groote speling in hun voedingseischen.

Specifiek op cellulose aangewezen zijn zij niet. Toch heeft de ontleding der cellulose ook bij gelijktijdige aanwezigheid van oplosbare koolhydraten plaats. Door hun talrijkheid en algemeene verspreiding in basenrijke gronden hebben zij dan ook ongetwijfeld een groote beteekenis bij de ontleding der cellulose in de natuur. In de cellulose-agar hoopen zij zich steeds op rondom daarin voorkomende grovere cellulosedeeltjes, zooals onopgeloste vezeltjes. Deze worden dan geheel ontleed en op hun plaats vormen zich dichte celmassa's, waarin dan meestal ook macrocysten ontstaan (fig. 84 en 85).

Zeer karakteristiek is hun trage, doch lang aanhoudende groei. In de cellulose-agarplaten verschijnen de koloniën meestal eerst na 5 tot 7 dagen. Eerst op ongeveer twee weken oude platen worden de koloniën duidelijker en grooter en nemen zij de karakteristieke vormen aan. De groei der koloniën zet zich echter in niet te dicht geënte platen nog zeer lang voort, soms wel twee tot drie maanden.

In tegenstelling tot de mededeeling van IMŠENETSKY en SOLNTZEWA (63) bleken mijn polyangiden niet in staat te zijn stijfsel te ontleden en ook de agar tastten zij niet aan. Van de onoplosbare polysacchariden kunnen zij alleen de cellulose gebruiken. Van de oplosbare kunnen zij daarentegen zoowel de dextrose als ook de saccharose ontleden en ook op manniet gedijen zij voortreffelijk.

Zeer opvallend is hun wisselvalligheid ten aanzien van het vermogen om cellulose te ontleden. Mijn cultures splitsen nl. altijd weer mutilaten af, die de cellulose niet of slechts zwak aantasten. Ook volstrekt reine cultures (ééncelcultures) vertoonen deze eigenschap.

Als stikstofbron kunnen de polyangiden vrijwel alles gebruiken, zoowel NO_3- als NH_4-verbindingen en ook organische stoffen (pepton, albumine, asparagine). Deze laatste zijn zelfs bijzonder gunstig. Het is echter soms niet gemakkelijk vast te stellen, of het de stikstofbron zelf betreft, of de eraan gekoppelde groeistoffen en spoorelementen, want de polyangiden behooren tot de microben, die op zuiver synthetische substraten nauwelijks kunnen groeien. Een normale ontwikkeling

kon ik op de celluloseagar dan ook slechts verkrijgen, wanneer daaraan compostextract werd toegevoegd. En nòg beter gedijen zij in gemeenschap met andere microben. Ik gebruikte daartoe in den regel een actinomyceet, die dan ergens op de plaat als punt of streep werd aangebracht.

De voor hun ontwikkeling gunstigste zuurgraad van den voedingsbodem werd door mij niet nauwkeurig vastgesteld; de omstandigheid echter, dat ik hen slechts in ongeveer neutrale gronden aangetroffen heb, wijst er op, dat zij zich het best bij neutrale tot zwak alkalische reactie ontwikkelen.

§ 3. ACTINOMYCETALES.

Deze klasse van microben is een der belangrijkste voor de celluloseontleding. Voordat ik tot de beschrijving van de voornaamste celluloseontleders onder hen overga, moet echter eerst de vraag onderzocht worden, wat men eigenlijk onder actinomyceten verstaan moet en welke organismen wel en welke niet daartoe gerekend kunnen worden. De benaming „actinomyceten" is in den loop van den tijd gedegradeerd tot een praktijkterm en is dus niet exact. In den loop der tijd zijn verschillende indeelingen der actinomyceten opgesteld. Voornamelijk ØRSKOV (127, 128) heeft daarbij pionierswerk verricht. Zijn indeeling is dan ook in beginsel vrij algemeen aanvaard. In de laatste jaren heeft JENSEN in een reeks van publicaties (70, 71, 73, 74, 75, 77, 78) ØRSKOV's stelsel nog verder uitgewerkt en aan de bodembewonende actinomyceten aangepast. Zijn systeem, dat ook ik in hoofdzaak zal volgen, komt tenslotte neer op het volgende: de geheele orde der *Actinomycetales* wordt in twee families gesplitst:

1. Sporenvormende: *Actinomycetaceae.*
2. Sporenlooze: *Proactinomycetaceae.*

Bij de *Actinomycetaceae* onderscheidt hij dan overigens slechts twee geslachten:

I. *Actinomyces* — met de in rijen, als kralen, gevormde sporen.
II. *Micromonospora* — met alleenstaande, knotsvormige sporen.

De *Proactinomycetaceae* deelt hij, in afwijking van ØRSKOV ook in twee geslachten in, al naar gelang zij een betrekkelijk rijk mycelium vormen, voordat dit laatste in stukken uiteenvalt, of slechts een zeer armelijk ontwikkeld, nauwelijks zichtbaar mycelium. De eerste noemt JENSEN *Proactinomyces*, de laatste *Mycobacterium* of *Corynebacterium*, al naar gelang zij zuurvast zijn of niet. Ofschoon ØRSKOV in beginsel gelijk heeft, wanneer hij betoogt, dat de vorming van meer of minder mycelium geen principieel en ook geen constant kenmerk is, geloof

ik toch, dat een indeeling, zooals JENSEN haar op grond van deze eigenschap opgesteld heeft, volstrekt toelaatbaar is, daar overgangsvormen betrekkelijk zeldzaam zijn, en bovendien de echte proactinomyceten steeds eerst een wijd vertakt mycelium met zeer lange uitloopers vormen, voordat zij in segmenten uiteenvallen; de echte mycobacteriën groeien echter steeds direct al meer of minder als bacteriën en vormen slechts onbelangrijke mycelia, die nauwelijks méér zijn dan lange, vertakte vormen van bacteriën. Men raadplege hiervoor de mededeelingen van GRAY en THORNTON (52) en TOPPING (186, 187).

Ofschoon ik zelf geen doelbewuste onderzoekingen over de classificatie der actinomyceten heb gedaan heb ik toch zóó vele cellulose ontledende actinomyceten onderzocht, dat ik op grond van de daarbij verzamelde ervaring nog eenige aanvullingen op het systeem van JENSEN wil voorstellen. Ten eerste is het mij opgevallen, dat men onder de vertegenwoordigers der *Micromonosporae* nog twee typen onderscheiden kan, nl. soorten, welke de sporen onregelmatig verspreid in het substraat vormen in betrekkelijk gering aantal, naast soorten, die rijker zijn aan sporen, maar deze hoofdzakelijk aan de oppervlakte van het substraat afscheiden, aan de einden der loodrecht op de oppervlakte staande takken.

Bij de laatste groep, welke wellicht als schakel tusschen *Micromonospora* en *Actinomyces* moet worden opgevat, vormen zich op den duur geheele sporenkorsten op de koloniën.

Een andere waarneming is, dat de vorming van de echte sporen bij het geslacht *Actinomyces* van JENSEN niet alleen toevallig bij sommige soorten in het substraat, bij andere aan luchthyphen geschiedt, doch dat deze beide typen zich ook door hun geheele uiterlijk en groeiwijze onderscheiden. Bij eenige oefening kan men deze beide typen zelfs macroscopisch herkennen. Daarom schijnt het mij volkomen geoorloofd, deze twee typen tot zelfstandige eenheden in de classificatie te bevorderen.

Ten slotte zou ik voorstellen die soorten der echte actinomyceten, welke zeer lange, staafjesvormige sporen vormen (ik vond ze onder de celluloseontledende soorten herhaaldelijk) van de overige soorten met ronde of ovale sporen te onderscheiden, als een constante, morphologische groep.

De uiteindelijke indeeling der *Actinomycetales* zou dus als volgt kunnen zijn:

Familie I — *Actinomycetaceae.*

Genus 1. *Actinomyces.*

Sub-genus *a.* — Actinomyceten met de vorming van de karakteristieke ronde tot ovale sporen, die als kralensnoeren aan het einde van lucht-hyphen gevormd worden. Deze hyphen zijn vaak als spiralen opgerold.

Sub-genus *b.* — Actinomyceten, die geen luchthyphen vormen, doch waarvan sommige hyphen in het substraat opzwellen en in sporen uiteenvallen. Dit geschiedt niet aan het einde van een hyphe, doch middenin over een bepaald traject.

Sub-genus *c.* — Actinomyceten, die karakteristieke volkomen rechte, stijve lucht-hyphen vormen naast en tusschen de dunnere, gewone. Deze rechte hyphen vallen uiteen in lange brokstukken, die als sporen fungeeren. Op de dunne gekromde hyphen ontstaan geen sporen.

Genus 2. *Micromonospora.*

Sub-genus *a.* — Omvat de sporenarme soorten, die hun sporen in het substraat vormen.

Sub-genus *b.* — Omvat de sporenrijke soorten, waarbij de sporen aan het oppervlak van het substraat ontstaan aan de uiteinden van loodrecht op dat oppervlak gerichte hyphen.

Familie II — *Proactinomycetaceae.*

Genus 1. *Proactinomyces.*

Genus 2. *Mycobacterium* (*Corynebacterium*).

Ik heb er vooreerst nog van afgezien de opgestelde subgenera te benoemen totdat er meer gegevens ook uit de niet cellulosesplitsers verzameld zijn.

Beschouwt men thans de celluloseontleding van de actinomyceten, dan kan dadelijk opgemerkt worden, dat dit vermogen onder deze organismen zeer algemeen is. Dat de echte actinomyceten — naar de moderne classificatie dus de vertegenwoordigers van het geslacht *Actinomyces* — dikwijls celluloseontleders zijn, is reeds zoo vaak betoogd, dat het overbodig is, alle hierop betrekking hebbende publicaties te vermelden. LIESKE (108), WAKSMAN (193, 204) en JENSEN in verscheidene zijner werken hebben deze eigenschap der actinomyceten zelfs stelselmatig onderzocht. Maar ook onder de soorten van het geslacht *Micromonospora* heeft JENSEN reeds vele actieve celluloseontleders gevonden (71). Hij noemt deze eigenschap zelfs kenmerkend voor de *Micromonosporae.* Ook ik vond verscheidene stammen, die actieve celluloseontleders zijn; maar ik geloof, dat zij zoowel in aantal als in beteekenis toch achter staan bij de *Actinomyces*-soorten.

Heel opmerkelijk is het feit, dat cellulose ontledende proactinomyceten en mycobacteriën of corynebacteriën tot nu toe niet bekend waren. JENSEN vermeldde zelfs nog kort geleden (78) uitdrukkelijk,

dat de door hem onderzochte *Proactinomycetaceae* nooit cellulose aantasten. Deze uitspraak van JENSEN is des te onbegrijpelijker, wanneer men bedenkt, dat hij zeer vele proactinomyceten heeft geïsoleerd en onderzocht en dat ik er verscheidene cellulose splitsende soorten onder heb gevonden. Celluloseontleders vindt men dus in alle vier geslachten, welke tegenwoordig in de orde der *Actinomycetales* onderscheiden worden. In het onderstaande zullen zij achtereenvolgens behandeld worden.

a. Actinomyces.

Het aantal door mij waargenomen cellulose ontledende actinomyceten is vrijwel onbegrensd. Zij zijn één der belangrijkste cellulose ontledende microbengroepen. De meeste stammen zijn elkaar echter zeer na verwant, zoodat zij tot een betrekkelijk gering aantal werkelijk duidelijk te onderscheiden soorten behooren. Maar ook dit aantal is nog zeer groot. Ik heb zeker meer dan honderd duidelijk „verschillende" actinomyceten geisoleerd. Als reine cultures aangehouden werden echter slechts vertegenwoordigers van bepaalde typen, welke ik met WAKSMAN „soortgroepen" wil noemen (200).

Ik onderscheid thans onder de karakteristieke actinomyceten — dus in mijn sub-genus *a* — 14 van zulke „soortgroepen". Het is zeer moeilijk, mijn soortgroepen te vergelijken met die, welke door WAKSMAN zijn opgesteld en beschreven, daar ik mij uitsluitend tot cellulose ontledende soorten beperkt heb, terwijl WAKSMAN alle actinomyceten behandeld heeft. Bovendien wil ik, zooals reeds gezegd, twee typen geheel van de overige actinomycessoorten als sub-genera afscheiden. Mijn soortgroepen komen dus met die van WAKSMAN volstrekt niet overeen, temeer daar ik mijn groepen ook overigens volgens andere gezichtspunten ingedeeld heb.

De voor de celluloseontleding belangrijkste mijner soortgroepen in hef subgenus *a* van *Actinomyces* zijn de volgende:

Soortgroep I. Omvat de typische actinomyceten met rijkelijk ontwikkeld luchtmycelium, waarop zich overvloedig kogelronde, droge, krijtwitte sporen vormen uit spiraalvormig gewonden en opgerolde uiteinden van hyphen. De sporenvorming vindt in de koloniën dikwijls in concentrische ringen plaats. Vaak ook kan men de vorming van vloeistofdruppeltjes in de massa der sporen opmerken. Het substraatmycelium is welig ontwikkeld, sterk vertakt, groeit zeer snel en bestaat uit betrekkelijk dikke draden (gemiddeld $\pm$ 0.4 μ). Deze actinomyceten zijn meestal kleurloos of slechts zwak en onopvallend gekleurd. Ook kleuren zij het substraat, waarop zij groeien ternauwernood. Zij verspreiden zeer dikwijls de typische geur van vochtige aarde (fig. 86).

Soortgroep II. Gelijkt bij macroscopische beschouwing zeer veel op de vorige, daar zij ook droge, krijtwitte sporen vormt. De groei is echter veel trager en zelfs in geheel rijpen toestand zijn de koloniën nog zeer klein en onopvallend. Het substraatmycelium is veel zwakker en schraler ontwikkeld. De enkele draden zijn zeer dun (slechts ongeveer 0.2 μ dik), maar lang en vertakt. De zich eveneens slechts laat en traag vormende sporen zijn ovaal tot iets langwerpig en vormen zich op kortere en rechtere hypheneinden. In het substraat ziet men dikwijls knotsvormige opzwellingen aan de einden der hyphen (fig. 87).

De beide groepen I en II zijn nauw aan elkaar verwant; zij zijn ook door overgangsvormen met elkander verbonden. Een volstrekt ander type stellen echter de volgende twee groepen voor:

Soortgroep V. Zeer snel groeiende vormen met welig ontwikkeld en zeer compact, in elkaar gegroeid substraatmycelium, dat uit zeer lange en rijkelijk vertakte, maar steeds zeer dunne hyphen is opgebouwd (ongeveer 0.15 μ dik). In doorschijnend substraat maken de koloniën den indruk van dikke cumuluswolken. Het luchtmycelium is slechts zwak ontwikkeld; soms ontbreekt het zelfs geheel. Ook de sporenvorming is daardoor onbeduidend. Bovendien vormen de sporen zich nooit in droge, voor het bloote oog zichtbare massa's, maar steeds klevend aan het oppervlak van het substraat, dus „nat" en onopvallend. De vorm der sporen is zeer verschillend, van kogelrond tot vrij lang staafvormig. De kleur dezer actinomyceten is gewoonlijk veel sprekender dan die der groepen I en II en wisselt tusschen geel of zalmkleurig, over oranje of bruin tot grijs of violet. De geur van aarde ontbreekt geheel (fig. 88).

Soortgroep VI. Nauw aan de vorige verwant. De groei is zeer traag en langzaam. De hyphen zijn veel dikker en grover dan bij groep V. Luchthyphen en sporen worden op de gebruikelijke substraten in het geheel niet gevormd. Overigens gelijk aan groep V; met het bloote oog van de laatste niet te onderscheiden (fig. 89).

Naast deze soortgroepen staan de beide boven reeds vermelde scherp begrensde subgenera *b* en *c* der actinomyceten. Het eerste, dat de soorten omvat met de sporenvorming in het substraat, is gekarakteriseerd door snel groeiende, zeer actieve actinomyceten, met dun, echter zeer lang substraatmycelium, dat tot groote, losse koloniën met onscherpe begrenzing en met lange uitloopers in het substraat uitgroeit. De kleur is steeds duidelijk grijs. De sporen vormen zich zoowel in de lucht als in het substraat aan duidelijk verdikte hyphen, welke dan in karakteristieke, iets langwerpige en aanvankelijk duidelijk afgeknotte, hoekig cylinderische sporen uiteen vallen. Later ronden zich de sporen meer of minder af. In tegenstelling tot de overige

Actinomyces-soorten ontstaan hierbij geen duidelijke insnoeringen tusschen de zich vormende sporen, maar blijven de laatste dicht aaneen liggen, totdat zij uitelkaar vallen. Wel zijn reeds van te voren zeer duidelijke, dikke dwarswanden zichtbaar. In oude cultures verdikken zich steeds meer hyphen en vallen in sporen uiteen, zoodat tenslotte nauwelijks nog normale hyphen overblijven. Het luchtmycelium is zeer zwak ontwikkeld. De meeste sporen vormen zich daarom ook *in* het substraat (fig. 90). Zeer opvallend is het ook, dat de sporen niet aan de uiteinden der hyphen gevormd worden, doch dat willekeurige hyphen in het mycelium opzwellen en in sporen uiteenvallen — min of meer overeenkomstig met de vorming van chlamydosporen bij de eumyceten. Deze actinomyceten vormen een geheel afzonderlijke groep, welke, zooals uit de gegeven beschrijving volgt, zich in vele principieele punten van de overige soorten onderscheidt. Overgangen tot andere actinomyceten heb ik nog niet gevonden.

Het andere afzonderlijke subgenus — c — omvat soorten, welke macroscopisch zeer veel gelijken op mijn soortgroep I (= WAKMAN's groep *Albo-luteus*). Alleen is de krijtwitte sporenmassa losser en grover opgebouwd. Microscopisch gezien zijn zij echter door een zeer bijzonderen vorm der sporen gekarakteriseerd. Deze zijn namelijk lang, somtijds zelfs zeer lang, en vormen zich door het uiteenvallen van zeer lange en steeds geheel stijve en rechte luchthyphen, die als stijve haren uit het substraat te voorschijn komen en bij de zwakste aanraking in ongelijk lange stukken uiteenvallen. Vóór het uiteenvallen ziet men in de hyphen echter nòch dwarswanden, nòch insnoeringen. Overigens wijken deze actinomyceten niet merkbaar van de typische soorten af. Hun mycelium is lang, vrij dik en snel groeiend. De kleur is meestal wit tot zeer licht bruinachtig.

In de bovengenoemde soortgroepen en de afgescheiden sub-genera *b* en *c* bevinden zich de meeste actieve celluloseontleders; daarom zal ik mij hier tot de beschrijving van deze groepen beperken, hoewel ook in de overige groepen nog talrijke zwakkere celluloseontleders voorkomen.

Dr. WAKSMAN was zoo vriendelijk verscheidene mijner stammen te determineeren en volgens zijn stelsel te benoemen. Onder de vertegenwoordigers van mijn soortgroep V vond hij *Actinomyces fradii*, *A. asteroides*, *A. salmonicolor*, dus vertegenwoordigers van zijn groep *fradii-asteroides*. Mijn groep V schijnt dus meer of minder met deze groep in zijn indeeling overeen te stemmen. De hem gezonden stammen van mijn groepen I en II bleken meestal vertegenwoordigers van zijn groep *albo-flavus* te zijn. Ook hierbij schijnt mijn groepindeeling dus in zekeren zin met die van WAKSMAN parallel te loopen. Bij de overige

groepen kon echter geen overeenstemming met zijn groepen aangetoond worden en zelfs zulke karakteristieke vormen als de beide speciale sub-genera stemmen niet overeen met de systematische eenheden van WAKSMAN. Twee volgens mijn meening zeer nauw aan elkaar verwante vertegenwoordigers van het subgenus *b* werden door WAKSMAN herkend als *Actinomyces diastaticus* en *A. Lipmanii*. Bij de beschrijving van deze beide soorten vermeldt hij echter niet, dat hun sporen in het substraat gevormd worden. Het onderbrengen van subgenus *c* in het systeem van WAKSMAN is volstrekt niet gelukt.

De voedingsphysiologie van de *Actinomyces*-soorten werd door mij uitsluitend beschouwd uit het gezichtspunt der celluloseontleding. Meer dan de helft der zich op veelzijdig samengestelde voedingsbodems ontwikkelende *Actinomyces*-koloniën bleken meer of minder actieve celluloseontleders te zijn, zoodat men de ontleding van cellulose bepaaldelijk als een karakteristieke eigenschap der actinomyceten kan beschouwen. Dit geldt in nog hoogere mate voor de beide afgescheiden subgenera *b* en *c*, waarvan bijna alle in normalen grond voorkomende soorten cellulose ontleden.

Toch is geen der actinomyceten speciaal op cellulose aangewezen. Steeds zijn zij, wat hun energiebron betreft, zeer weinig kieskeurig; zij kunnen vrijwel alle gewoonlijk voorkomende koolhydraten gebruiken. Voor meer nauwkeurige gegevens hierover zij verwezen naar de veelomvattende publicaties van WAKSMAN (192, 193), WAKSMAN en JOFFE (204), KRAINSKY (95) en LIESKE (108). Vele vertegenwoordigers dezer groep tasten de cellulose pas aan, wanneer de oplosbare koolhydraten verbruikt zijn. Andere soorten ontleden echter tegelijk zoowel de cellulose als ook de oplosbare suiker. Enkele stammen zijn bijzonder actief; zij tasten de cellulose zelfs in suikerrijke voedingsbodems aan, ook indien zij in dezelfde voedingsbodems zonder cellulose even goed kunnen groeien.

Nauwkeurig quantitatief heb ik den invloed van oplosbare suikers op de celluloseontleding door de actinomyceten niet onderzocht. Mijn gebruikelijke methode met de papierstrooken op agar voldoet bij actinomyceten en schimmels nl. niet, omdat het mycelium niet van de papierresten gescheiden kan worden en steeds meegewogen wordt. Qualitatief kreeg ik er echter een zekeren indruk van door het kweeken van actinomyceten op celluloseagar met stijgende hoeveelheden glucose of manniet. Daarbij bleek, dat de oplossingsvelden om de koloniën bij sommige soorten pas bij een concentratie van 0.5 % druivensuiker waarneembaar verkleind werden en een volkomen onderdrukking van de celluloseontleding gelukte dikwijls in het geheel niet.

In de onderstaande tabel zijn eenige gegevens hierover bijeen gevoegd.

Tabel XIII.

Groei der actinomyceten en grootte der gevormde oplossingsvelden op celluloseagar bij toenemend druivensuikergehalte.

Stam no.	Soortgroep of sub-genus		Druivensuikergehalte in %					
			0	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
$V_{A.B.}$	I	groei	+++	++++	++++	+++	++	–
		grootte der oplossingsvelden	+++	+++	++	+	+	–
V_{7b}	V	groei	++++	++++	+++	++	+	+
		grootte der oplossingsvelden	++++	++++	+++	++	–	–
V_{40}	sub-genus b (sporenvorming in het substraat)	groei	++++	+++	+	+	–	–
		grootte der oplossingsvelden	++++	+++	++	+	–	–
V_{31}	sub-genus c (langsporig type)	groei	++++	++++	+++	+	–	–
		grootte der oplossingsvelden	++++	++	+	–	–	–

Aan de in deze tabel opgenomen stammen — en zoo gedragen zich vele actinomyceten tegenover de cellulose — kan men dus een beteekenis bij de celluloseontleding in den grond niet ontzeggen, want suikerconcentraties, welke bij hen de celluloseontleding merkbaar beïnvloeden, komen in natuurlijke verblijfplaatsen niet voor. De actinomyceten nemen onder de niet-specifieke celluloseontleders daardoor een zeer bijzondere plaats in, daar zij ongeacht hun omnivoren aard toch steeds cellulose afbreken. Hun waarde komt daarom overeen met die der specifiek op cellulose aangewezen microben, zooals de cytophagen en eenige cellvibrionen.

Een andere zeer belangrijke eigenschap van vrijwel alle echte actinomyceten is, dat zij nauwelijks behoefte hebben aan vitamines en groeistoffen. Slechts in enkele gevallen kon ik een merkbare groeibevordering waarnemen na toevoeging van koud of heet gewonnen extracten van compost, gist, vleesch en dergelijke of bij het kweeken in gemengde cultures. In dit opzicht naderen de actinomyceten dus de eumyceten, die ook in den regel vitamineproducenten en geen vitamineconsumenten zijn.

b. Micromonospora.

Ik kon de bewering van JENSEN (77), dat de *Micromonosporae* volstrekt geen zeldzame organismen zijn, op zichzelf bevestigen; dat zij echter in de gewone grondsoorten van N.W. Europa procentsgewijs een even belangrijke rol spelen als JENSEN dat in Australië gevonden heeft, waar tot 8 % van alle actinomyceten tot de *Micromonosporae* behoorden, betwijfel ik toch. Ik vond steeds slechts een paar procent *Micromonosporae* onder de actinomyceten. Dat zij minder bekend zijn dan de overige actinomyceten, zal wel daaruit te verklaren zijn, dat zij veel trager groeien en nooit zulke groote koloniën vormen als de *Actinomyces*.

Alle door mij geïsoleerde cellulose ontledende *Micromonospora*-stammen gelijken veel op elkaar. Zij kenmerken zich door een zwak ontwikkeld, traag groeiend, bros mycelium, dat in tegenstelling tot de echte actinomyceten steeds onregelmatig gekromd en gekronkeld en zeer veranderlijk van dikte is. De zijtakken zijn dikwijls kort en gedrongen en voornamelijk de sporendragende takken zijn echte „Kurztriebe". Somtijds zijn zij zóó kort, dat de sporen rechtstreeks zijdelings aan de lange hoofddraden schijnen te zitten (fig. 91 en 92).

De vorm der rijpe, afgevallen sporen is ongeveer rond, terwijl zij duidelijk langwerpig, knotsvormig lijken te zijn, zoolang zij nog aan het mycelium vastzitten. In rijpen toestand ontstaat er echter dwars door het basale gedeelte van de knots een lichte, zeer breede streep, welke den kop van de basis scheidt. Langs deze streep breekt de rijpe spore af, zoodat zij dan dadelijk vrijwel rond is. De basis onder de lichte streep rondt zich af tot een kleinere knots, welke gaandeweg weer tot de oorspronkelijke grootte opgroeit en dan opnieuw een spore afscheidt. In den hangenden druppel kan men dit proces duidelijk waarnemen. Een luchtmycelium hebben de *Micromonosporae* in het geheel niet. Toch worden hun sporen soms op bepaalde plaatsen in het substraat gevormd. Enkele soorten vormen de sporendragende zijtakken namelijk slechts dicht bij de substraat-oppervlakte en richten ze loodrecht hierop, zoodat de gevormde sporen uit het substraat geperst worden. In oude koloniën vormen zij dan soms geheele korsten op de oppervlakte.

De rangschikking van de sporenvormende takken is het eenige constante kenmerk, aan de hand waarvan de *Micromonosporae* geclassificeerd kunnen worden. Ik stel daarom voor de soorten, die alle sporen naar boven toe uit het substraat afscheiden, in het sub-genus *b* te vereenigen en van de overige meer primitieve soorten (sub-genus *a*) te onderscheiden (zie pag. 108). De laatste zijn meestal ook in andere

opzichten eenvoudiger ontwikkeld, kleiner, met een nog korter en schraler mycelium dan de soorten met oppervlaktesporen (fig. 93 resp. 94).

Een merkbaren geur verspreiden de *Micromonosporae* niet. De kleur der door mij onderzochte cellulose ontledende soorten is meestal bruin tot lichtgrijs. Hun koloniën zijn steeds zeer klein en zien er, met het bloote oog bezien, uit als wolkachtige bacteriekoloniën. Zonder microscopische contrôle zou men er nauwelijks actinomyceten in herkennen.

Als celluloseontleders zijn zij vermoedelijk niet van groote beteekenis op grond van hun tragen groei en hun betrekkelijk gering aantal. Enkele stammen ontleden de cellulose wel krachtig, zoodat breede, volkomen heldere oplossingsvelden in de agar om de koloniën ontstaan. De kwantitatieve bepaling van de celluloseontleding met de papierstrookjes op agar is bij deze organismen, zooals vroeger reeds uiteengezet werd, niet betrouwbaar. Door enkele stammen werd volgens deze methode tot 35 % der cellulose ontleed, hetgeen dus in werkelijkheid nog meer zal zijn.

Exclusieve celluloseontleders heb ik ook onder de *Micromonosporae* niet gevonden, wel echter soorten, die uitnemend van cellulose als eenige energiebron gedijen. Ook zij reageeren bij de celluloseontleding zeer zwak op de aanwezigheid van oplosbare, organische stoffen, zoodat zelfs in celluloseagar met 2 % druivensuiker nog duidelijke oplossingsvelden ontstaan, hoewel de groei met 2 % druivensuiker zonder cellulose even goed lijkt te zijn. In dit opzicht zijn de *Micromonosporae* dus echte actinomyceten. Opmerkelijk is het echter, dat zij voor groeistoffen reeds veel dankbaarder zijn dan deze laatste. Verscheidene mijner stammen werden duidelijk gunstig beïnvloed door compostextract of door de afscheidingen van andere microben (bacteriën of actinomyceten). Twee stammen konden op de „synthetische" celluloseagar zelfs in 't geheel niet gekweekt worden en eischten steeds toevoeging van groeistoffen.

c. Proactinomycetaceae.

Dit zijn meestal zeer traag groeiende, onopvallende organismen, welke slechts kleine koloniën vormen. Daarom is het begrijpelijk, dat zij langen tijd onopgemerkt zijn gebleven. Het is opmerkelijk, dat ik de meeste celluloseontledende proactinomyceten en corynebacteriën in ophoopingen van organisch materiaal gevonden heb, zooals in tuincomposthoopen e. d. en ook in slecht geaëreerde gronden, dus b.v. in modder uit slooten, terwijl zij in normale gronden vrijwel ontbreken.

In dit opzicht kom ik in conflict met de meening van TOPPING (186, 187), die in de talrijke, langzaam groeiende proactinomyceten en mycobacteriën juist de „autochthone" microflora van normale grondsoorten volgens WINOGRADSKY ziet. Het was dus een zeer onverwacht resultaat, dat de traag groeiende *Proactinomycetaceae* juist in compost rijkelijk voorkomen.

Van de cellulose ontledende soorten zijn het hoofdzakelijk de betrekkelijk myceliumrijke, dus de vertegenwoordigers van het geslacht *Proactinomyces*, die van belang zijn, daar zij vrij talrijk voorkomen en daardoor, ongeacht hun tragen groei, toch meespreken bij de celluloseontleding.

Traag zijn zij niet alleen in hun groei, maar ook in de celluloseontleding, waarbij zij zich zelfs in de gewone celluloseagar eerst met sporen van oplosbare stoffen voeden en pas nadat deze geheel verteerd zijn de cellulose aantasten. De oplossingsvelden om hun koloniën worden dan ook laat zichtbaar en een toevoeging van druivensuiker onderdrukt het ontleden van cellulose vrijwel geheel.

De koloniën der *Proactinomyces*-soorten maken bij oppervlakkige beschouwing den indruk van kleurlooze tot lichtgele *Actinomyces*-koloniën zonder luchtmycelium, alleen zijn zij teerder en kleiner. De randen zijn onscherp en bestaan uit talrijke, korte, fijne uitloopers, waardoor de geheele kolonie ook wel op een miniatuurkolonie van *Bacillus mycoides* lijkt (fig. 95). Bij microscopische beschouwing ziet men, dat de jonge koloniën vóór het begin der segmentatie uit een somtijds lang vertakt mycelium bestaan, juist als echte *Actinomyces*-koloniën. Maar reeds spoedig beginnen in het oudste, centrale deel der kolonie de hyphen in brokstukken uiteen te vallen, welke geleidelijk korter worden, totdat de geheele draad in een reeks van korte staafjes tot coccen veranderd is. Dikwijls blijft het echter niet bij het uiteenvallen der myceliumdraden, maar vermeerderen zich de ontstane, op bacteriën gelijkende brokstukken zoo rijkelijk, dat ten slotte ter plaatse van de oorspronkelijke myceliumdraden dikke, met korte bacteriën gevulde kanalen ontstaan, welke niets meer gemeen hebben met een actinomycetenmycelium, maar geheel den indruk maken van een vertakte bacteriekolonie. Slechts de uiterste einden der myceliumdraden verraden dan nog, dat het een *Proactinomyces* betreft, daar zij nog als hyphen verder groeien (fig. 96, 97 en 98).

De dikte der myceliumdraden is niet groot, meestal ongeveer 0.15 μ. Zij wijzigt zich ook niet bij het uiteenvallen, zoodat de op bacteriën gelijkende brokstukken eveneens deze dikte hebben. Hun lengte is zeer wisselend. Bij het begin der segmentatie vormen zich somtijds nog lange stukken; allengs worden zij echter korter, zoodat ten laatste

dikwijls slechts zeer korte staafjes tot coccen overblijven. Deze brokstukken der myceliumdraden zijn bij sommige stammen beweeglijk en vertoonen een onregelmatige, soms echter vrij goed ontwikkelde ciliënvorming. De zweepdraden zijn meestal zeer onregelmatig gerangschikt, zoodat naast elkaar monotriche, lophotriche en peritriche individuën waargenomen kunnen worden, juist zooals GRAY en THORNTON (52) dit voor hun *Mycoplana*-stammen aangeven en afbeelden. Het zijn steeds slechts enkele procenten van alle staafjes, die beweeglijk zijn, en toch verleent juist deze beweeglijkheid hen een volkomen bacteriënachtig karakter. Het uitstrijkpreparaat van een proactinomyceet is dikwijls van een bacteriëncultuur niet te onderscheiden (fig. 99).

Zeer karakteristiek voor de proactinomyceten is het, dat vóór de segmentatie geen insnoeringen en geen dwarswanden te zien zijn, ook niet zulke breede, heldere strepen, zooals deze bij de sporenvorming van sommige actinomyceten ontstaan.

De vorm en dikte van het jonge mycelium zijn niet altijd dezelfde. Enkele soorten komen daarin volkomen met de echte actinomyceten overeen, hebben dus een flink lang, recht, dun mycelium (fig. 96), terwijl andere soorten veel kortere, dikkere en onregelmatiger gekromde draden met vele korte, zeer dikke zijtakken vertoonen. Deze laatste soorten komen dus meer met de *Micromonosporae* overeen. De geheele habitus en ook het microscopische beeld van de hyphen der proactinomyceten is trouwens sterk van uitwendige invloeden afhankelijk, zoodat alles, wat er hier over gezegd is, hoofdzakelijk betrekking heeft op de celluloseagar. Op voedzamere substraten met oplosbare koolhydraten blijven de hyphen steeds korter en dikker en vallen eerder in segmenten uiteen, zoodat de organismen daarbij in elk opzicht meer op bacteriën gaan gelijken.

In physiologisch opzicht zijn de proactinomyceten zeer weinig gespecialiseerd. Alleen op cellulose aangewezen zijn zij niet; enkele soorten bezitten echter een duidelijke voorkeur voor groot-moleculaire polysacchariden, zooals amylum en cellulose. Vitamines en andere groeistoffen bevorderen hun ontwikkeling meestal zeer sterk. Toch heb ik geen enkelen stam ontdekt, die zóódanig op de toevoer van deze stoffen aangewezen was, dat hij zonder hen niet zou kunnen gedijen. Bij de keus van hun stikstofbron zijn zij zeer weinig kieskeurig en zij kunnen zoowel NO_3 en NH_4 als ook organische stikstofverbindingen gebruiken. Hun reactieoptimum is bij pH = 7 tot 8 gelegen.

De echte *Mycobacteriën* (*Corynebacteriën*) zijn vermoedelijk van geringe beteekenis bij het ontleden van cellulose in den grond. Zij komen in normale gronden ten minste weinig voor. Alleen in den slecht

geaëreerden modder op den bodem van zoetwater heb ik verscheidene soorten gevonden, welke levendig cellulose ontleden. Bijzonder talrijk waren zij in het uitgebaggerde en aan de lucht blootgestelde slik van het IJselmeer, nadat dit ten deele geaëreerd was. Daar behoorden ongeveer 3 % van alle op celluloseagar tot ontwikkeling komende koloniën tot de mycobacteriën. Al mogen deze microben voor de celluloseontleding dus minder belangrijk zijn, het feit, dat ik, in tegenstelling tot de tot dusver geldende meening, ook onder hen echte celluloseontleders aangetroffen heb, is wel vermeldenswaard. Enkele der door mij geïsoleerde stammen zijn zelfs zeer actief. Zij kunnen ook onbegrensd langen tijd van cellulose als eenige energiebron leven. Daarbij groeien zij veel sneller dan de proactinomyceten, zoodat zij in korten tijd vrij veel cellulose kunnen oplossen. Bij de gewone bepaling van de celluloseontleding vond ik (bij toevoeging van compostextract) bedragen van meer dan 60 % van het gegeven papier. Toch kon ik geen specifieke celluloseontleders onder hen vinden. Steeds ontwikkelden zij zich van zetmeel en van oplosbare suikers even goed of zelfs beter dan van zuivere cellulose, hoewel de celluloseontleding door de toevoeging van suiker bij enkele stammen niet geheel onderdrukt werd, zoodat zij ook in voedingrijke grondsoorten als celluloseontleders werkzaam kunnen zijn. Zij kunnen zoowel van minerale, als ook van organische stikstof leven en hebben een reactieoptimum, evenals de meeste microben, bij pH = 7 tot 8. Vitamines en groeistoffen hebben meestal een zeer gunstige invloed. De verschillende stammen gedragen zich hierin echter verschillend. Sommige kunnen in het synthetische milieu in het geheel niet leven, andere daarentegen wel.

Morphologisch kunnen zij als volgt gekarakteriseerd worden: In normale cultures op agarvoedingsbodems ziet men uitsluitend lange bacteriënstaafjes van ongeveer 0.2 μ dikte en ongeveer 1.5 à 3 μ lengte. Slechts hun onderlinge ligging in de koloniën verraadt, dat men met mycobacteriën te doen heeft, daar vele individuën met de einden aan elkaar vastzitten en daarbij onderling een bepaalden hoek vormen. Hoofdzakelijk in den buitensten rand van een kolonie ziet men dit „Winkelwachstum" zeer duidelijk. In uitstrijkpreparaten en in homogene suspensies overheerschen echter de afzonderlijke staafjes dermate, dat paren in „hoekstand" nauwelijks voorkomen. Ook vertakte vormen ziet men in gewone cultures hoogst zelden. Slechts op versch substraat overgebrachte, kiemende staafjes (hangende druppelcultures) vormen de voor mycobacteriën zoo karakteristieke, rudimentaire mycelia, welke somtijds nauwelijks grooter worden dan vertakte, lange bacteriën (fig. 100). Soorten, welke ook na het uiteenvallen dezer beginmycelia nog vele vertakte individuën vertoonen,

zooals GRAY en THORNTON (52) het voor hun *Mycoplana* opgeven, heb ik onder de celluloseontleders niet gevonden. Mijn cultures kwamen steeds meer met het door TOPPING (186) aangegeven type overeen. Te oordeelen naar haar beschrijving behooren mijn cultures in haar groepen I en II. Eenige mijner stammen zijn nl. voorzien van zweepdraden en duidelijk beweeglijk. Maar net als bij de beweeglijke soorten der proactinomyceten zijn het steeds slechts enkele procenten van alle individuën, welke zich actief voortbewegen kunnen.

De oppervlaktekoloniën der cellulose ontledende mycobacteriën zijn gladde, ronde, hoog gewelfde, nat glanzende druppeltjes, meestal kleurloos tot geel. In de agar vormen zich gladde, troebele, lensvormige koloniën. Zij worden zelden grooter dan ongeveer 1 mm in doorsnede. De heldere oplossingsvelden er om heen bereiken echter dikwijls een breedte van 1½ tot 2 mm. Op meer voedzame, suiker en eiwit bevattende, voedingsbodems worden de koloniën wel iets grooter en wateriger, maar zij groeien toch nooit zoo snel als die der echte bacteriën.

Zeer eigenaardig is de, overigens door GRAY en THORNTON en TOPPING reeds aangegeven, eigenschap der mycobacteriën, om bij de verdere overentingen op kunstmatige voedingsmedia een andere groeiwijze aan te nemen dan oorspronkelijk in de eerste ruwe cultuur. Vermoedelijk is de bij de eerste uitzaaiing optredende vorm de natuurlijke in den grond. De bij het uitzaaien van grondsuspensies op een agarvoedingsbodem zich vormende koloniën vertoonen namelijk dezelfde met het bloote oog zichtbare uitloopers als die der proactinomyceten, alleen korter en minder sterk ontwikkeld. Bij microscopische beschouwing ziet men, dat het ook hier door segmentatie uiteen gevallen hyphen zijn, welke allengs tot door staafjes gevulde kanalen aangroeien. Bij de eerste uitzaaiing vormen zich dus vele lange hyphen, zoodat de mycobacteriën dan meer op proactinomyceten, met een rijk ontwikkeld mycelium, gelijken dan bij de latere overentingen. Eén enkele overenting is echter reeds voldoende om ze volkomen in het typische mycobacteriënstadium te doen overgaan. De boven aangegeven morphologische diagnose heeft betrekking op den op agar stabielen op bacteriën gelijkenden vorm.

§ 4. EUMYCETEN.

De Eumyceten (schimmels) heb ik tot nu toe in het geheel niet besproken. Men treft onder hen namelijk zóóvele celluloseontleders aan, dat een kort overzicht dezer soorten niet gegeven kon worden en een volledige opsomming zou zeer tijdroovend en nauwkeurig

onderzoek vereischen. Daarom moest ik voorloopig daarvan afzien.

Slechts enkele algemeene punten kunnen vermeld worden. Ten eerste valt het op, dat van de vele — en ten deele ook zeer actieve — celluloseontleders onder de schimmels geen enkele soort specifiek op cellulose is aangewezen. Zelfs een duidelijke voorliefde voor cellulose kon bij geen enkelen schimmel aangetoond worden.

Ten tweede is het niet juist, dat zij alleen in zure gronden talrijk zijn. Daarin zijn ze slechts in verhouding tot de overige celluloseontleders relatief talrijker. Overigens gedijen zij echter ook op neutrale en zelfs op zwak alkalische substraten uitstekend.

Ten slotte zij er nog op gewezen, dat eigenlijk slechts enkele soorten kwantitatief van groot belang zijn en steeds weer in massa's optreden. In normale, zware, neutrale akkergronden zijn het:

Enkele *Penicillium*-soorten, *Verticillium cinnabarinum* (CDA.) RKE. et BERTH. en *Oöspora alba* (PR.) SACC. et NÄGL.

In kalkhoudende (mariene) zandige gronden komt *Stachybotrys alternans* BON. zeer veel voor, terwijl de voornaamste cellulosesplitsers in zure podsolzandgronden zijn:

Cladosporium pisicolum SNYDER, een *Chaetomium*-soort en *Humicola grisea* TRAAEN.

Als luchtinfectie treedt zeer dikwijls op:

Corethropsis homini VUILL., welke dus wel zeer algemeen moet zijn, in den grond echter zelden talrijk voorkomt [1]).

Wanneer men terugziet op de lange reeks van cellulose splitsende microben, welke in dit hoofdstuk opgesomd werden, wordt men er door getroffen, dat het vermogen om cellulose te ontleden in het geheele microbenrijk zoo algemeen verbreid is. Er zijn bijna geen belangrijke systeemeenheden te noemen, welke geen celluloseontleders omvatten. Onder de echte bacteriën schijnen zij alleen in de gelederen van de *Coccaceae* niet voor te komen. Bovendien zijn tot nog toe ook onder de myxomyceten en de phycomyceten geen celluloseontleders bekend geworden. Deze laatste twee heb ik overigens niet bewerkt. Ook de protozoën heb ik geheel buiten beschouwing gelaten, ofschoon men door de publicaties van CLEVELAND (31, 32, 33, 34, 35, 36) en DICKMAN (40) tegenwoordig weet, dat er talrijke in den darm van houtknagende insecten levende soorten voorkomen, welke op celluloseontleding gespecialiseerd zijn. Vrij levende cellulose ontledende protozoën zijn tot nu toe echter niet beschreven en ook ik heb hen niet gevonden.

---

[1]) De determinatie der schimmels dank ik aan de welwillende hulp van Prof. Dr. J. WESTERDIJK van het C. B. S. in Baarn, die alle determinaties in haar instituut liet uitvoeren of aan andere erkende specialisten voorlegde.

Alvorens de beschrijving der cellulose splitsende microben af te sluiten, moet nog even worden ingegaan op het opvallende verschil in de wijze van cellulosesplitsing, dat tusschen de verschillende groepen bestaat. Het grootst is dit verschil tusschen de cytophagen eenerzijds en de cellvibrionen of bacillen anderzijds. WINOGRADSKY heeft er reeds op gewezen. Terwijl nl. de cytophagen het papier meestal tot de laatste vezel oplossen en daarbij zooveel taai slijm of gelei vormen, dat in de plaats van het papier een slijmlaag ontstaat, waarin absoluut geen cellulosevezels meer voorkomen, zouden de cellvibrionen de vezels slechts betrekkelijk oppervlakkig aantasten, zoodat het papier wel los wordt en uit elkaar valt, maar niet geheel verdwijnt, terwijl er zoo goed als geen slijm wordt gevormd. Zoo ongeveer beschreef WINOGRADSKY het opvallende verschil; en inderdaad is dit zeer duidelijk, alleen is het niet juist, dat de cellvibrionen de cellulosevezels nooit geheel oplossen. Geeft men de cellvibrionen slechts kleine hoeveelheden cellulose en een overmaat van voedingszouten, dan kan de cellulose ook door hen tot het laatste toe worden afgebroken. Het verschil in de wijze van aantasting der cellulose bestaat dus niet zoozeer daarin, dat de cytophagen wél, en de cellvibrionen niet in staat zijn de vezels geheel op te lossen, maar dat de cytophagen de cellulose meer gelocaliseerd aantasten, terwijl de cellvibrionen zich snel over groote oppervlakten verspreiden, en daardoor hun werk nergens kunnen voltooien.

Dit verschillende gedrag vindt zijn verklaring in drie feiten: ten eerste zijn de cytophagen bijna onbeweeglijk, terwijl de cellvibrionen integendeel uiterst beweeglijk zijn en zich daarom in de vloeistoflaag tusschen de cellulosevezels zeer snel kunnen verspreiden, zoodat de celluloseomzetting tegelijkertijd over een groot gebied plaats vindt, maar alleen dàn ten einde wordt gevoerd, wanneer voor het geheele gebied voldoende voedingsstoffen aanwezig zijn. Óp of ín de celluloseagar, waar de snelle uitbreiding der cellvibrionen onmogelijk is, omdat daar geen vloeistoflaag tot hun beschikking staat, vormen echter ook zij scherp begrensde kleine koloniën, en hier wordt de cellulose om de koloniën heen ook tot het laatst toe opgelost, zoodat er heldere oplossingsvelden ontstaan en het verschil dus minder duidelijk wordt. De tweede oorzaak is de reeds genoemde vorming van onoplosbaar slijm door de cytophagen, terwijl de cellvibrionen alleen oplosbare omzettingsproducten doen ontstaan. Deze laatste nu kunnen in den regel niet voldoende snel door diffusie worden afgevoerd, zoodat zij remmend op de verdere ontwikkeling der cellvibrionen werken. En ten derde strekt de enzymatische werking van de cellvibrionen zich veel verder uit dan die der cytophagen. In dit opzicht onderscheiden alle myxobacteriën zich principieel van alle andere celluloseaantasters.

De myxobacteriën schijnen de cellulase namelijk alleen in de onmiddellijke omgeving van hun cellen te kunnen laten werken, terwijl bij alle overige organismen, dus ook bij de cellvibrionen, de cellulase als een echt exoënzym tot op een afstand van verscheidene millimeters van de levende cel in den voedingsbodem kan diffundeeren. De cellvibrionen, bacillen, actinomyceten en schimmels vormen dus om hun koloniën heen echte oplossingsvelden, die geen kiemen bevatten, terwijl bij de myxobacteriën de oplossing der cellulose slechts zoo ver gaat, als de levende cellen in de agar ingedrongen zijn. Hoe men zich de oplossing der cellulose door de myxobacteriën eigenlijk moet voorstellen, is nog niet geheel duidelijk. In principe moet men natuurlijk ook hier een exo-enzym aannemen, want de cellen vormen op de vezels en ook in het cellophaan duidelijke „vraatplekken" en van het opnemen van corpusculaire cellulose kan natuurlijk geen sprake zijn. Door de een of andere oorzaak kan echter de door hen afgescheiden cellulase niet verder wegdiffundeeren, waardoor de cellulosesplitsing alleen bij direct contact van de cellen met de celstof mogelijk is, en toch is hun uiteindelijke activiteit niet geringer. Zuiver hypothetisch zou men kunnen aannemen, dat de cellulase bij de myxobacteriën onafscheidelijk aan hun karakteristieke slijm als drager gebonden is.

Experimenteel kan dit onderscheid op verschillende manieren worden aangetoond. Ten eerste kan men agarplaten van twee lagen vervaardigen, waarbij op een dikkere laag celluloseagar een heel dunne heldere laag voedingsagar zonder cellulose is aangebracht. Ent men hierop dikke druppels of strepen van een actieve cultuur van cellulosesplitsers zonder de agar te beschadigen, dan vormen zich bij gebruik van cellvibrionen in de agar oplossingsvelden onder de entplaatsen, terwijl dit bij de cytophagen niet het geval is. En toch vindt bij de cellvibrionen hierbij geen doorwoekering van de bovenste agarlaag plaats, want uit de ontstane oplossingsvelden in de onderste laag laten zich geen organismen isoleeren. Een andere methode bestaat daarin, dat men bacteriedichte filterkaarsen volgens CHAMBERLAND met een werkzame cultuur vult en ze uitwendig met een heel dunne laag troebele celluloseagar bekleedt, door ze even in gesmolten celluloseagar te dompelen en de aanklevende agar te laten stollen. Heeft men de kaars gevuld met een cellvibrionencultuur, dan wordt de cellulose in de agar door de, door de kaarswand heen diffundeerende, cellulase na eenigen tijd opgelost, maar heeft men een cytophagen cultuur gebruikt, dan blijft de agar onveranderd troebel.

Nog beweeglijker en verder diffundeerend dan bij de cellvibrionen is de cellulase der bacillen, die vaak oplossingsvelden van verscheidene cm Ø kunnen vormen, echter met zeer vage onscherpe randen. Ter illustratie van het bovenstaande dienen de afbeeldingen 24 en 53.

HET AANTAL EN DE BETEEKENIS DER CELLULOSE ONTLEDENDE MICROBEN IN DEN GROND.

INLEIDING.

In de voorgaande hoofdstukken werd de celluloseontleding uitsluitend van het standpunt der betreffende microben uit bekeken en werd elke uitlating over de hoegrootheid der celluloseafbraak in den grond vermeden. In het onderstaande zal ik echter de uitkomsten van de door mij verrichte onderzoekingen over het aantal der voornaamste celluloseontleders en over hun beteekenis voor de celluloseafbraak in enkele grondsoorten vermelden. Deze gegevens moeten uitsluitend als een eerste globale oriënteering op dit gebied opgevat worden, daar een betrouwbare en nauwkeurige bepaling van het aantal cellulose ontledende microben in den grond helaas nog niet mogelijk is, evenmin als de kwantitatieve bepaling van de celluloseafbraak. Dit behoeft ons trouwens ook niet te verbazen: pas sedert ca. 25 jaar beschikt men over de vereischte electieve voedingsbodems, zoodat eerst den laatsten tijd tellingen van cellulosesplitsers mogelijk geworden zijn.

De groote moeilijkheden van dit kwantitatieve onderzoek der celluloseontleding in den grond weerspiegelen zich ook in de spaarzaamheid der mededeelingen erover in de litteratuur. De meeste dezer mededeelingen berusten bovendien niet op exacte tellingen, doch op globale bepalingen of alleen op algemeene indrukken, verkregen bij het isoleeren van bepaalde microben.

Men kan dus gerust zeggen, dat dit geheele gebied nog vrijwel braak ligt, zoodat het wel zeer gewenscht was een poging te wagen erin door te dringen, ook al zou het veel werk en tijd kosten, gezien de eisch om eerst de methodiek ervan op te bouwen.

§ 1. OVERZICHT DER LITTERATUURGEGEVENS.

De eerste schuchtere uitingen over het aantal en de relatieve beteekenis van verschillende celluloseontleders dateeren uit 1913. MÜTTERLEIN (120), meende toen n.l. dat de schimmels en actinomyceten bij de aërobe celluloseontleding een veel belangrijkere rol spelen dan de bacteriën, en McBETH en SCALES (115) trachtten het aantal der cellulose splitsende schimmels en bacteriën in verschillende gronden vast te stellen. Bij het tellen van bacteriën stuitten zij op

onoverkomelijke moeilijkheden, het aantal der schimmels konden zij echter bepalen. Zij vonden in normalen, neutralen akkergrond ongeveer 20.000 celluloseontledende kiemen van schimmels per gram. Na behandeling van denzelfden bodem met cellulose (papier) steeg dit aantal echter snel tot ongeveer 200.000.000. Geen wonder dus, dat zij in de schimmels een zeer belangrijken factor zagen bij de aërobe celluloseontleding, ook voor de alkalische en neutrale gronden. In 1915 vulde SCALES (162) dit werk aan met nieuwe tellingen van cellulose ontledende schimmels, en kwam daarbij tot ongeveer dezelfde resultaten. MCBETH (114) vatte in 1916 het vraagstuk reeds breeder op en vergeleek het voorkomen van cellulose splitsende schimmels, actinomyceten en bacteriën in verschillende gronden in Amerika, zij het ook zonder nauwkeurige tellingen uit te voeren. Als resultaat zijner jarenlange onderzoekingen gelooft hij, dat in de basenrijke gronden der aride klimaatzone (Californië) bacteriën de overhand hebben, terwijl in de zure gepodsoleerde gronden der oostelijke staten de schimmels en actinomyceten op den voorgrond treden, zoodat de celluloseontleding hoofdzakelijk op hun rekening komt.

Ten slotte behandelen in 1926 WAKSMAN en SKINNER (205) hetzelfde vraagstuk nogmaals, waarbij zij van meening zijn, dat bacteriën slechts in droge alkalische gronden van belang zijn, terwijl in de meeste andere gevallen de celluloseontleding vooral door de schimmels veroorzaakt wordt. De actinomyceten zijn volgens hun meening geheel zonder beteekenis. Tot deze gevolgtrekking kwamen zij echter niet na het tellen van de celluloseontleders, maar eigenaardig genoeg na het bepalen van het totale aantal bacteriën, schimmels en actinomyceten op universeele voedingsmedia vóór en na de toevoeging van papier aan den grond. De daarbij gevonden getallen kunnen dus geen goede maatstaf voor het aantal der eigenlijke celluloseontleders zijn, zoodat hun gevolgtrekkingen sceptisch beoordeeld moeten worden.

Uit al de tot nu toe genoemde werken merkt men zeer duidelijk, dat het tellen van cellulose splitsende bacteriën in dien tijd nog niet goed mogelijk was; men moest zich tot speculaties beperken en telde slechts de schimmels. Eerst door de moderne werken over celluloseontleding ontstond de mogelijkheid om ook de bacteriën meer of minder nauwkeurig te tellen. De eerste mededeelingen hierover vindt men in 1928 bij DUBOS (43, 44) en WAKSMAN en DUBOS (202). Zij telden volgens de verdunningsmethode in een electieve voedingsoplossing in reageerbuizen, waarin een strookje papier was aangebracht, en vonden daarbij zeer hooge waarden; in met papier bemesten basenrijken grond zelfs ongeloofelijk hooge — tot 500.000.000 per gram. De schimmels telden zij op agarplaten volgens de methode van WAKSMAN. Hun gevolgtrekking is, dat in alle basenrijke gronden de ontleding van cellulose hoofdzakelijk geschiedt door bacteriën (de cytophagen inbegrepen), terwijl in de zure gronden de bacteriën geheel ontbreken, en de cellulose daarin uitsluitend door schimmels ontleed wordt. De actinomyceten zijn naar hun meening in geen enkele grondsoort van groot belang. Slechts in drogen basenrijken grond kunnen zij nog van eenige beteekenis zijn.

In 1930 meende KALNINS (80), dat cellulose ontledende bacteriën in alle niet te zure gronden van groote beteekenis zijn. In den vruchtbaren kalkrijken bodem van Rothamsted (Engeland) traden hoofdzakelijk de cellvibrionen op den voorgrond, terwijl hij in de neutrale tot zwak zure podsolgronden in Letland hoofdzakelijk cytophagen aantrof. Tellingen werden door hem echter niet uitgevoerd, zoodat zijn meeningen slechts gegrond zijn op de algemeene ondervindingen bij de isoleering.

JENSEN (72, 76) voerde in 1930—1931 tellingen uit, zoowel in een vloeibaar voedingssubstraat met daarin hangende papierstrooken, als ook op celluloseagarplaten en kreeg daarbij zeer aannemelijke getallen, waarmede mijn bepalingen goed overeenstemmen. Ook JENSEN vond de meeste cellvibrionen in de vruchtbare basenrijke gronden, de cytophagen daarentegen hoofdzakelijk in de neutrale tot zwak zure gronden. In zeer onvruchtbare grondsoorten ontbraken bacteriën geheel en al, en traden slechts schimmels op den voorgrond. Hij verdedigt het standpunt, dat de schimmels ook in basenrijke gronden meer beteekenis hebben dan men gewoonlijk aanneemt, maar dat men ze meestal niet opmerkt, omdat zij door bacteriën en actinomyceten overwoekerd worden. Dit laatste lijkt mij weliswaar niet de juiste verklaring, maar dat in basenrijken grond inderdaad zeer veel schimmels voorkomen, heb ook ik waargenomen.

De groote beteekenis der actinomyceten voor de ontleding van cellulose heeft echter, eigenaardig genoeg, ook JENSEN niet erkend, hoewel hij, evenals ik, ondervonden heeft, dat op celluloseagarplaten, welke met suspensies van grond geënt zijn, zich hoofdzakelijk actinomyceten ontwikkelen, en kwantitatief de schimmels en bacteriën verre overtreffen.

Een andere mededeeling over de relatieve beteekenis der verschillende celluloseontleders vindt men in het werk over boschhumus van STAPP en BORTELS (174), die echter geen nauwkeurige tellingen uitvoerden, doch hun conclusies alleen trokken uit den algemeenen indruk, dien zij bij het isoleeren kregen. Zij hebben tengevolge van hun speciale isoleeringstechniek in het geheel geen cellulose ontledende actinomyceten gevonden en ook geen niet-specifieke bacteriën. Ook vonden zij in zuren humus geen bacteriën, doch alleen schimmels, terwijl basenrijke milde boschhumus vele cytophagen en cellvibrionen bevatte. Toch achten zij de schimmels van geringe beteekenis, daar zij geen specifieke celluloseontleders zijn.

In tegenstelling tot STAPP en BORTELS ziet HOROWITZ-WLASSOWA (60) in de schimmels de belangrijkste ontleders van cellulose, ook in basenrijke gronden.

Tenslotte moet nog de publicatie van FELZ-KARNICKA (81) vermeld worden. Zij onderzocht de celluloseontleding in zure podsolgronden en trachtte juist de rol der bacteriën, actinomyceten en schimmels met elkaar te vergelijken. Zij kwam daarbij tot de conclusie, dat in zure gronden alleen de schimmels van beteekenis zijn, terwijl in basenrijke gronden de schimmels nagenoeg ontbreken, terwijl bacteriën daar de hoofdrol spelen. Zij bediende zich bij haar onderzoek van een zeer ruwe telmethodiek, zoodat haar uitkomsten niet betrouwbaar zijn.

Zooals men ziet zijn de opgaven over het aantal der cellulose splitsende microben in den grond tot nog toe zeer onvolledig en dikwijls met elkaar in tegenspraak, hetgeen voornamelijk daaraan geweten moet worden, dat iedere onderzoeker steeds maar één methode toepaste, en de daarbij verkregen uitkomsten als de juiste beschouwde, zonder zich ervan te vergewissen of een radicale wijziging in de werkwijze niet geheel andere resultaten zou opleveren. Het was dus zaak, niet weer in deze fout te vervallen en verscheidene met elkaar vergeleken en degelijk getoetste methoden uit te werken, alvorens men de uitkomsten als betrouwbaar zou kunnen beschouwen.

§ 2. DE TOEGEPASTE METHODEN.

De kwantitatieve bepaling van de celluloseontleding leverde relatief nog de minste moeilijkheden op. Zij bleek nl. in humusarme zandige gronden met voldoende nauwkeurigheid volgens de koperoxydeammoniakmethode van CHARPENTIER (24, 25, 26) uitvoerbaar te zijn, maar in klei- en humusrijke gronden zijn de uitkomsten onbetrouwbaar en slecht reproduceerbaar door het mede neerslaan van humuszuurgelen bij het aanzuren, zoodat daarbij op de empirische methode van CHRISTENSEN (27, 28, 29) teruggegrepen moest worden. Als maat voor de activiteit der celluloseontleding dient dan het aantal dagen, benoodigd voor een algeheele ontleding van een papierschijfje (zie Hoofdstuk II, laatste pag.). Hiermede was het probleem van de bepaling van de intensiteit der celluloseontleding wel niet opgelost, daar deze methode uit den aard der zaak zeer ruw is, maar voor een eerste oriënteering was zij toch voldoende nauwkeurig, zoodat ik van een verdere verbetering afzag.

Minder gemakkelijk was het vinden van bevredigende methoden ter bepaling van het aantal celluloseontledende microben in den grond.

Allereerst trachtte ik de plaattelmethode op celluloseagar toe te passen. Het resultaat was echter in de meeste gevallen teleurstellend, daar hierbij zoo goed als uitsluitend actinomyceten tot ontwikkeling kwamen en de andere cellulosesplitsers geheel overwoekerden. Parellel met deze plaattellingen werd ook de verdunningsmethode in vloeibaar milieu met erin gesuspendeerde cellulosevezels of met erin hangende streepjes filtreerpapier toegepast. Hierbij verkreeg ik uit dezelfde grondmonsters zoo goed als uitsluitend cellvibrionen en bacillen, terwijl de actinomyceten nu geheel ontbraken. Het leek toen dus alsof deze methoden niet universeel bruikbaar waren en ook geen absolute getallen opleverden, doch hoogstens vergelijkingswaarden. Bij nader onderzoek echter bleek de plaatmethode toch ook in absoluten zin de beste benaderingswaarden te geven. Dit veranderde inzicht is gebaseerd op de volgende waarnemingen. In de eerste plaats bleken nl. alle bij de verdunningsmethode tot ontwikkeling komende cellvibrionen en bacillen ook op celluloseagarplaten uitstekend te kunnen groeien, zoodat zelfs het kiemgetal van reine cultures dezer microben en ook der ruwe cultures zeer goed door uitzaaien op platen bepaald kon worden. Ten tweede was het niet mogelijk de actinomyceten in de vloeibare voedingsbodems behoorlijk te laten groeien, ook al werden dezen overvloedig met reine cultures geënt. Ten derde bleken de totale bij de plaattelling gevonden aantallen steeds veel grooter te zijn dan de uitkomsten der verdunningsmethode. De

verhouding varieerde van ongeveer 1 : 5 tot soms zelfs 1 : 100. En ten vierde kon ik bij een nauwkeurig onderzoek der platen toch altijd wel enkele koloniën van cellvibrionen, bacillen of myxobacteriën tusschen de actinomyceten vinden; deze enkele koloniën leverden bij omrekening per gram grond getallen op, die ongeveer gelijk waren aan die, gevonden bij de verdunningsmethode. Zoodoende kwam ik tot de gevolgtrekking, dat op celluloseagarplaten vrijwel alle in den grond levende cellulose ontledende microben behoorlijk tot ontwikkeling kunnen komen, zoodat dit substraat niet electief is voor bepaalde groepen van cellulosesplitsers en op zich zelf dus voor absolute tellingen zeer goed bruikbaar zoude zijn, ware het niet, dat een der groepen, nl. de actinomyceten, in de meeste grondsoorten zóó talrijk waren vergeleken bij de rest, dat zij alle andere groepen overheerschen. Dit is des te opvallender, daar de meeste onderzoekers cellulose splitsende actinomyceten nauwelijks noemen of althans als onbelangrijk beschouwen. Waarschijnlijk moet dit resultaat verklaard worden uit het feit, dat men slechts zelden rechtstreeks van grondsuspensies platen gemaakt heeft, doch eerst op papier of in een vloeibaren voedingsbodem kweekte. Hierdoor onderdrukte men steeds de actinomyceten en bevorderde de andere groepen.

Op zuiver minerale substraten, zooals kiezelzuurplaten met daarop gelegd filtreerpapier of met daarin gesuspendeerde cellulose werden de actinomyceten weliswaar sterk teruggedrongen, maar goede telling der bacteriën kon ik daarbij toch niet bereiken, daar de verkregen aantallen steeds zeer laag bleven, zelfs belangrijk lager dan bij de verdunningsmethode.

Het directe uitzaaien van grondsuspensies op celluloseagarplaten is dus de aangewezen methode voor het bepalen van het totale aantal aërobe cellulose ontledende microben in den grond en van het aantal actinomyceten. De overige groepen kunnen hierbij echter in den regel slechts zeer onnauwkeurig bepaald worden, daar slechts enkele koloniën ervan tusschen de actinomyceten waargenomen kunnen worden. Het is mij niettegenstaande vele pogingen ook niet gelukt een betere werkwijze te vinden voor het rechtstreeksche tellen van de overige groepen. Wel kan het totale aantal der cellvibrionen, bacillen, polyangiden, cytophagen, etc. tezamen met behulp der verdunningsmethode in voedingsvloeistoffen gevonden worden, maar de zoo verkregen getallen zijn toch steeds te laag, en bovendien is een splitsing ervan in de afzonderlijke groepen niet mogelijk. Daarvoor moet men dan de hierbij ontstane mengcultures weer op platen uitzaaien. De zoo verkregen getallen kunnen echter al heelemaal geen aanspraak meer maken op ware verhoudingsgetallen, daar de snelheid van ver-

meerdering in de voedingsvloeistof voor de verschillende groepen zeer ver uiteen kan loopen.

Na vele mislukte pogingen om uit deze impasse te geraken moest ik mij ten slotte vergenoegen met een schatting der ware aantallen langs verschillende wegen: naast het bepalen van het totale aantal en van het aantal actinomyceten op de platen paste ik de verdunningsmethode in vloeistofmilieu toe en constateerde in de grensverdunningen, welke groepen in de kolfjes nog aanwezig waren. Zoodoende kon ik de naast de actinomyceten meest voorkomende groep bepalen en ook eenigszins tellen. Bovendien probeerde ik overal, waar het eenigszins uitvoerbaar was, bij de directe telling op celluloseagarplaten althans bij benadering de gezochte aantallen der cellvibrionen, cytophagen, polyangiden, proactinomyceten, etc. vast te stellen met behulp der enkele tusschen de actinomyceten tot ontwikkeling komende koloniën dezer organismen. Dit kon slechts dan met succes gedaan worden, als veel parallelplaten vervaardigd werden, om ten slotte toch behoorlijke gemiddelden uit de zeer lage getallen der afzonderlijke platen te kunnen berekenen. Ook is het noodzakelijk de juiste verdunning goed te schatten of door een oriënteerend proefje eerst vast te stellen, daar een te hooge verdunning tot gevolg heeft, dat er heelemaal geen bacteriën tusschen de actinomycetenkoloniën meer voorkomen, terwijl een te geringe verdunning een volkomen overwoekering dezer organismen door de actinomyceten ten gevolge heeft. Door het toepassen van al deze tijdroovende bepalingen naast elkaar kon ik tenslotte een globalen indruk krijgen van de samenstelling der cellulose ontledende bevolking van enkele gronden. Voor seriewerk in handen van niet geschoold personeel zijn deze methoden echter nog volstrekt onbruikbaar.

Om ook eenig inzicht te verkrijgen in de speciale functie van de verschillende cellulosesplitsers heb ik mij niet beperkt tot willekeurige tellingen in den natuurlijken grond, maar heb daarnaast ook geteld in grond, waaraan kort voordien cellulose toegevoegd was. Hierdoor verkrijgt men een indruk van de veranderingen, welke plaats vinden bij plotselingen toevoer van cellulose in een voordien geconsolideerden grond, waarin zich ook de microflora in een rusttoestand bevond. Men onderscheidt daarbij dus tusschen de „autochthone" bodemmicroflora en het op versche organische stof tot ontwikkeling komende ephemere gezelschap.

Bovendien heb ik de uitwendige levensomstandigheden eenigszins gevarieerd door de grondmonsters bij verschillende temperatuur en vochtigheid te houden, waardoor zich de speciale eischen der verschillende organismen duidelijk manifesteerden.

Al deze van het normale afwijkende toestanden konden buiten,

bij de natuurlijke ligging der gronden moeilijk gevonden worden; daarom vulde ik daarvoor vlakke glazen schalen (groote petrischalen) met grondmonsters. Deze monsters ondergingen dan al de gewenschte behandelingen. De toevoeging van cellulose werd in den regel uitgevoerd door het begraven van schijfjes filtreerpapier, zooals aangegeven in hoofdstuk II, pag. 42.

Dit geheele onderzoek heb ik bovendien niet alleen op normale akkergronden toegepast, doch ook tot verschillende afwijkende gronden uitgebreid: jonge ingepolderde gronden (Wieringermeer), zure podsolboschgronden, met water verzadigde gronden van den bodem van waterloopen, zouthoudende mariene buitenlanden, etc. Toch is deze uitbreiding nog zeer onvolledig, vooral daar zij zich beperkt tot één klimaatsgebied, terwijl in andere streken allicht geheel afwijkende resultaten bereikt zouden zijn.

§ 3. VOORBEELDEN VAN ENKELE CULTUURGRONDEN.

In de eerste plaats onderwierp ik een sedert eeuwen als grasland gebruikten vruchtbaren, maar kalkarmen kleigrond uit de provincie Noord-Holland, bij Medemblik, aan het kwantitatieve onderzoek. Voor een meer nauwkeurige karakteristiek van dezen grond zij vermeld, dat het kleigehalte (deeltjes kleiner dan 16 μ) ongeveer 62 % bedroeg, het humusgehalte 7,4 % en het $CaCO_3$-gehalte 2,3 %, terwijl de pH ongeveer 5,6 was. De versche onbehandelde grond, genomen uit een diepte van 5 tot 25 cm, dus zonder de graszode, werd volgens verscheidene methoden onderzocht:

1e. volgens de verdunningsmethode in den gewonen vloeibaren voedingsbodem in erlenmeyerkolfjes met daarin verdeeld uiteengeplozen filtreerpapier.

2e. Eveneens volgens de verdunningsmethode, maar in reageerbuisjes met in de vloeistof hangende papierstrookjes.

3e. Volgens de gebruikelijke celluloseagarplatenmethode.

De eerste en tweede methode gaven ongeveer gelijke resultaten, nl. ongeveer 800.000 bacteriën per gram grond, in hoofdzaak cellvibrionen, verder slechts enkele actinomyceten en geen schimmels. Cytophagen konden soms uit de positieve kolfjes gekweekt worden, maar zij kwamen slechts sporadisch voor, zoodat het duidelijk was, dat hun de vloeibare voedingsbodem niet paste. Polyangiden, proactinomyceten en mycobacteriën ontbraken geheel. Alleen sporenvormers, hoofdzakelijk uit de „*Clostridium*"-groep, kwamen naast de cellvibrionen voor, vormden echter ten hoogste eenige procenten van alle celluloseontleders. De cellvibrionen, die hierbij optraden,

behoorden voor het grootste gedeelte tot de groepen Ia en II, dus tot de typische vibrionen, of de uiterst kleine vormen.

Een geheel andere uitkomst verkreeg ik op de celluloseagarplaten. Hier kwamen uitsluitend actinomyceten tot ontwikkeling, zoowel cellulose ontledende als ook inactieve. Agarvoedingsbodems hebben nu eenmaal het nadeel, dat zij nooit geheel electief zijn. De agar zelf en de verontreinigingen daarvan treden steeds ook als voedingsstoffen op. En juist de weinig eischende actinomyceten ontwikkelen zich op agarplaten zeer weelderig, ook wanneer geen enkele krachtbron aan de agar is toegevoegd. Zoo waren dan ook in dit geval de platen rijkelijk met actinomyceten bedekt, waarvan bijna de helft meer of minder duidelijke oplossingsvelden vormde. Het totale tot ontwikkeling komende aantal actinomyceten bedroeg hier ongeveer 40.000.000 per gram grond. Ongeveer 15.000.000 hadden duidelijk oplossingsvelden gevormd. Bacteriën- en schimmelkoloniën ontbraken op deze platen geheel.

De hier medegedeelde resultaten van de telling in dezen graslandgrond heb ik naderhand nog meermalen gecontroleerd, doch steeds kwam ik tot dezelfde slotsom. Hier had ik dus direct al kennis gemaakt met de in § 2 besproken overwoekering der ca. 800.000 bacteriën en myxobacteriën door de ca. 15.000.000 actinomyceten op de platen.

Naast deze telling in onbehandelden grond paste ik de volgende methode toe: groote petrischalen werden met denzelfden grond gevuld en daarin filtreerpapierschijven ingegraven. Deze petrischalen werden bij kamertemperatuur en optimale vochtigheid gehouden zonder toevoeging van voedingszouten of organische stoffen. De ontleding van het papier verliep zeer snel, zoodat reeds na 5 tot 6 weken de schijven geheel verteerd waren en niet meer terug gevonden konden worden. Nog vóór dat dit eindstadium bereikt was, voerde ik tellingen uit, ten eerste in het in ontleding verkeerende papier met de daaraan klevende gronddeeltjes, en ten tweede in het geheele grondmonster met de papierresten tezamen, nadat alles zorgvuldig gemengd was.

De telling in de papierresten is weliswaar kwantitatief niet vergelijkbaar met de tellingen in den grond, maar zij is toch van beteekenis, omdat zij belangrijke aanwijzingen geeft over de verhouding der verschillende microbengroepen in, in den grond aanwezige, celluloseophoopingen.

In het half verteerde papier bleek nu de verhouding tusschen bacteriën en actinomyceten zeer sterk ten gunste der eerste veranderd te zijn. Bij het uitzaaien op celluloseagarplaten overheerschten de actinomyceten weliswaar nog, maar ik kon toch ook talrijke koloniën van cellulose ontledende bacteriën tusschen de actinomyceten zien. Gemiddeld

verkreeg ik op deze platen de volgende numerieke verhouding tusschen de verschillende koloniën: actinomyceten 100, proactinomyceten en mycobacteriën 5, cellvibrionen (van alle typen) 15, cytophagen 10, polyangiden 10, sporenvormers 2, schimmels 8. Dit resultaat wil zeggen, dat de bacteriën, myxobacteriën en proactinomycetaceën zich in dezen grond op cellulose sterker en sneller vermeerderen dan de actinomyceten. Zij spelen dus hoofdzakelijk een rol bij de eerste phasen van de mineralisatie van celstofrijke plantaardige stoffen, terwijl de actinomyceten hoofdzakelijk in het latere stadium tot ontwikkeling komen.

Men moet bij het beoordeelen der bovenstaande verhoudingscijfers niet uit het oog verliezen, dat het absolute aantal der cellulose ontledende microben in de papierresten vele malen zoo groot is als in den oorspronkelijken grond en ongeveer 150.000.000 per gram bedraagt. In vloeibare voedingsbodems ontwikkelden zich hierbij, evenals in de blanco proef, zoo goed als uitsluitend cellvibrionen en bacillen in een aantal van ongeveer 20.000.000 per gram, m. a. w. numeriek zeer goed overeenstemmend met de plaattellingen.

De tellingen in den totalen grond in de petrischalen zijn nog interessanter, ook van kwantitatief standpunt bezien. Hier is in ongeveer 1300 g grond een papierschijf van 17½ cm Ø en 1.8 g droog gewicht ingegraven. Dit is dus inderdaad een vrij sterke, maar toch volstrekt niet overmatige cellulosebemesting, die met slechts ongeveer 5.000 kg cellulose per ha overeenstemt. Toch was ook hier het aantal der celluloseontleders sterk gestegen in vergelijking met dat in den onbehandelden grond, hoewel lang niet in die mate als in het papier zelf. In den vloeibaren voedingsbodem verkreeg ik nl. ongeveer 4.000.000 celluloseontleders per gram, ook weer zoo goed als uitsluitend cellvibrionen. Op celluloseagarplaten waren per gram grond ongeveer 35.000.000 celluloseontleders aanwezig, grootendeels weer actinomyceten. Daartusschen kwamen hier echter, zooals ook bij de tellingen in de papierresten, vrij veel bacteriën voor, nl. ongeveer 3.000.000 cellvibrionen, 2.000.000 cytophagen, 2.000.000 polyangiden, 500.000 sporenvormers en 1.000.000 proactinomyceten en mycobacteriën; daarentegen vond ik slechts 500.000 schimmels.

Al deze organismen ontwikkelden zich op de celluloseagar uitstekend en konden daarop geïsoleerd en verder geteeld worden. In den met cellulose sterk bemesten grond, waarin de actinomyceten niet meer alle andere microbengroepen overheerschten, konden dus vrijwel alle belangrijke groepen op agarplaten geteld worden. In den onbehandelden grond kwamen echter slechts zóó weinig andere organismen voor in vergelijking met de 15.00.000 cellulose splitsende actinomyceten,

dat een nauwkeurige telling op platen niet mogelijk was, en de verdunningsmethode te hulp geroepen moest worden.

Overziet men de bovenstaande getallen van het oude, blijvende grasland, dan valt in de eerste plaats het enorme aantal der actinomyceten op. Numeriek overheerschen zij hier zóódanig, dat men alle andere microbengroepen buiten beschouwing zou kunnen laten, wanneer de tellingen na een sterke cellulosebemesting niet getoond hadden, dat de actinomyceten dan betrekkelijk inactief blijven en slechts van 15.000.000 op 26.000.000 stijgen, terwijl verschillende andere organismen zich in denzelfden tijd soms tot het vijfvoudige vermeerderen. Vermoedelijk is dus het op de platen verkregen „aantal" der actinomyceten te hoog, en moet men het aantal der werkelijk actieve actinomycetenkiemen op slechts een breukdeel van het gevonden getal stellen; dit laatste is dus vermoedelijk sterk verhoogd daar ook alle sporen en myceliumbrokstukjes medegeteld worden.

Het tweede onderzochte bodemtype is de nog jonge kalk- en basenrijke grond uit de Wieringermeer. Ik onderzocht hier in de eerste plaats een vrij zwaren kleigrond (kavel D 109 in het zuidelijke kleigebied van den polder), die sedert de drooglegging in het jaar 1930 steeds als bouwland gebruikt, en in het jaar 1935 met roode klaver bezaaid werd. Hier was dus één keer al een groenbemesting toegepast. Ter nadere aanduiding van den grond kunnen de volgende waarden medegedeeld worden: Kleigehalte 63 %, humusgehalte 3,3 %, $CaCO_3$-gehalte 10,7 %, pH = 8,1. De oplosbare zouten van het zeewater waren ten tijde van deze onderzoekingen reeds vrijwel uitgespoeld.

In den vloeibaren voedingsbodem vond ik ongeveer 800.000 cellulose-ontleders, wederom bijna uitsluitend cellvibrionen met enkele bacillen, dus ongeveer gelijk aan het oude grasland. De plaattelling gaf echter een veel geringer aantal cellulosesplitsers dan het oude grasland: slechts 5.600.000 tegen 15.000.000. Het verschil werd hoofdzakelijk veroorzaakt door het geringere aantal actinomyceten. De plaattellingen gaven hier nl. naast ongeveer 3.800.000 actinomyceten ook ongeveer 300.000 schimmels, 480.000 polyangiden, 530.000 cellvibrionen, 100.000 cytophagen, 350.000 proactinomyceten en 50.000 sporenvormers, dus op 100 actinomyceten ongeveer 8 schimmels, 12½ polyangyden, 14 cellvibrionen, 2½ cytophagen en 8½ proactinomyceten. De actinomyceten nemen numeriek ook hier dus nog een zeer bijzondere plaats in, doch in het oude grasland waren zij bijna 3 × zoo talrijk. De andere organismen zullen in beide grondsoorten wel ongeveer gelijkelijk vertegenwoordigd geweest zijn.

Een bemesting van dezen grond met papier veroorzaakte wederom

een sterke verhooging van het aantal der cellulosesplitsers, alsook een verschuiving van de numerieke verhouding ten gunste van de bacteriën en myxobacteriën. Het papier werd hier iets langzamer ontleed dan in den ouden grond; het was eerst na ongeveer 8 weken geheel verdwenen. In dezen met cellulose bemesten grond gaf een telling in den vloeibaren voedingsbodem met papierbrij ongeveer 2.500.000 cellulose ontledende bacteriën. De plaattellingen leverden per gram de volgende getallen: het totale aantal celluloseontleders was ongeveer 15.000.000; daarvan waren actinomyceten — 9.000.000, polyangiden — 2.700.000, cellvibrionen — 1.600.000, proactinomyceten en mycobacteriën — 700.000, cytophagen — 600.000, sporenvormers — 200.000 en schimmels — 200.000. In het halfverteerde papier zelf vond ik bij plaattellingen ongeveer 90.000.000 cellulosesplitsers, die hoofdzakelijk uit polyangiden en cellvibrionen bestonden, terwijl de actinomyceten slechts de derde plaats bezetten, gevolgd door de cytophagen en proactinomyceten.

Vergelijkt men de beide tot nu toe beschreven grondsoorten met elkander, dan ziet men, dat de betrekkelijk humusarme maar zeer basen- en kalkrijke jonge Wieringermeergrond minder actinomyceten, cellvibrionen en cytophagen bevat, daarentegen zeer rijk is aan polyangiden en dat deze bijzonderheid na een sterke bemesting met cellulose nog duidelijker te voorschijn treedt. Overigens is de Wieringermeerbodem, ongeacht zijn hoog basen- en kalkgehalte en zijn veel betere ontwatering, over het geheel toch armer aan celluloseontleders, hetgeen ook begrijpelijk is, gezien de algemeene geringere microbenactiviteit in deze gronden, vergeleken met analoge oude gronden.

Naast den kleigrond uit het zuiden van de Wieringermeer heb ik ook een jonge mariene zandbodem in het noorden van dit gebied (perceel E 44) onderzocht. De voornaamste eigenschappen van dezen als bouwland gebruikten grond zijn: klei: ± 4 %, $CaCO_3$: 12,2 %, humus: 0,35 %, pH = 8,3. Het is dus een humusarme, zeer kalkrijke, echte mariene zandgrond. In den onbehandelden grond vond ik hier in den vloeibaren voedingsbodem slechts ongeveer 300.000 celluloseontleders, ook weer uitsluitend cellvibrionen en bacillen. De plaattellingen gaven het volgende beeld:

Totaal aantal cellulosesplitsers	± 1.600.000
actinomyceten	600.000
cellvibrionen	400.000
schimmels	400.000
proactinomyceten	120.000
cytophagen	75.000

terwijl de polyangiden en bacillen er wel voorkwamen, maar numeriek geheel zonder beteekenis waren. De actinomyceten speelden hier dus een veel geringere rol dan in de zware boven behandelde gronden. Dit is dus een grond, waarin ten eerste het totale aantal der cellulosesplitsers veel lager is, maar waarin bovendien ook de afzonderlijke groepen in een geheel andere verhouding optreden dan in kleigronden. Hier komen naast de actinomyceten hoofdzakelijk de cellvibrionen en de schimmels op den voorgrond, terwijl de in den kleigrond zoo talrijke polyangiden nauwelijks een rol spelen.

Na een bemesting met cellulose kwamen deze bijzonderheden nog duidelijker te voorschijn. Ik telde dan nl. per gram grond:

Totaal aantal cellulosesplitsers	± 3.800.000
cellvibrionen	1.800.000
schimmels	1.100.000
actinomyceten	700.000
cytophagen	200.000

terwijl de polyangiden, proactinomycetaceën en bacillen eigenlijk niet geteld konden worden, daar zij slechts sporadisch optraden.

Voor het eerst had ik hier dus een plaattelling, waarbij de actinomyceten niet de grootste groep waren en die zeer hooge schimmelwaarden gaf. Men zag hier bij oppervlakkige beschouwing juist alleen de groote schimmelkoloniën en eerst bij nauwkeurig toezien ontdekte men daartusschen ook de kleine koloniën van cellvibrionen. Vrijwel alle schimmelkoloniën behoorden tot één soort, nl. *Stachybotrys alternans* Bon., die in dezen kalkrijken zandgrond dus een overheerschende plaats inneemt. Ook in den onbehandelden grond maakten zij reeds het meerendeel van alle schimmelkiemen uit. Ook buiten de Wieringermeer vond ik deze schimmel in grooten getale in kalkrijke mariene gronden (b.v. in Breezand, Anna Paulownapolder). Opvallend was in dezen grond ook de soortenarmoede der cellulose splitsende populatie. Er kwamen hier eigenlijk slechts enkele soorten voor.

Een geheel ander resultaat leverde een zure diluviale zandgrond van het podsol-type uit Hilversum op. Het monster was in een oud dennenbosch met *Calluna* verzameld; het was kalkloos, bevatte ± 5,7 % humus en had een pH van ongeveer 4,6. Het is dus een typische zure, uitgeloogde, humusrijke zandgrond, die zoo arm is aan voedingsstoffen, dat een plaattelling op universeelen voedingsbodem als totaal microbenaantal per gram slechts 2.860.000 opleverde. In den vloeibaren voedingsbodem vond ik hier een totaal aantal cellulosesplitsers per gram grond van slechts 25.000. Opvallend was het overigens, dat hier in de kolfjes niet, zooals tot nu toe, slechts cellvibrionen voorkwamen,

maar hoofdzakelijk actinomyceten en sporenvormers. Hierdoor kreeg ik reeds den indruk, dat deze grond zeer arm aan bacteriën was; en wel niet alleen in absoluten zin, maar ook in vergelijking tot de actinomyceten. De plaattellingen bevestigden dit vermoeden volkomen. Ik vond nl. ongeveer 500.000 celluloseontleders, waarvan 450.000 (dus ongeveer 90 %) actinomyceten, 40.000 (8 %) schimmels en 6.000 (ongeveer 1,2 %) bacteriën, proactinomyceten en myxobacteriën tezamen. Deze telling is echter zeer onnauwkeurig, daar de actinomyceten en schimmels de overige organismen dermate overwoekerden, dat een nauwkeurige telling ervan niet mogelijk was.

Na de gebruikelijke cellulosebemesting gaf de telling in den vloeibaren voedingsbodem nog maar nauwelijks 34.000 kiemen per gram, ook alweer bacillen en actinomyceten. De plaattelling had echter een zeer verrassend resultaat: op alle platen domineerden sterk de schimmels en tusschen de groote schimmelkoloniën zag men ook eenige actinomyceten. Andere organismen ontbraken geheel. De telling gaf nu ongeveer 1.900.000 schimmels en ongeveer 600.000 actinomyceten per gram grond — tezamen dus ± 2.500.000 cellulosesplitsers. Na de cellulosebemesting hadden zich dus zoo goed als uitsluitend de schimmels sterk vermeerderd. De verhouding tusschen de actinomyceten en de schimmels was hierdoor dus veranderd van 11 op 1 in 1 op 3. Alle andere groepen waren nu in verhouding zoo zeldzaam geworden, dat zij op de platen niet meer voorkwamen.

Over het geheel bevestigen mijn ervaringen met dezen grond dus de algemeen geldende meening, dat in zure gronden zeer weinig cellulose splitsende bacteriën voorkomen, en de celluloseontleding daarin op rekening van de schimmels komt. Ik verwachtte echter niet, dat in rusttoestand, dus zonder cellulosebemesting, de actinomyceten ook hier weer in verhouding zoo talrijk zouden zijn en zelfs de schimmels in aantal zouden overtreffen. Laatstgenoemden treden hier dus alleen in de eerste phasen der ontleding van versche organische stof op den voorgrond, terwijl zij later grootendeels afsterven, en de actinomyceten dan weer de talrijkste groep van cellulosesplitsers vormen. In geen anderen grond komt de speciale, passieve rol der actinomyceten zoo duidelijk tot uiting als juist in dezen zuren, zandigen podsol. De cellulose splitsende actinomyceten zijn dus constante bewoners van zulke gronden; of zij echter kwantitatief van belang zijn bij de snelle celluloseontleding in versche plantenweefsels, is na het bovenstaande nog zeer de vraag.

Ter vergemakkelijking van het overzicht van de tot nu toe besproken gronden, zijn de voornaamste getallen in tabel XIV nogmaals bijeengebracht:

Tabel XIV.

Aantallen vertegenwoordigers der verschillende groepen van cellulose ontledende organismen in enkele gronden (in millioenen per gram grond).

	Kleigrond oud weiland bij Medemblik		Kleigrond bouwland Wieringermeer		Zandgrond bouwland Wieringermeer		Zure zandgrond (dennenbosch)	
	rusttoestand	na bemesting met cellulose	rusttoestand	na bemesting met cellulose	rusttoestand	na bemesting met cellulose	rusttoestand	na bemesting met cellulose
Actinomyceten	15	26	3.8	9	0.6	0.7	0.45	0.6
Cellvibrionen	0.8	3.0	0.53	1.6	0.4	1.8	n. t.	n. t.
Bacillen	n. t.	0.5	0.05	0.2	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
Polyangiden	0.1	2.0	0.48	2.7	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
Cytophagen	n. t.	2.0	0.10	0.6	0.08	0.2	n. t.	n. t.
Proactinomycetaceën	n. t.	1.0	0.35	0.7	0.12	n. t.	n. t.	n. t.
Schimmels	n. t.	0.5	0.30	0.2	0.4	1.1	0.04	1.9
Totaal aantal cellulosesplitsers	± 16	± 35	± 5.6	± 15.0	± 1.6	± 3.8	± 0.5	± 2.5

n. t. = niet telbaar wegens te gering aantal.

§ 4. VOORBEELDEN VAN ENKELE BLIJVEND MET WATER VERZADIGDE GRONDEN.

Alle tot nu toe besproken grondsoorten behooren tot de meer of minder „normale" aërobe typen. In het onderstaande zullen nu echter eenige opgaven over blijvend met water verzadigde grondsoorten vermeld worden:

In de eerste plaats moeten hier enkele cijfers over het aantal der celluloseontleders in den modder van den IJselbodem bij Kampen genoemd worden. Deze modder bestond uit grof, kalkhoudend rivierzand met plantenresten. Het watergehalte was 47,4 %, het humusgehalte 4,7 % van de droge stof. Het kleigehalte werd niet bepaald; het is echter niet hoog, hoewel het water hier slikhoudend is en ook sterk verontreinigd door de stad Kampen. De pH van het IJselwater is ongeveer 7.7. De monsters werden vrij oppervlakkig genomen, nl. slechts ongeveer 5 cm diep, zoodat zij zeer veel geaëreerd lichtgrijs gekleurd slik bevatten. De tellingen in den vloeibaren voedingsbodem leverden ongeveer 15.000 cellulose ontledende cellvibrionen en bacillen op. Op de platen telde ik echter totaal ± 275.000 celluloseontleders,

waarvan ± 248.000 actinomyceten, ± 16.000 cellvibrionen, ± 8.000 schimmels en ± 4.000 bacillen. Cytophagen, proactinomycetaceën en polyangiden ontbraken geheel.

Op een andere plaats in den IJsel, nl. dicht bij de monding in den z.g. „Ketel", heb ik op dezelfde wijze monsters genomen uit den met geheel versch fijn waterrijk slik bedekten bodem (watergehalte 71.2 %, kleigehalte 63.0 %, humusgehalte 4.2 %). Ook dit slik was kalkhoudend. Hier vond ik in den vloeibaren voedingsbodem ongeveer 140.000 cellulosesplitsers, allen cellvibrionen. Op de platen kreeg ik de volgende getallen: Totaal aantal cellulosesplitsers ± 650.000, actinomyceten ± 420.000, cellvibrionen ± 160.000, cytophagen ± 30.000, schimmels ± 30.000 en bacillen ± 10.000, terwijl geen proactinomyceten en geen polyangiden gevonden werden. Deze fijne slikbodem is dus veel rijker aan celluloseontleders, wat ook overeenstemt met zijn hooger totaal microbengehalte. Ook valt het op, dat ik hier zeer veel cytophagen vond, terwijl de zandige rivierbodem bij Kampen deze niet in een telbaar aantal bevatte. Alle hier gevonden cytophagen behooren tot de cystenlooze soorten. Men ziet dus, dat zelfs in een en dezelfde rivier, dus bij benadering in hetzelfde water, de microbenbevolking nog zeer verschillend kan zijn, al naar den aard van den bodem.

Over het geheel hebben de beide onderzochte plaatsen in den IJsel aangetoond, dat de actinomyceten en ook de schimmels volstrekt niet alleen in goed geaëreerde gronden voorkomen. Van de actinomyceten werd zelfs vaak beweerd, dat zij slechts van belang zijn in „droge" gronden (zie de litteratuuropgaven). Hier ziet men echter, dat zelfs op den bodem van een rivier $^3/_4$ van alle cellulosesplitsers actinomyceten zijn, en zelfs als men dit aantal sterk zou moeten verlagen, om een juist aantal der werkelijk actieve individuen te verkrijgen, zou men toch nooit kunnen beweren, dat de actinomyceten in den rivierbodem niet voorkomen.

Naast de tellingen in het eutrophe water van den IJsel heb ik ook bodemmonsters uit den zandigen bodem van een sloot met oligotrooph veenwater onderzocht. Deze sloot bevond zich aan den westkant van den z.g. Utrechtschen Heuvelrug bij 's-Graveland, dus aan de grens van den hoogen diluvialen Moraine-landrug en het daaraan grenzende laagveengebied. Het water had hier een pH van 5.5 en was rijk aan humuszuren, maar zeer arm aan minerale stoffen. De bodem van de sloot bestond uit bijna zuiver, maar ijzerhoudend, zand met ongeveer 4.7 % humus in de droge stof. Het watergehalte der monsters bedroeg 36.2 %.

In dezen grond was het microbenleven zeer armelijk; ik vond in den vloeibaren voedingsbodem slechts ongeveer 220 cellulosesplitsers,

terwijl op de platen hun totaal aantal op 2.100 bepaald werd. Daarvan waren ongeveer 1.700 actinomyceten, ± 250 schimmels, ± 80 cellvibrionen, ± 40 bacillen en ± 30 proactinomycetaceën, terwijl cytophagen en polyangiden in het geheel niet opgemerkt werden. Evenals in den zuren diluvialen boschgrond spelen de bacteriën hier dus een zeer ondergeschikte rol; zij ontbreken echter niet geheel. Ook de beteekenis der schimmels is hier niet groot; het zijn wederom de actinomyceten, die de eerste plaats innemen.

§ 5. VOORBEELDEN VAN ZOUTHOUDENDE MARIENE GRONDEN.

Relatief uitvoerig werden door mij ook de aan regelmatige overstroomingen met zeewater blootstaande gronden, dus schorren en slikken en ook de zeebodem onderzocht. Al deze gronden bewerkte ik gedurende de laatste jaren om geheel andere redenen vrij uitvoerig, zoodat ik daarbij ook de cellulose ontledende microflora goed leerde kennen. Daarom kunnen in het onderstaande over de saliene gronden vrij veel gegevens verstrekt worden.

Het grondigst heb ik eenige phytosociologisch gekarakteriseerde terreinen van de zandige kwelders en wadden van het Balgzand tusschen den Helder en Ewijcksluis onderzocht. Hier had ik een reeks van „Dauer-kwadraten" aangelegd, die regelmatig onderzocht werden. De reeks verliep van 1. hoog gelegen *Triticetum littoralae*, dus het hoogste, droogste buitendijksche terrein, over 2. *Festucetum rubrae* — het normale hooge rijpe schor — en 3. *Puccinellietum maritimae* — het lage groeiende schor — tot in het wad, waar nog twee kwadraten lagen: 4. in het hooge *Salicornietum herbaceae* — dus vlak vóór het schor — en 5. verder buiten in de zone van het smalbladige zeegras (*Zostera marina var. stenophilla*, Asch. et Gr.). De ligging der kwadraten ten opzichte van middel-hoogwater is voor 1: + 55 cm, 2: + 35 cm, 3: + 20 cm, 4: — 5 cm en 5: — 45 cm. Het zeewater heeft hier een zoutgehalte van gemiddeld ongeveer 29 gr/L, berekend als NaCl uit de chloortitratie volgens Mohr. In den bodem van de kwadraten 1 tot 3 is het zoutgehalte zeer wisselend, sterk afhankelijk van het weer en van de waterbeweging. De hierna volgende getallen hebben dan ook alleen betrekking op „normale" perioden, d. w. z. op perioden met een laag zoutgehalte.

In afwijking van andere terreinen met een graszode, waar deze niet mee bemonsterd werd, heb ik hier steeds van 0 tot 15 cm diep geboord, daar gebleken was, dat in het zand onder de zode zeer weinig microben voorkwamen.

In tabel XV zijn enkele gegevens over deze gronden vereenigd, waarbij men echter bedenken moet, dat het watergehalte in de nummers 4 en 5 vrijwel constant is, in de overige kwadraten echter zeer veranderlijk. Hier is dan ook slechts een globaal gemiddelde aangegeven.

Tabel XV.

Bodemkundige gegevens over de Balgzand-grondmonsters.

	1	2	3	4	5
Watergehalte	± 12	± 21	± 26	52	36
Humusgehalte	0.3	0.75	0.8	1.85	2.7
$CaCO_3$-gehalte	5.7	20.5	12.0	11.0	13.2
Kleigehalte	6	8	12	40	20

De pH is niet bepaald, maar in saliene gronden, welke aan de open zee zijn blootgesteld, is zij in den regel tusschen 7.75 en 8.00 gelegen.

In den vloeibaren voedingsbodem vond ik hier de volgende gemiddelde aantallen der celluloseontleders:

1 : 120.000; 2 : 50.000; 3 : 35.000; 4 : 20.000; 5 : 12.000.

De uitkomsten der plaattellingen zijn vereenigd in tabel XVI.

Tabel XVI.

Aantallen cellulose ontledende microben volgens plaattellingen in de Balgzandmonsters.

	1	2	3	4	5
Actinomyceten	650.000	120.000	100.000	29.000	1.900
Bacillen	150.000	40.000	45.000	12.500	1.000
Cellvibrionen	300.000	25.000	10.000	n. t.	n. t.
Totaal aantal	1.200.000	200.000	160.000	43.000	3.000

n. t. = niet telbaar wegens te gering aantal.

De overige groepen waren te zwak vertegenwoordigd om geteld te worden. Enkele cytophagen en proactinomyceten kwamen in kwadraat 1 nog voor; zij hadden numeriek echter geen beteekenis.

Men ziet uit deze getallen ten eerste, dat in den zouthoudenden grond het aantal celluloseontleders veel kleiner is dan in zoutvrije gronden. Dat geldt overigens ook voor de meeste andere microbengroepen. In de kwadraten 4 en 5 komt er bovendien ook de anaërobiose bij, waardoor in deze monsters eigenlijk alleen de bovenste centimeters

een eenigszins actieve microflora bezitten. Een tweede zeer opvallende bijzonderheid der hier gevonden getallen is de betrekkelijke rijkdom aan bacillen. In zoutlooze normale gronden nemen de sporenvormers steeds slechts een zeer bescheiden plaats in; hier echter volgen zij dadelijk op de actinomyceten en zijn zij dus de talrijkste van alle bacteriën. Slechts in het hoogst gelegen en aan zout armste kwadraat overwegen de cellvibrionen.

De bovenvermelde serie van „Dauer-kwadraten" is hier genomen als voorbeeld van saliene gronden. Ongeveer dezelfde uitkomsten vond ik in gelijksoortige gronden op het eilandje Griend, aan de Noordkust van Groningen en ook in zouthoudende gronden aan de binnenzijde van zeedijken (op Texel en Wieringen), waar wegens het lekken van water onder den dijk door het zoutgehalte steeds hoog blijft.

Overeenkomstige maar veel lagere getallen vond ik ook op verder naar buiten gelegen wadden en in diepere geulen in de waddenzee. Hier geef ik, wederom als illustratie, een reeks van monsters weer, genomen voor Roptazijl bij Harlingen in de diepere geul langs de kust en op den rand van de „Grienderwaard" (Ballastplaat). De vier monsters van deze reeks zijn:

1. Zeer jong slik met ± 30 % kleigehalte en 55 % watergehalte, zwart gekleurd door zwavelijzer, uit een diepte van 3 m water in het midden der geul.
2. Oud-holocene zandige klei met ± 25 % kleigehalte en 36 % watergehalte met fijne horizontale lagen, lichtgrijs gekleurd, uit een diepte van ongeveer 2½ m water.
3. Jong, zeer zandig slik met ongeveer 10 % kleigehalte en 24 % watergehalte, uit een diepte van ongeveer 1½ m water aan den westelijken rand der geul.
4. Jong zand met een kleigehalte van nauwelijks 5 % en een watergehalte van 19 %, van het diepliggende wad (ongeveer 0.80 m — N. A. P.) op de Ballastplaat, westelijk van de geul.

Het water in deze omgeving heeft een gemiddeld zoutgehalte van ongeveer 18 gram per liter, berekend als NaCl uit de chloortitratie volgens MOHR. Alle 4 monsters waren onbegroeid, herbergden echter vele weekdieren en wormen; 4 was een dicht bewoond *Arenicola*-wad (Wad-worm).

In den vloeibaren voedingsbodem vond ik in deze monsters: in 1—150; 2—150; 3—50; 4—750 cellulosesplitsers per gram grond. Dus zeer lage aantallen. Monster 4, van een plaats die zich niet voortdurend onder water bevindt, maar gemiddeld een paar uren daags droog ligt, heeft een eenigszins actiever microbenleven dan de andere monsters. De samenstelling van de cellulose ontledende microflora

is hier zeer eenvormig, want in telbaar aantal kwamen alleen actinomyceten en bacillen voor. In tabel XVII zijn de uitkomsten der plaattellingen vereenigd:

Tabel XVII.

Aantallen der cellulose ontledende microben in de zeebodemmonsters volgens de plaatmethode.

	1	2	3	4
Actinomyceten Sporenvormers	200 150	250 50	75 25	850 450
Totaal aantal	350	300	100	1.300

In 4 kwamen ook ongeveer 30 cellvibrionen per gram voor. De relatief belangrijke rol der bacillen in zouthoudende gronden is dus zeer algemeen en geldt zoowel voor permanent ondergeloopen als ook voor slechts bij tijden door zeewater overspoelde gronden.

Het was juist uit deze zoute monsters uit de diepere geulen van de waddenzee, dat ik de op vibrionen gelijkende bacillen isoleerde. Niet alle hier aangetroffen bacillen behooren tot deze groep, maar in sommige monsters toch meer dan de helft. De overige zijn meestal vertegenwoordigers van de „clostridium"-groep.

Ten slotte zij hier nog medegedeeld, dat de microflora van den grond in het gebied van de noordoostelijke bedijking in het IJselmeer in het jaar 1938 nauwkeurig werd onderzocht, en dat daarbij ook de celluloseontleders beoordeeld werden. Het water, alsook de bovenste lagen van den grond waren toen — verscheidene jaren na de afsluiting der Zuiderzee — reeds ontzilt; de grond is echter voor het grootste deel nog in het brakke water der voormalige Zuiderzee gevormd, is dus een jong-mariene afzetting.

Gemiddeld vond ik hier met behulp van de plaattellingen ongeveer 40.000 actinomyceten, 1.000 cellvibrionen en tegen de 200 proactinomyceten. In totaal dus ruim 40.000 celluloseontleders per gram. De overige groepen waren niet telbaar, daar zij slechts zeer sporadisch voorkwamen. Deze gemiddelde waarden hebben echter zeer weinig beteekenis, daar de plaatselijke schommelingen zeer groot waren, en ik totaalwaarden vond, wisselend tusschen ± 400 en ± 90.000 per gram, afhankelijk van de bodemgesteldheid. Dit onderzoek van den IJselmeerbodem heeft mij dus wederom duidelijk getoond, dat het aantal en de werkzaamheid der microben op den bodem van wateren

zich niet zoozeer richten naar den aard van het water, maar in de eerste plaats naar de gesteldheid van den bodem.

In vergelijking met de in den IJsel bij Kampen gevonden getallen was de IJselmeerbodem dus nog zeer arm aan celluloseontleders, maar toch reeds veel rijker dan de bodem der waddenzee. Ook de samenstelling der microflora bleek reeds grondig veranderd te zijn.

§ 6. CELLULOSEONTLEDING IN EEN TUINCOMPOST.

Celluloseontleding in grooten omvang is in de natuur volstrekt niet tot den grond beperkt, zelfs niet wanneer men het begrip „grond" zoo breed opvat als ik dit hier gedaan heb. Ook in kunstmatige en natuurlijke ophoopingen van organische stoffen, zooals mest, compost, geactiveerd slib, boschhumus, enz., en ook in verontreinigd water en in vloeivelden vindt men, een soms zelfs zeer levendige, celluloseontleding. Het onderzoek van al deze milieu's moest echter voorloopig achterwege blijven, daar ik mij wegens gebrek aan tijd tot den grond moest beperken. Slechts één tuincomposthoop heb ik in het onderzoek betrokken. De hoop was opgebouwd uit de gebruikelijke afvalstoffen van een bloemen- en groententuin, vermengd met zand en sintels van de tuinpaden. Ook geiten-, konijnen- en kippenmest werd regelmatig daarin verwerkt. De hoop was ten tijde van het onderzoek reeds bijna 2 jaren oud, terwijl in den loop van het laatste jaar geen versche afvalstoffen meer daarop werden geworpen. Ongeveer een half jaar vóór het begin van het onderzoek was de geheele hoop gekeerd en gemengd geworden en had bovendien een flinke bemesting met Thomasslakkenmeel en patentkali gekregen. De massa was daardoor al vrij sterk vergaan en maakte den indruk van mest of aarde.

Deze composthoop werd op dezelfde wijze onderzocht als ik dit gedaan heb met de verschillende typen grond, dus onbehandeld en na bemesting met cellulose in groote petrischalen. Reeds in onbehandelden toestand was deze compost buitengewoon rijk aan microben. De plaattellingen op den universeelen voedingsbodem leverden als totaal aantal microben ± 280.000.000 per gram op, terwijl het totale aantal der celluloseontleders in den vloeibaren voedingsbodem ± 10.000.000 en op de celluloseagarplaten ± 45.000.000 per gram was. In den vloeibaren voedingsbodem waren het ook hier weer uitsluitend cellvibrionen en bacillen. Op de platen telde ik echter ongeveer: 23.000.000 actinomyceten, 8.500.000 cellvibrionen, 6.000.000 bacillen, 4.000.000 schimmels, 1.500.000 proactinomyceten en 1.000.000 cytophagen.

De ingegraven papierschijven verdwenen met een ongeloofelijke snelheid, zoodat zij bij kamertemperatuur reeds in den loop van 14

dagen geheel onvindbaar waren en in de thermostaat, bij 28° tot 30° C, werd het papier al in 10 dagen volkomen verteerd. In den op deze wijze met papier bemesten compost vond ik een nog veel grooter aantal celluloseontleders: de vloeibare voedingsbodem gaf ongeveer 25.000.000 (cellvibrionen en bacillen) per gram, en op de platen kwamen per gram ongeveer 83.000.000 celluloseontleders tot ontwikkeling, waarvan 40.000.000 tot de actinomyceten, 18.000.000 tot de cellvibrionen, 14.500.000 tot de bacillen, 6.500.000 tot de schimmels en 4.000.000 tot de cytophagen behoorden. De polyangiden en de proactinomyceten waren nu geheel op den achtergrond geraakt.

Deze basenrijke, oude, goed geaëreerde tuincompost bevatte dus een bijzonder rijke microflora, welke ook cellulolytisch buitengewoon actief was. In geen enkele grondsoort heb ik ook maar bij benadering zulke hooge getallen gevonden. Bovendien is het opmerkelijk, dat de actinomyceten in den compost nog wel de talrijkste groep vormen, maar toch niet zóó sterk overheerschen als in de minerale gronden. Als men daarbij nog bedenkt, dat mogelijkerwijze een groot deel der gevonden actinomyceten zich als rustende sporen in het substraat bevindt, dan komt men tot de conclusie, dat hier niet de actinomyceten, maar de bacteriën en myxobacteriën de hoofdrol spelen bij de celluloseontleding.

Een tweede gevolgtrekking geloof ik te mogen maken uit de vóór en nà de bemesting met papier verkregen getallen. Het valt daarbij nl. op, dat de polyangiden en proactinomyceten niet snel in aantal konden toenemen en daardoor relatief achteruitgingen. Hetzelfde zag men ook reeds bij eenige andere grondsoorten. De polyangiden en proactinomyceten schijnen dus, als zeer traag groeiende organismen, in een cellulolytisch werkzame omgeving eigenlijk niet mee te kunnen komen, vooral niet bij plotselingen toevoer van versche cellulose. In zulke zeer snel en zeer krachtig werkende populaties ontbreken overigens alle traag groeiende organismen; zelfs de typische actinomyceten kunnen het tempo niet volgen en geraken daardoor op den achtergrond. Daarentegen veroveren hier de zich zeer snel vermeerderende cellvibrionen en bacillen het terrein.

De in de compost voorkomende cellvibrionen behooren, in tegenstelling tot die uit minerale grondsoorten, hoofdzakelijk tot de groepen I*b* en I*c*, (de zeer korte en de niet of weinig gekromde soorten). Het zijn dus meestal de zeer omnivore, weinig karakteristieke vormen, die hier de hoofdrol spelen. Onder de cytophagen komen zoowel cystenlooze als cystenvormende soorten voor. De eerste overheerschen echter sterk in aantal. De rijk vertegenwoordigde bacillen ten slotte komen hier in vrijwel alle vormen voor. Het talrijkst zijn echter ook hier de „clostridium"-achtige soorten.

§ 7. VERLOOP DER CELLULOSEONTLEDING IN GRONDMONSTERS MET STERK GEWIJZIGD VOCHTGEHALTE.

In verscheidene der tot nu toe beschreven proeven met het ingraven van filtreerpapierschijven in den grond heb ik, naast de op optimale vochtigheid gehouden schalen, er ook enkele bijzonder nat gemaakt, zoodat de aarde in de schaal vrijwel met water verzadigd was. Hierdoor onderging het geheele microbenleven in den grond een radicale verandering. Ook de ontleding van het papier verliep in zulke natte schalen geheel anders dan in de normaal gehoudene. Steeds werd de intensiteit der celluloseontleding hierdoor sterk gedrukt, zoodat het veel langer duurde voordat het papier geheel verdwenen was. In de zware gronden vormde zich plaatselijk zelfs volkomen anaërobiose, waardoor de grond de karakteristieke zwarte kleur aannam en een duidelijken zwavelwaterstofreuk verspreidde. Tusschen zulke anaërobe kluiten bevonden zich dan, meestal langs de scheurtjes, wortelkanaaltjes, enz., aërobe strooken. Bij het uitgraven der papierschijven was het duidelijk te zien, dat het papier in de aërobe gebieden veel sneller verteerd werd dan in de anaërobe. Soms was het papier langs de scheuren reeds geheel verdwenen, terwijl het in de zwart gekleurde partijen nog zeer goed behouden was. De anaërobe celluloseontleding verloopt onder deze omstandigheden dus aanzienlijk langzamer dan de aërobe.

Maar niet alleen de intensiteit van de celluloseontleding, ook de samenstelling van de microflora is radicaal gewijzigd. Nauwkeurige tellingen heb ik in zulken nat gehouden grond slechts bij uitzondering uitgevoerd, daar deze toestand voor die grondsoorten geen normale is. Wel echter heb ik, steeds schattenderwijze, de samenstelling der microflora beoordeeld. In de meeste gevallen veroorzaakte het hooge watergehalte een sterke verschuiving ten gunste van de schimmels en bacillen, terwijl de cytophagen en polyangiden daaronder zeer sterk leden, ja soms zelfs geheel verdwenen. De cellvibrionen en actinomyceten bleven dikwijls ongeveer in hunne oorspronkelijke positie. Absoluut genomen werden natuurlijk alle groepen door het hooge watergehalte sterk gehinderd, zoodat het totale aantal celluloseontleders sterk daalde.

Den tegengestelden toestand, waarbij dus oorspronkelijk met water verzadigde grond, zooals de uit den bodem van verschillende wateren gestoken monsters, langzamerhand tot den vochtigheidsgraad van normaal geaëreerde aarde gedroogd werden, heb ik slechts in één geval onderzocht, nl. bij het uit het IJselmeer gebaggerde slik, dat in den loop van vele maanden als dikke laag op een onderlaag van grof zand op een dijk kon indrogen. Daar vond ik in den onbemesten

grond bij plaattellingen ongeveer 30.000 celluloseontleders per gram grond, wat verbazend weinig is, omdat oorspronkelijk de bodem van het IJselmeer in het gebied, waar de grond gebaggerd was, zelf al ongeveer 20.000 celluloseontleders per gram bevatte. Ruim 5 maanden aëratie en indroging hadden dus nog zeer weinig uitgericht. De samenstelling van de microflora was hier volkomen normaal; op de eerste plaats stonden de actinomyceten, gevolgd door de cellvibrionen en daarna door de proactinomyceten en de bacillen.

§ 8. DE INVLOED DER TEMPERATUUR OP DE CELLULOSEONTLEDING.

Terwijl ik dus met zekerheid kon vaststellen, dat wijzigingen in het watergehalte van den grond zeer ingrijpende veranderingen onder de celluloseontleders veroorzaakten, bleken deze tegenover kleine temperatuurswisselingen vrij onverschillig te zijn. Alle tot nu toe beschreven tellingen werden nl. uitgevoerd bij kamertemperatuur, dus bij ongeveer 18° C. In enkele gevallen heb ik echter de temperatuur op 29° C gebracht. Het resultaat was echter steeds ongeveer hetzelfde als bij 18° C, alleen verliep de ontleding van de cellulose dan aanzienlijk sneller. Zoo werden in den grond van het oude grasland bij Medemblik de papierschijven dan reeds in ongeveer 4 weken volledig verteerd, terwijl bij kamertemperatuur 5 tot 6 weken daarvoor noodig waren; en in den tuincompost verdween het papier dan, zooals reeds medegedeeld, in 10 dagen.

In één geval, nl. bij dezen tuincompost, heb ik nog een derde temperatuur toegepast, nl. ongeveer 35° C. Hierdoor steeg het totale aantal der celluloseontleders tot 173.000.000 per gram en de intensiteit der ontleding van het papier werd nóg meer verhoogd. Nu onderging echter ook de samenstelling der cellulolytische microflora zeer merkbare veranderingen. De schimmels en de cytophagen waren zoo goed als verdwenen, terwijl de actinomyceten, cellvibrionen en bacillen nu vrijwel de eenige celluloseontleders waren. Bij kamertemperatuur was de numerieke verhouding der laatstgenoemde 3 groepen 20 : 9 : 7. Nu was zij gewijzigd in 9 : 15 : 6. De cellvibrionen waren dus bijzonder talrijk geworden. Het waren echter grootendeels speciale korte, gele, cellulolytisch vrij actieve, soorten, die in normalen grond zelden talrijk zijn, hier in den compost echter steeds een groote rol spelen en nu bij die hooge temperatuur letterlijk de geheele massa doortrokken. Toch bleek bij nader onderzoek, dat deze soorten geen echte thermophielen zijn, daar hun temperatuuroptimum bij 34° tot 35° C ligt, met een maximum van nauwelijks eenige graden hooger.

Bij deze verhoogde temperatuur had zich dus een belangrijke verandering bij de celluloseontleders voltrokken en bij nog hoogere temperaturen kan men nog meer ingrijpende veranderingen verwachten, daar men dan reeds spoedig de maxima der gewone mesophiele organismen overschrijdt en in het gebied der thermophielen komt. Jammer genoeg moest ik ook deze onderzoekingen wegens gebrek aan tijd afbreken. Het is echter zeker de moeite waard de celluloseontleding bij verschillende temperaturen — ook de zeer lage, zooals zij in het koude jaargetijde in den grond heerschen — nauwkeurig na te gaan.

Alle andere uitwendige factoren, zooals zuurgraad (pH), reductie-oxydatiegraad (Redoxpotentiaal), stikstofvoeding, phosphaat- en kaligehalten, enz. moesten geheel buiten beschouwing gelaten worden. Wel vertegenwoordigen de onderzochte grondsoorten vele verschillende toestanden met betrekking tot al deze factoren, maar stelselmatige proeven hierover werden niet uitgevoerd.

§ 9. „HOOFD"-SOORTEN BIJ DE CELLULOSEONTLEDING.

Tot nu toe heb ik alle vertegenwoordigers van de grootere systematische eenheden bijeengehouden, zoodat alleen deze groote eenheden onderscheiden werden. In het onderstaande wil ik echter ook enkele bijzonder belangrijke soorten apart bespreken. Het speciale belang van de hier te noemen soorten is gelegen in hun dominantie boven alle andere. In de meeste gevallen treedt nl. één, of ten hoogste eenige weinige soorten zóó op den voorgrond, dat men dan gerust van „hoofd"-celluloseontleders kan spreken. Zulke hoofdsoorten zijn niet steeds dezelfde in de verschillende gronden; het zijn echter in elk geval zeer levenskrachtige en daardoor zeer belangrijke cellulosesplitsers, die in massa's kunnen optreden, en dan ook kwantitatief de hoofdrol spelen bij de celluloseontleding. Dat zulke hoofdsoorten zeer konstante verschijningen zijn en niet slechts toevallig in de onderzochte monsters voorkomen, volgt daaruit, dat ik ze in analoge gevallen en in gelijksoortige gronden steeds weer aantrof, waar en wanneer ik de monsters ook nam.

Zeer duidelijk waren zulke hoofdsoorten in den zwaren grond van de Wieringermeer, nà bemesting met cellulose. Hier trad nl. een der twee onderstaande actinomyceten op den voorgrond, naar gelang de grond een optimaal watergehalte had of met water verzadigd was. In het eerste geval was het een typische vertegenwoordiger van mijn groep V (= *A. fradii-asteroides* van WAKSMAN), in mijn verzameling voorkomende onder nr. $V_{A.K.\,II}$ terwijl in den natten grond een

actinomyces-soort uit mijn sub-genus der substraatsporenvormers, die WAKSMAN als *A. diastaticus* herkende, en die in mijn verzameling als nr. $V_{A.K.\ I}$ voorkomt, in massa's optrad. Een nadere beschrijving van deze beide soorten is overbodig, daar zij typische vertegenwoordigers van hun groepen zijn, zoodat de op blz. 110—111 gegeven beschrijving ook voor hen geldt. Naast deze actinomyceten traden in den droog gehouden grond ook een polyangide en een typische lange cellvibrio duidelijk op den voorgrond. De polyangide behoort tot de meest actieve celluloseontleders, die ik onder deze microben gevonden heb. Het is een relatief snel groeiende soort, welke in jonge cultures zeer lange cellen vormt van 4 tot 6 μ lengte. In de agar is zij gekarakteriseerd door zeer vroege vorming der vruchtlichamen. Deze zijn meestal centraal in de kolonie gelegen en groeien tot een zeer groot samengesteld lichaam uit, dat door eenige kleinere omgeven is. Aan den omtrek der kolonie vormen zich daarentegen geen macrocysten. De koloniën groeien niet lang door en blijven daardoor betrekkelijk klein. Bij het ouder worden concentreeren zich bijna alle cellen in het groote centrale vruchtlichaam, dat somtijds zelfs met het bloote oog zichtbaar is, zoodat de kolonie er omheen op een bijna leeg oplossingsgebied in de agar lijkt. De kleur is eigeel. De in de macrocysten ontstane sporen, die door talrijke begeleidende cellen omgeven zijn, vallen bij deze soort op door hun grootte — zij zijn nl. gemiddeld 3 μ lang en 1,5 μ dik. Deze buitengewoon sterk verbreide en zeer werkzame polyangide, die in mijn verzameling voorkomt onder het nummer Pol. 2, heb ik niet alleen in den bodem van de Wieringermeer, maar zeer algemeen in alle basenrijke zware gronden aangetroffen, zelfs wanneer zij onvoldoende ontwaterd zijn.

De cellvibrio van dezen grond behoort tot mijn groep I A (zie pag. 60); het is dus een typische vertegenwoordiger der geheele klasse. In de verzameling is hij opgenomen als nr. IV_{11}; van het type wijkt hij slechts daarin af, dat hij de agar sterker en duidelijker aantast dan de meeste andere stammen. Hij nadert dus in zekeren zin de *Microspira agarliquefaciens* van GRAY en CHALMERS, KLUYVER en V. D. LEK (= mijn stam IV_{12}).

Vóór de bemesting met papier traden in deze gronden geen soorten duidelijk als hoofd-celluloseontleders op den voorgrond, hoewel ik achteraf kon vaststellen, dat de zooeven beschreven organismen ook toen reeds talrijk vertegenwoordigd waren. Hun stormachtige vermeerdering had echter pas na de bemesting met cellulose plaats. Deze soorten behooren dus niet tot de z.g. „autochtone" flora van den grond in den zin van WINOGRADSKY. Het zijn integendeel typische vertegenwoordigers der soorten, die zich massaal ontwikkelen op

versch materiaal. Maar daarom zijn zij niet minder belangrijk; alleen komt hun een andere rol toe dan aan de echte autochtone soorten. De celstofrijke afvalstoffen bevinden zich in den grond immers ook steeds in den vorm van grovere plantendeelen, dus plaatselijk opgehoopt, en het zijn juist zulke snel groeiende soorten, die de eerste ontleding ervan veroorzaken, terwijl de autochtone soorten pas later de kwantitatief onbelangrijke geïncrusteerde of op eenige andere wijze geconserveerde resten der cellulose afbreken. Het is m. i. daarom niet juist, alleen de autochtone microflora van den grond als belangrijk te beschouwen en de soorten, die in den niet met cellulose bemesten grond van normale samenstelling nauwelijks voorkomen, maar na een toevoeging van cellulose plotseling in massa's verschijnen, slechts als gelegenheidsbewoners voor te stellen, zooals WINOGRADSKY en met hem ook anderen dat doen. Ik meen integendeel, dat kwantitatief ten minste drie kwart van alle biochemische processen in den grond op rekening der „gelegenheids-microben" gesteld moet worden, terwijl de echte autochtone flora een energetisch onbelangrijk leven leidt en zich slechts langzaam ontwikkelt.

In tegenstelling tot de jonge basenrijke gronden van de Wieringermeer vond ik in het oude weiland op kleigrond bij Medemblik geen eigenlijke hoofdsoorten. Ook na de bemesting met cellulose waren het steeds verscheidene actinomyceten, die numeriek ongeveer even sterk vertegenwoordigd waren. De in de Wieringermeerbodem zoo algemeen optredende stam $V_{A.K.\,II}$, was ook hier een der belangrijkste, overheerschte echter niet zoodanig als daar.

In de basenrijke mariene zandgronden, b.v. in het zandige gebied van de Wieringermeer, treden echter wederom eenige soorten zeer duidelijk als hoofd-celluloseontleders op. Houdt men dezen grond na de bemesting met cellulose zeer nat, dan ontwikkelt zich daarin zoo goed als uitsluitend één schimmelsoort, nl. *Stachybotrys alternans* BON., die zich bij de plaattellingen soms bijna als een zuivere cultuur ontwikkelt. Bij optimaal vochtgehalte behoort deze schimmel eveneens tot de talrijkste celluloseontleders in dezen grond; daarnaast komen dan echter ook zeer veel cellvibrionen voor, waaronder één tot de groep der kleincellige soorten behoorende stam bijzonder talrijk is. Het is op zichzelf een onaanzienlijk organisme, dat ook cellulolytisch niet bijzonder actief is; het is echter gekarakteriseerd door zijn hardnekkige symbiose met een der de cellulose niet splitsende cytophagen. Bij de plaattellingen kreeg ik in den regel eenige *Stachybotrys*-koloniën met daartusschen vele kleine oplossingsvelden van de in symbiose levende *Cellvibrio-Myxobacter*, die oppervlakkig op kleine cytophagenkoloniën geleken.

In den zuren podsolzandgrond traden na bemesting met cellulose 3 soorten van schimmels duidelijk als hoofdsoorten naar voren. Het talrijkst was de actieve celluloseontleder *Cladosporium pisicolum* SNYDER, die op de celluloseagarplaten zeer groote, dikwijls de geheele plaat bedekkende koloniën vormde. Op de tweede plaats staat een *Chaetomium*-soort, die eveneens groote en snel groeiende koloniën vormt, maar de cellulose veel trager ontleedt, zoodat de oplossing pas laat intreedt en in het begin slechts zichtbaar is in het oudste centrale deel der kolonie. Op de derde plaats volgt dan *Humicola grisea* TRAAEN, die betrekkelijk traag groeiende koloniën vormt, met de afscheiding van een zwarte kleurstof aan den rand der kolonie, waardoor deze zwart omrand lijken. Een nadere morphologisch-physiologische beschrijving dezer schimmels behoeft hier niet gegeven te worden, daar het in den regel bekende soorten zijn, zoodat daarvoor naar mycologische verzamelwerken verwezen kan worden [1]). Met hun drieën vormen deze soorten ongeveer $^5/_6$ van alle in den podsolgrond voorkomende schimmelkoloniën.

In door water verzadigde gronden — b.v. in het slik op den bodem van wateren — heb ik zelden duidelijke hoofdsoorten gevonden. In zoet water kon ik zulke soorten slechts in het versch bezonken fijne slik aan den IJselmond waarnemen. Daar waren een actinomyceet uit de groep V (verzameling-nr. V_{56}) en een zeer groote intensief geel gekleurde *Cellvibrio* (verzameling-nr. $IV_{K.2}$) de talrijkste celluloseontleders.

In zout water, nl. in de diepere geulen van de Waddenzee, vond ik vaak, dat in jonge zware slikken eenige soorten der vibrioachtige bacillen op den voorgrond traden, soms zelfs zoodanig, dat zij vrijwel reine cultures leverden bij het uitzaaien der grondsuspensie op celluloseagarplaten. De stam, die daarbij het meest opviel is een typische vertegenwoordiger dezer groep. Hij vormt in jonge cultures zeer lange vlak gewonden spiralen met een lengte tot 20 μ en een dikte van $^1/_3$ tot $^1/_2$ μ. Bij de sporulatie zwellen de staafjes dikwijls als plectridiën op. Deze stam groeit zeer snel en is helder geel gekleurd.

Ten slotte komen, zooals reeds gezegd, in den onderzochten tuincompost dikwijls één of eenige verwante stammen van kortcellige, zeer beweeglijke cellvibrionen zoo talrijk voor, vooral na bemesting met cellulose, dat men ze numeriek als hoofdsoorten kan bestempelen. Overigens zijn deze stammen vrij inactief en omnivoor, zoodat het volstrekt niet zeker is, dat zij ook kwantitatief bij de celluloseontleding

---

[1]) De determinaties der schimmels dank ik aan de zeer gewaardeerde hulp van Prof. Dr. JOH. WESTERDIJK.

een belangrijke rol spelen. Deze groep van cellvibrionen vond ik steeds slechts in ophoopingen van organische stoffen, hetgeen ook begrijpelijk is, daar zij alleen bij voldoende toevoer van vitamineachtige groeistoffen kunnen gedijen. Zij zijn zóó karakteristiek voor mest, compost, e.d., dat ik ze zelfs als een afzonderlijk „mest"-type der cellvibrionen aanduid. Zij zijn meestal duidelijk geel gekleurd, vermeerderen zich bij gunstige voedingstoestanden zeer snel, vormen op de platen echter nooit groote koloniën, en ontleden de cellulose slechts zwak. Morphologisch zijn het wel echte cellvibrionen, maar zij zijn zeer kort en hebben zeer onregelmatig ingeplante zweepdraden.

§ 10. BETEEKENIS VAN DE SPECIFICITEIT DER CELLULOSESPLITSERS.

In aansluiting aan het in dit hoofdstuk medegedeelde over het voorkomen en de beteekenis der cellulosesplitsers in de verschillende gronden, wil ik hier nog mijn, van het algemeen geldende standpunt afwijkende, zienswijze over de beteekenis van de specificiteit dezer organismen voor de afbraak der cellulose naar voren brengen. Reeds dikwijls is de meening verkondigd, dat alleen de specifieke cellulose-ontleders in de natuur van belang zijn, terwijl alle omnivore organismen, die evengoed of zelfs beter van gemakkelijker te ontleden verbindingen kunnen leven, slechts in het laboratorium als celluloseontleders optreden, in de natuur daartoe echter geen gelegenheid hebben, zoodat zij dààr als zoodanig van geen belang zijn. Vooral WINOGRADSKY heeft dit standpunt ontwikkeld (214, 215, 216), maar ook WAKSMAN, DUBOS (198, 202) en vele andere onderzoekers sluiten zich daarbij aan. Nauwkeurige kwantitatieve bewijzen voor de juistheid hunner meening hebben zij echter niet geleverd. Zij baseeren zich uitsluitend op het feit, dat er in de natuur geen selectieve media voorkomen, en dat er naast cellulose steeds andere organische stoffen aanwezig zijn. Dit is echter een al te rekbare stelling om zonder meer als argument gebruikt te mogen worden. Daarom wil ik nu trachten deze vraag op kwantitatieve basis nader onder oogen te zien.

In het vorige hoofdstuk werd bij de behandeling der microben steeds ook hun specificiteit tegenover de cellulose vermeld, zooals deze in het laboratorium op kunstmatige voedingssubstraten bepaald kon worden. Als voornaamste uitkomst dezer onderzoekingen kan er op gewezen worden, dat de hoeveelheid der ontlede cellulose bij alle onderzochte organismen — d. w. z. de specifieke zoo goed als de omnivore — op ongeveer gelijke wijze door oplosbare stoffen beïnvloed wordt. De niet in het bijzonder op cellulose aangewezen

organismen tasten de cellulose slechts in aan oplosbare voedingsstoffen arme media aan. Bij een gehalte van 0.25 % of meer van voor hen opneembare oplosbare organische stoffen echter wordt de cellulose eigenlijk niet meer ontleed, hoe weelderig zij daarbij ook mochten groeien. De specifieke celluloseontleders, zooals eenige cellvibrionen en de cytophagen, worden echter door 0,25 % suiker reeds zóó in hun groei gestoord, dat zij daardoor ook veel minder cellulose ontleden. Het is voor de celluloseontleding als zoodanig dus vrij onverschillig, of zij door specifieke of omnivore organismen tot stand wordt gebracht; in een rijken voedingsbodem, welke meer dan ongeveer 0.25 % oplosbare organische stoffen bevat, verloopt zij toch slechts langzaam of in het geheel niet. Een levendige celluloseontleding is dus alleen mogelijk in een schraler milieu.

In gemengde of in ruwe cultures krijgt men weliswaar den indruk, alsof deze voor zuivere cultures op kunstmatige voedingsbodems geldende regel niet meer juist is, want daarbij wordt zelfs in suiker- en eiwithoudende voedingsbodems soms nog veel cellulose afgebroken. In werkelijkheid is de toestand echter ook daar dezelfde; het eenige verschil is, dat de snelle vertering van alle oplosbare voedingsstoffen door de soorten- en individuenrijke flora zeer spoedig een milieu doet ontstaan, dat arm aan voedingsstoffen is, en dan zet ook de ontleding van de cellulose krachtig in.

In beginsel is het m. i. alleen hierdoor al niet juist om aan de specifieke celluloseontleders een grootere rol toe te schrijven dan aan de niet specifieke. Zulks zou eventueel nog gerechtvaardigd zijn, indien de eersten uit anderen hoofde productiever zouden zijn, b.v. veel sneller zouden groeien of ook bij ongunstige levensvoorwaarden zouden gedijen. Dat is echter zeer zeker niet het geval. Integendeel, de microben, die het weelderigst en snelst groeien, zijn steeds omnivore soorten, en ook de meeste der waargenomen „hoofd"-soorten zijn in den regel geen specifieke celluloseontleders.

Bovendien moest nu echter ook nagegaan worden, of er storend hooge concentraties van oplosbare voedingsstoffen in de natuur voorkomen. Allereerst moest ik dus onderzoeken, wat het gehalte aan oplosbare organische voedingsstoffen in normale gronden is. Litteratuuropgaven hierover zijn zeer schaarsch en bovendien ook alleen geldig voor den éénen onderzochten grond. Ik moest deze grootheid dus zelf bepalen. Om zooveel mogelijk onafhankelijk te zijn van de soort der opgeloste stoffen en ook om alle organische verbindingen gezamenlijk te omvatten, heb ik in uit grond bereide extracten en perssappen hoofdzakelijk de bepaling van de koolstof als basis genomen, en wel met de vereenvoudigde elementairanalyse volgens TER MEULEN en

HESLINGA. Het extract of het perssap werd hiertoe, door aanzuren en opkoken eerst carbonaatvrij gemaakt. Daarna werd de reactie weer ongeveer op het neutrale punt gebracht, om latere vervluchtiging van mogelijk ontstaand koolzuur onmogelijk te maken, en het extract werd dan op het waterbad tot een klein volume ingedampt, waarna de rest kwantitatief in schoone uitgegloeide asbestwatten opgezogen werd. Deze asbestwatten droogde ik dan zoo goed mogelijk bij een temperatuur van ten hoogste 85° C, waarna de geheele massa der watten op de gewone wijze in de verbrandingsbuis gebracht werd ter bepaling van de hoeveelheid koolstof. De zoo verkregen getallen geven dus de koolstof per eenheid grondsap. Daar echter de aard der aanwezige oplosbare stoffen niet bekend is, is het niet mogelijk uit de koolstofgetallen het totale gehalte aan organische verbindingen of haar calorische of voedingswaarde te berekenen. Hierbij moet men dus van bepaalde willekeurige onderstellingen uitgaan. Om er zeker van te zijn geen te geringe hoeveelheden en voedingswaarden te verkrijgen, heb ik voor de berekeningen aangenomen, dat de totale hoeveelheid gevonden koolstof in den grond als glucose aanwezig was. In werkelijkheid is een deel der oplosbare organische producten beslist waardeloos of slechts van geringe voedingswaarde, zoodat mijn berekende glucosegehalten zeker te hoog zijn. Toch bleken zij echter nog zeer laag te zijn. In normalen zwaren akkergrond vond ik nl. gemiddeld slechts 0.015 % „glucose" in het bodemvocht, terwijl de jonge kleigrond van den Wieringermeerpolder zelfs slechts 0.01 % bevatte. In zandigen grond zijn deze getallen nog veel lager. In kalkhoudenden zeezandgrond vond ik nauwelijks 0.007 % „glucose" en in humushoudend, zuur, diluviaal zand (podsolprofiel) niet meer dan 0.017 %. Alleen in veengronden en in tuincompost kreeg ik hoogere getallen, die echter bij veen zeker niet toe te schrijven zijn aan hoogwaardige suikers, maar aan de resistente humuszuren.

Men ziet dus, dat in het algemeen in normale gronden slechts zeer geringe gehalten aan oplosbare organische verbindingen voorkomen. Deze kunnen de ontleding der cellulose niet merkbaar remmen, zoodat alle cellulose splitsende microben steeds ongehinderd de cellulose als voornaamste voedingsstof kunnen gebruiken. Mijn ervaring heeft dus geleerd, dat de zoo dikwijls uitgesproken meening, dat alleen de specifieke celluloseontleders werkelijk van belang zijn, niet houdbaar is. Voor het beoordeelen van de beteekenis van een microbe voor de celluloseontleding in den grond komt het er veel meer op aan de snelheid van haar groei en haar levensbehoeften te leeren kennen. Zoo kunnen m. i. de zeer algemeene snelgroeiende, kortcellige, omnivore cellvibrionen een even groote of nog grootere rol spelen

dan de meer of minder specifieke soorten onder de typische lange cellvibrionen. En zelfs de zeer traag groeiende en niet specifieke polyangiden kunnen door hun soberheid soms toch van groot belang zijn. Ook ben ik er van overtuigd, dat de wegens hun duidelijke omnivorie dikwijls als celluloseontleders miskende actinomyceten toch als zoodanig een zeer groote rol in den grond spelen.

§ 11. RESUMÉ.

Overziet men alle in dit hoofdstuk behandelde onderwerpen, dan kan men er enkele algemeene conclusies uit trekken:

Ten eerste ben ik op grond van de tellingen tot de overtuiging gekomen, dat eigenlijk álle systematische groepen van celluloseontleders van groote beteekenis kunnen zijn, en dat zij alle een actief aandeel hebben aan de celluloseontleding. Het hangt slechts van de uitwendige factoren af, welke groepen op den voorgrond treden.

Het is dus zeer moeilijk een antwoord te geven op de veel betwiste vraag, welke microben de belangrijkste celluloseontleders zijn. Deze vraag is eigenlijk ook niet juist gesteld, want elke systematische groep heeft haar bijzondere beteekenis en is in bepaalde omstandigheden de „belangrijkste". In groote lijnen kan men de volgende rolverdeeling opmaken: bij de eerste phasen der ontleding van versche cellulose-houdende stof spelen in goed geaëreerde, basenrijke, zware gronden de cellvibrionen de hoofdrol, naast de polyangiden, actinomyceten en cytophagen; in kalkrijke zandgronden treden in zulke gevallen cellvibrionen en schimmels naar voren. In zure podsolgronden zijn het uitsluitend de schimmels, terwijl in de slecht geaëreerde met water verzadigde gronden cellvibrionen en bacillen de voornaamste zijn, de laatste hoofdzakelijk in zouthoudende mariene gronden. Bij de latere phasen der celluloseontleding in meer of minder geconsolideerde omstandigheden komt de hoofdrol bij alle basenrijke geaëreerde gronden aan de actinomyceten toe, met medewerking van de proactinomyceten en de polyangiden, terwijl de met water verzadigde gronden dan actinomyceten en bacillen als de belangrijkste ontleders bevatten. In ophoopingen van organische stoffen met een hoog basengehalte tenslotte zijn het steeds de cellvibrionen naast de actinomyceten, bacillen en cytophagen, die zeer talrijk en zeer actief zijn. Zoo komt elk der groepen een bepaalde rol toe. De eigenlijke „autochtone" cellulolytische microflora in normale gronden bestaat voornamelijk uit actinomyceten, proactinomyceten en polyangiden; alle andere groepen worden steeds pas door cellulosebemesting tot volle activiteit gebracht. De anaërobe milieu's zijn hier met opzet niet

genoemd, daar zij een geheel op zichzelf staand onderwerp vormen, dat in dit werk buiten beschouwing is gelaten. Daar zijn trouwens zoo goed als uitsluitend sporenvormers werkzaam.

Ten tweede moet er nogmaals op gewezen worden, dat de actinomyceten in vrijwel alle gronden numeriek op de eerste plaats staan. Zij zijn dus ontegenzeggelijk een zeer belangrijke groep bij de celluloseontleding. Of hun rol echter wel zóó groot is als uit hun talrijkheid zou volgen, is nog zeer de vraag. Het maakt integendeel den indruk, dat de actinomyceten en ook de schimmels voor het meerendeel als latent levende eenheden (sporen) in den grond aanwezig zijn en dat dus slechts een klein deel aan de celluloseontleding actief deelneemt.

Als derde gevolgtrekking, kan ten slotte erop gewezen worden dat de aërobe bacillen, in tegenstelling tot de algemeene meening, volstrekt niet zonder beteekenis zijn en dat zij zich ook niet uitsluitend beperken tot ophoopingen van organische stoffen, maar in vele gronden zeer algemeen voorkomen en soms zelfs zeer actief zijn.

HOOFDSTUK V.

GROEISTOFWERKING BIJ DE CELLULOSE-ONTLEDING.

INLEIDING.

In de vorige hoofdstukken werd reeds herhaaldelijk gewag gemaakt van verschijnselen van groeibevordering der cellulose splitsende microben door spoorelementen en andere groeibevorderende stoffen. Deze verschijnselen zijn bij de cellulosesplitsing dan ook zeer algemeen. Zij werden bij de bacteriën nog onlangs door DEN DOOREN DE JONG [1]) als een vrij zeldzaam verschijnsel aangeduid. Voor de groep der cellulose ontledende microben is deze opvatting stellig niet juist. Zeer talrijk waren de gevallen van onderlinge begunstiging van verschillende microben, waarbij het eene organisme als groeistofleveraar, dus als bevorderaar optrad tegenover het andere, dat een groote groeistofbehoefte had en als groeistof consument of bevorderde fungeerde. Alle mogelijke gevallen van symbiose en van de vorming van mengkoloniën en satellietkoloniën waren hiervan het gevolg.

De cellulose is trouwens een stof, die bij uitstek geschikt is voor het bestudeeren van de werking van groeistoffen op microben. Immers, naast de parasitair levende microörganismen, die door het verlies van het vermogen om zelf groeistoffen te synthetiseeren geheel op de levering dezer stoffen door hun gastheer zijn aangewezen, vertoonen de soorten, welke hun voornaamste energiebron in onoplosbare resistente stoffen vinden, het verschijnsel der groeibevordering het mooist. Als er van buitenaf geen aanvulling der groeistoffen plaats heeft, dan is de ontleding der cellulose in oligotrophe substraten alleen mogelijk door de synthese dezer stoffen door de cellulosesplitsers zelf of door hun symbionten.

Duidelijke voorbeelden van een gunstige werking van spoorelementen zag ik zelden, wat trouwens ook begrijpelijk is, als men bedenkt, dat ik voornamelijk met de normale akkergronden en andere eutrophe groeimedia werkte en ook bij de samenstelling der voedingsbodems steeds van basenrijk leidingwater gebruik maakte en daaraan als regel ook nog extracten van grond of compost toevoegde. Des

[1]) L. E. DEN DOOREN DE JONG. „Ueber *Micrococcus Eijkmanii* n. spec., ein Bacterium, welches für sein Wachstum vitaminartige Stoffe braucht." Archiv. f. Mikrobiologie, 5, 1934, 1.

te talrijker zijn echter de gevallen van groeibevordering door organische of althans biogene stoffen, dus door „erginen", volgens de terminologie van AMMON en DIRSCHERL [1]), of door „auxonen" volgens die van LINK, WILCOX en LINK [2]).

In het onderstaande kan dit geheele complex van verschijnselen slechts gedeeltelijk behandeld worden. Vooral de physiologische zijde van het probleem zal vrijwel onbesproken moeten blijven. Er zal dus ook niet getracht worden, de groeibevorderende agentia te identificeeren en bij de bekende vitaminen, hormonen of andere ergin-systemen in te deelen. Alleen de op groeibevordering berustende voorwaarden voor het ontstaan van symbiosen en de middelen ter bestrijding van groeiremming als gebrekverschijnselen zullen besproken worden.

Voor een uitvoerig overzicht van de geheele litteratuur over groeibevordering bij microben kan verwezen worden naar het compilatorische werk van A. JANKE „Die Wuchsstoffrage in der Microbiologie", Zentralbl. f. Bact., Paras., etc., II, *100*, 409, 1939, waarin ook een zeer uitgebreide litteratuurlijst opgenomen is. Toch moet ik — alvorens tot de beschrijving der bij de celluloseontleding waargenomen gevallen van groeibevordering over te gaan — aanduiden, wat in het onderstaande onder het begrip „groeistofwerking" samengevat zal worden. De principieele definitie van de termen „groeistof" en „groeistofwerking", als mede het verschil tusschen deze laatste en voeding kan ik uit den aard der zaak als bekend veronderstellen. Ik zal verder het begrip „groeistof" zeer breed nemen en zal alle organische stoffen, die de groei en de cellulolytische werking der microben in kwestie stimuleeren, terwijl zij in zoo geringe concentraties optreden, dat zij als „voeding", dus als „bouwstoffen", niet in aanmerking komen, daaronder rangschikken. Alleen de spoorelementen — dus stoffen die feitelijk wel bouwstoffen en dus „voeding" zijn, hoe gering hun concentratie ook moge zijn — zonder ik hiervan uit. In beginsel zijn dus mijn „groeistoffen" alle van enzymatischen (katalytischen) aard, zoodat zij ook slechts katalytisch aan de levensreacties der microben deelnemen.

Het blijkt echter vaak niet gemakkelijk te zijn gevallen van echte groeistofwerking te onderscheiden van den invloed van bepaalde voedingsstoffen. Eenerzijds zijn nl. voorbeelden bekend van speciale voedingsstoffen (de z.g. „Spurenbausteine" volgens JANKE), die zelfs in zeer kleine hoeveelheden een gunstigen invloed uitoefenen en daardoor vaak in erginachtig lage concentraties al volledig actief zijn, terwijl ze toch geen enzymatische werking uitoefenen, maar materiaal voor den opbouw van het protoplasma leveren. Anderzijds

[1]) AMMON, R. u. DIRSCHERL, W.: „Fermente, Hormone, Vitamine", Leipzig, 1938.
[2]) LINK, G. K., WILCOX, H. A. and LINK, A. D.: Botan. Gazette, 98, 816, 1937.

zijn echte groeistoffen heel vaak gebonden aan bepaalde verbindingen (eiwitten), die dan als „dragers" fungeeren en die de groeistoffen zelve in massa ver overtreffen. Hierdoor krijgt men vaak een verkeerden indruk van de minimale werkzame hoeveelheid van de groeistof, zoo lang deze niet gezuiverd en geconcentreerd is. Waar het voor het door mij in dit werk nagestreefde doel, nl. het vinden en beschrijven van symbiosen en het bestudeeren van hun rol bij de celluloseontleding, ook niet noodig was steeds een scherp onderscheid te maken tusschen de echte groeistoffen en de „Spurenbausteine", heb ik in mijn onderzoek alle gevallen opgenomen, die zich uiterlijk als groeistofwerkingen manifesteerden. Ik zal in al zulke gevallen voortaan dan ook van „groeistoffen" of van „erginen" spreken.

Toch heb ik mij steeds ervan vergewist, dat ik niet te maken had met de werking van de gewone principieele voedingsstoffen. Toen ik de gevallen van groeibevordering voor het eerst waarnam, stond het nl. volstrekt niet vast, dat ik daarbij met erginenwerkingen te maken had. Het konden ook in den voedingsbodem ontbrekende energie- of substantie-leverende stoffen zijn. Zoo was het b.v. zeer vaak een werking van eiwitten of eiwitafbraakproducten, die den groei van een cellulosesplitser in een zuiver synthetisch milieu sterk stimuleerde. Dat gold o. a. voor alle gevallen van cellulose ontledende microben, die niet van een minerale N-bron konden leven of althans een veel betere ontwikkeling vertoonden bij toediening van b.v. pepton. Reeds KALNINS (80) vermeldde zulke bacteriën. Maar al deze „schijnbevorderingen" zijn in het onderstaande geheel buiten beschouwing gelaten, hoezeer zij soms ook op een echte erginwerking leken. Slechts de gecontroleerde gevallen zijn hier samengevat, en ik beschik thans over verscheidene aanwijzingen, die het mogelijk maken met vrij groote zekerheid de waargenomen groeistoffen als echte erginen te herkennen.

In de eerste plaats kan de onvervangbaarheid der erginen door de gewone voedingsstoffen, zooals glucose, saccharose, pepton, albumine, asparagine, manniet, enz. genoemd worden. Hierbij moet men er wel steeds op bedacht zijn, dat met de organische voedingsstoffen heel vaak ook de benoodigde groeistoffen toegevoegd worden. In dit verband zij o. a. herinnerd aan de door DEN DOOREN DE JONG [1]) opgedane ondervinding met verschillende merken pepton. Het zelfde bleek ook bij de cellulosesplitsers te gelden voor pepton en voor albumine, zoodat slechts bepaalde merken gebruikt konden worden, of men moest de betreffende producten een zoodanige bewerking laten ondergaan, dat de groeistoffen er in vernietigd werden, zonder dat zij zelf

[1]) loc. cit. p. 155.

er onder leden. Zulks kan vaak bereikt worden door een langdurige verwarming op 70 à 90° C bij een alkalische reactie. Men moet daarbij van geval tot geval de juiste middenweg zoeken tusschen te zwakke bewerking en te sterke, die de stoffen te zeer afbreekt.

In de tweede plaats kan in aansluiting aan het zoo juist gezegde gewezen worden op den groei der ergineischende microben op de z.g. „voorbereide" voedingsbodems, die in het onderstaande nader beschreven zullen worden, dus op voedingsbodems, waarop eerst een bevorderaar gekweekt was, maar die daarna weer gesteriliseerd zijn. Hierdoor bevatten zulke voedingsbodems het bevorderende agens, zoodat de ergineischende microben er op tot ontwikkeling kunnen komen. Dat laatste is echter bij de cellulosesplitsers alleen mogelijk, als er ook cellulose aanwezig is. Voegt men aan den voedingsbodem geen cellulose toe, dan blijft elke groei van het betreffende ergineischende organisme uit, hoe rijk aan groeistoffen de voedingsbodem ook moge zijn.

In de derde plaats is het opvallend, dat de synthese der bevorderende agentia volstrekt niet gebonden is aan bepaalde physiologische groepen van microben. Er kan dus ook geen verband gezocht worden tusschen de vorming der groeistoffen en eenig dissimilatieproces van een bevorderaar. Zelfs het al of niet splitsen der cellulose vormt geen criterium voor het ontstaan der groeibevordering der cellulosesplitsende microben. Dit laatste blijkt o. a. uit het feit, dat de bevorderende werking door steriele filtraten en decocten van cultures der bevorderaars even goed tot uiting komt, indien deze op cellulosevrije voedingsbodems gekweekt waren, als wanneer men ze op cellulose als eenige energiebron deed groeien.

Een vierde aanwijzing kan men zien in de verregaande specificiteit der erginen, zooals zij in § 4 nader beschreven zal worden, waardoor het eveneens zeer onwaarschijnlijk wordt, dat men hierbij met de werking van voedingsstoffen te maken zou hebben. Men zou dan immers tientallen verschillende, in hun werking strikt specifieke, hypothetische voedingsstoffen moeten aannemen, naast de gewone principieele.

Als vijfde en sterkste argument kan er op gewezen worden, dat de werking der groeistoffen vaak nog duidelijk waarneembaar is in een verdunning, die zeer zeker niet meer als „voeding" beschouwd mag worden. De celluloseagar bevat slechts geringe hoeveelheden in water oplosbare organische stoffen, nl. ± 100 mg koolstof per 1 en deze hoeveelheid neemt bij een begroeiing door cellulose en agar niet splitsende microben (de bevorderaars) ook nauwelijks toe. In den regel kwam de bevorderaar weliswaar pas tot volledige ontwikkeling, nadat ook de bevorderde cellulosesplitser gegroeid was, maar ook

de eerste groei van den bevorderaar op kosten der oorspronkelijk in den celluloseagar aanwezige oplosbare stoffen was vaak reeds voldoende om duidelijk bevorderend te werken. Het mooist kwam dat tot uiting, indien het bevorderde organisme op een door den bevorderaar „voorbereiden" voedingsbodem gekweekt werd. Als men dan bovendien bedenkt, dat slechts een klein gedeelte van de in zulk een „voorbereiden" voedingsbodem aanwezige oplosbare organische stof het eigenlijke agens kan zijn, zoodat de concentratie ervan hoogstens een fractie van de 100 mg / l kan bedragen, terwijl deze voedingsbodem vaak toch nog 10 en soms zelfs 100 keer en meer verdund kan worden, zonder zijn werkzaamheid te verliezen, dan is op grond hiervan reeds voldoende aangetoond, dat men hierbij niet met voedingsstoffen, doch met echte groeibevorderende stoffen of erginen te maken heeft. En nòg sprekender wordt deze activiteit der groeistoffen, als men de in het onderstaande nader omschreven gevallen van geleidelijke verdunning van de bij het overenten meegekomen erginen in aanmerking neemt. Bij het overenten wordt immers slechts een spoortje van den ouden voedingsbodem in de jonge cultuur overgebracht en toch kan soms gedurende 3, 4 en meer overentingen de werking der groeistoffen nog merkbaar zijn.

Trouwens ook bij het werken met kunstmatig gewonnen extracten was het soms mogelijk ze honderden keeren te verdunnen, zonder verlies van hun werkzaamheid.

Het bovenstaande moet echter niet zoodanig worden begrepen, dat ik alleen dié gevallen van groeibevordering als „echt" beschouw, waarbij het werkzame agens zeer sterk verdund kan worden. Integendeel, de meeste gevallen lieten slechts een geringe verdunning toe, al deden zij zich overigens ook als echte erginwerkingen voor. Hierbij had men dan te maken met geringe concentraties van de werkzame agentia in de oorspronkelijke extracten of voorbereide voedingsbodems. Zoo lang men geen middelen aanwendt om de eigenlijke groeistoffen te zuiveren en te concentreeren, mist men immers elk houvast betreffende het gehalte der onderzochte stoffen aan werkzame bestanddeelen.

Ten slotte kunnen als laatste aanwijzing, dat de waargenomen gevallen van groeibevordering door echte erginen veroorzaakt worden, de enkele door mij waargenomen, in § 3 nader te omschrijven, eigenschappen der werkzame stoffen beschouwd worden. Vooral de alkaligevoeligheid van de meeste groeistoffen en nog meer de warmtegevoeligheid van sommige ervan kunnen in dit verband genoemd worden.

§ 1. DE WAARGENOMEN TYPEN VAN SYMBIOSE DOOR GROEIBEVORDERING.

De eerste gevallen van duidelijke groeibevordering bij cellulose splitsende microben werden door mij waargenomen als een begunstiging van de ontwikkeling van het eene microörganisme door de nabijheid van het andere. Het was dus een groeibevordering, die van microben uitging.

Al heel gauw kon een onderscheid gemaakt worden tusschen twee principieel verschillende wijzen van onderlinge begunstiging:

1. Waarbij op de een of andere wijze de groei en de ontwikkeling van de microbe door het ergin begunstigd werd, zoodat bij afwezigheid er van de groei onvoldoende was. De aantasting van de cellulose had hierbij echter met en zonder de groeistof relatief even goed plaats.

2. Waarbij de groeistof juist alleen op de celluloseontleding inwerkte, maar niet op de ontwikkeling van het organisme. De bevorderde microbe kwam in dit geval dus wel tot een goede ontwikkeling, maar was alléén niet in staat cellulose te ontleden en verkreeg dit vermogen pas door den invloed van een naburige kolonie van een ander — zelf de cellulose evenmin aantastend — organisme. Uit den aard der zaak kwam deze werking alleen op voedingsbodems tot uiting, die naast de cellulose voldoende andere opneembare voedingsstoffen bevatten. Hierbij moest men wel terdege nagaan of zulk een bevordering der celluloseontleding in feite niet berustte op een uitputting der voedselvoorraden door het bevorderende organisme, die de facultatieve cellulosesplitser noodzaakte tot ontleding der cellulose over te gaan. In dit verband zij herinnerd aan de indeeling in obligate en facultatieve cellulosesplitsers, zooals zij in de hoofdstukken III en IV aangegeven werd.

Hoewel dit tweede geval van bevordering minder diep in het leven der microben ingrijpt en ook veel zeldzamer is, is het toch van belang voor het geheele probleem der celluloseontleding in den grond en dient daarom in het onderzoek betrokken te worden. Ook is het niet onwaarschijnlijk, dat de talrijke mededeelingen over het geleidelijke verlies van het vermogen tot cellulosesplitsing, die men in de litteratuur vindt, teruggebracht moeten worden, óf tot een uitsterven van een onopgemerkten bevorderaar van dit type in een vermeende reincultuur, óf tot de geleidelijke verdunning van in de eerste overentingen nog uit de oorspronkelijke ruwcultuur meegekomen sporen van de betreffende stof.

In beide bovengenoemde gevallen kan men een onderscheid maken tusschen twee wijzen, waarop de onderlinge groeibevorderingen tot

stand komen. De groeibevordering kan nl. òf tot op vrij groeten afstand, dus door diffundeerende exo-erginen veroorzaakt worden, òf slechts bij direct contact. In het eerste geval kunnen z.g. „satelliet"-koloniën ontstaan (in den geest van GRASZBERGER [1]), (fig. 101 tot 107), terwijl het tweede geval slechts tot het ontstaan van mengkoloniën (van het type van NEISSER [2])) voert. Bij den uitzaai van een grondsuspensie of van een ruwe cultuur uit een vloeibaren voedingsbodem op platen trof ik soms direct al opvallende zwermen van satellietkoloniën rondom een kolonie van een ander organisme aan. In zulke gevallen — waarbij het bevorderde organisme dus de plaat dicht bevolkte en veel talrijker was dan het bevorderende — was de aard van de onderlinge beïnvloeding terstond duidelijk. Deze gevallen waren echter relatief zeldzaam. Vaker ontstonden mengkoloniën, die bij macroscopische beschouwing hun gemengde natuur soms door niets verrieden en pas microscopisch als zoodanig herkend werden; en nòg algemeener waren de gevallen, waarbij de onderlinge begunstiging van naburige koloniën zich aanvankelijk in 't geheel niet opvallend manifesteerde, doordat hun aantal op de plaat te gering was om een waarneembare groepeering van het eene kolonietype om koloniën van een ander organisme te doen ontstaan. Dat in het laatste geval toch groeibevordering in het spel was, ondervond ik pas bij de verdere overentingen van aparte koloniën, waarbij de groei van het begunstigde organisme eenvoudig mislukte of slechts zeer zwak was. Dan moest teruggegrepen worden tot de eerste oude plaatcultures en moest men onder de begeleidende organismen den bevorderaar zoeken. De gevallen van mengkoloniën leverden vaak nòg meer raadsels en onverwachte resultaten op. Had men daarbij te maken met een geval van echte symbiose — dus van wederkeerige begunstiging van twee verschillende organismen — dan verkreeg men bij dunne overenting in den regel heelemaal geen of slechts een zeer zwakken groei, terwijl dichtere overentingen steeds weer alleen mengkoloniën deden ontstaan. Was de onderlinge beïnvloeding echter slechts eenzijdig — en dat was de regel — dan verkreeg men bij een zeer spaarzame overenting alleen koloniën van het onafhankelijke organisme — dus een kolonietype, radicaal afwijkend van dat op de oude plaat. Dichtere overentingen daarentegen gaven dan twee kolonietypen — de oorspronkelijke mengkoloniën en de reine koloniën van het bevorderende organisme. Waren de in den eersten uitzaai ontstane koloniën niet als mengcultuur herkend, dan beteekenden

---

[1]) GRASSBERGER, R.; „Beiträge zur Bacteriologie der Influenza." Zeitschr. f. Hygiene u. Infectionskr., 25, 1897, 453.

[2]) NEISSER, M.; „Über die Symbiose des Influenzabacillus." Deutsche Mediz. Wochenschr., 29, 1903, 462.

al zulke overentingen even veel verrassingen en teleurstellingen. Nòg ingewikkelder werd de verhouding, als er méér dan twee organismen aan de symbiose deel namen.

Voor de verdere indeeling van de vele gevallen van onderlinge begunstiging van microben kan men de vraag stellen of zij beide cellulosesplitsers zijn of niet. Vaak is slechts één van hen daartoe in staat. Treedt een cellulosesplitser als bevorderaar op, terwijl zijn koloniën door een zwerm van de cellulose niet splitsende organismen omringd zijn, dan heeft dat geval voor het onderhavige onderzoek weinig waarde, en werd het niet verder onderzocht (fig. 108). Zulke gevallen waren zeer algemeen, maar de gunstige invloed van den cellulosesplitser berustte dan meestal op een rechtstreeksche voeding, doordat de door hem uit de cellulose gevormde afbraakproducten (cellobiose en glucose) door den satelliet benut werden. Voegde men aan den voedingsbodem een weinig suiker en (of) proteïne toe, dan verdween de bevordering in den regel ook terstond en ontwikkelde de satelliet zich verder onafhankelijk van den cellulosesplitser. Veel algemeener en voor mij van veel meer belang was echter het tegenovergestelde geval, waarbij een de cellulose niet splitsend organisme bevorderend werkte op een cellulosesplitser, die zonder den bevorderaar in het schrale „synthetische" milieu van den celluloseagar niet tot ontwikkeling kon komen. Soms bleken echter ook beiden — de bevorderaar èn het bevorderde organisme — cellulosesplitsers te zijn. Dit geval wijkt echter niet principieel af van het vorige.

Ten slotte moet hier gewezen worden op enkele verschijnselen, die de tot nu toe geschetste duidelijke uiting van onderlinge groeibevordering soms vertroebelen: in de eerste plaats ziet men heel vaak, dat het organisme in kwestie wel sterk gestimuleerd wordt door den bevorderaar, maar toch ook zelf de vereischte erginen eenigszins kan synthetiseeren, zoodat het ook als reine cultuur op den celluloseagar gekweekt kan worden, hoewel de groei dan schraal blijft. De erginbehoefte is dan niet absoluut.

In de tweede plaats kan men vaak het reeds boven besproken geval waarnemen, dat de vereischte erginen in een zóó geringe hoeveelheid reeds toereikend zijn, dat de sporen ervan, die bij een overenting met de cultuur en met de brokjes agar of met het druppeltje vloeistof mee overgebracht worden, in de eerste subcultuur nog een zeer behoorlijke ontwikkeling mogelijk maken, ook als het organisme dan al geheel rein is. Pas bij de daarop volgende overentingen vermindert dan de groei al of niet geleidelijk in het verloop van eenige achtereenvolgende overentingen. Dit verloop, dat trager is, naarmate er dikker overgeënt wordt, maakt soms geheel den indruk van een geleidelijke

vermindering van vitaliteit van het betreffende organisme. Het is dan ook niet onmogelijk, dat de in de oudere litteratuur vaak voorkomende mededeelingen over een geleidelijken achteruitgang van de groeikracht van op kunstmatige voedingsmedia geïsoleerde cellulosesplitsers geen werkelijke degeneratie was, maar uitsluitend op zulk een verdunning van de uit den grond of uit de ruwe cultuur meegekomen erginen berustte.

Ten derde moet een van de beide voorgaande principieel verschillend verschijnsel genoemd worden, nl. de z.g. „autokatalyse" van de vorming der vereischte groeistoffen, waarbij het betreffende organisme wel in staat is in reincultuur op den celluloseagar te groeien en ook alle vereischte erginen zelf te synthetiseeren, maar alleen als er van den beginne af aan reeds een minimale concentratie dezer stoffen aanwezig is. Daardoor kan men zulke reincultures wel ongelimiteerd aanhouden en overenten, maar de overenting moet steeds „dik" zijn, zoodat er voldoende erginen van de vorige cultuur meekomen om de groei en de synthese aan den gang te krijgen. Deze gevallen zijn volstrekt niet zeldzaam en komen vooral zeer sprekend tot uiting bij de anaërobe cellulosegistingen. Het isoleeren van reine cultures wordt hierdoor zeer sterk bemoeilijkt, daar een dunne uitzaai in den regel geheel mislukt en alleen dikke, druppelsgewijze overentingen goed aanslaan. Onder de aërobe cellulosesplitsers nam ik zulke autokatalysegevallen vooral bij de *Cytophaga's* waar.

§ 2. KEUZE VAN DEN VOEDINGSBODEM.

De keuze van den voedingsbodem is bij het opsporen van groeibevorderingen en bij het beoordeelen van haar beteekenis voor de celluloseontleding in den grond van primair belang. Erginwerkingen komen uit den aard der zaak alleen tot uiting op voedingsbodems, die weinig natuurlijke, dierlijke of plantaardige, extracten bevatten. Toch mag men in deze richting ook niet overdrijven, daar anders ook de bevorderende, de cellulose niet splitsende microben er niet op kunnen groeien en de bevordering dus ook niet op gang kan komen. Zoo is b.v. op een zorgvuldig bereiden kiezelzuur-cellulosevoedingsbodem, die als volkomen „synthetisch" beschouwd mag worden, zelfs de schraalste ontwikkeling van de cellulose niet ontledende bevorderaars onmogelijk, waardoor men hierop alleen die gevallen te zien krijgt, waarbij beide organismen cellulose kunnen afbreken. De talrijke en juist meest interessante gevallen van symbiose tusschen groeistofeischende cellulosesplitsers en groeistofleverende cellulose niet splitsende organismen blijven bij gebruik van den kiezelzuurvoedingsbodem onopgemerkt.

de groote groep der traag diffundeerende groeistoffen der actinomyceten ongevoelig is.

De aan het levende protoplasma gekoppelde groeistoffen zijn uit den aard der zaak niet thermoresistent.

c. Resistentie tegen uitdrogen.

Alle tegen warmte resistente, diffundeerende erginen bleken ook het indrogen tot luchtdroog te kunnen verdragen. Zelfs herhaaldelijk indrogen en weer zwellen van de agar, waarin zij zich bevinden, doet hun werking slechts langzaam achteruit gaan. Ik kon ze dan ook gemakkelijk in gedroogden toestand bewaren als droge en gemalen agarvoedingsbodem. Uit den aard der zaak wordt het indrogen alleen verdragen in een milieu, waarin daarbij geen schadelijke concentraties van electrolyten en ook geen schadelijke reactieveranderingen optreden. In den gebruikelijken voedingarmen celluloseagar deden zich hierbij geen moeilijkheden voor.

Door de uitdrogingsbestendigheid neemt de beteekenis dezer groeistoffen in den grond sterk toe. In droge perioden blijven zij immers ongeschaad in de bovenste bodemlagen behouden en ook kunnen zij met de het uitdrogen verdragende microben in het stof direct meekomen, waardoor het tot stand komen van de symbiosen na het omslaan van het weer gemakkelijk ingeleid wordt.

Onder de voor warmte gevoelige bacteriëngroeistoffen heb ik zoowel droogbare als ook niet droogbare aangetroffen. Zeer gevoelig voor het indrogen bleken de traag diffundeerende en de geheel aan het protoplasma gekoppelde bacteriëngroeistoffen (*Bacterium herbicola*) te zijn, terwijl de sneldiffundeerende, voor warmte gevoelige erginen der bacillen wel gedroogd konden worden, maar daarbij toch vrij duidelijk in activiteit achteruitgingen.

d. Bewaarbaarheid.

Van practisch belang was ook de vraag, hoe lang de groeistoffen der cellulosesplitsers bewaard kunnen worden, zonder hun werking te verliezen. Ook hierin bleken zij zich zeer verschillend te gedragen. Het eene uiterste vormen de aan de levende cel gekoppelde groeistoffen, die al binnen enkele weken hun werking verliezen. Zij gaan verloren tegelijk met het autolytische degenereeren en uiteenvallen der betreffende bacterie. Maar ook de snel diffundeerende, voor warmte gevoelige groeistoffen der bacillen bleken relatief slecht houdbaar te zijn. Zoowel in oude cultures als ook in door bacteriedichte

filtratie verkregen steriele sappen verloren zij binnen enkele maanden hun werkzaamheid nagenoeg geheel. Iets langer kan men ze in gedroogden toestand bewaren. Maar hun volle activiteit kan men toch slechts in versche cultures of versch bereide filtraten verwachten.

Het tegenovergestelde uiterste vindt men bij de groote groep der *Actinomyces*-erginen, die én tegen warmte én tegen droogte resistent, en ook schier onbegrensd houdbaar bleken te zijn. Dat geldt vooral voor gedroogde preparaten, die na 4 en 5 jaren koel en in het donker bewaard geweest te zijn, nog onverzwakt werkzaam waren. Maar ook in verschen (natten) toestand kon ik ze in sommige gevallen meer dan twee jaren goed houden — al verminderde hun werking daarbij ook merkbaar.

e. Invloed der reactie.

Opvallend voor alle daarop onderzochte groeistoffen der cellulose ontledende microben was hun gevoeligheid voor een alkalische reactie, vooral bij hoogere temperaturen. De boven vermelde resistentie tegen verhitting bleek nl. alleen in neutraal tot zwak zuur milieu te bestaan, terwijl bij een zwak alkalische reactie (pH > 8.5) elke verwarming boven 50 à 60° C reeds inactiveerend werkte. De voor warmte gevoelige groeistoffen der bacteriën werden zelfs bij kamertemperatuur door een alkalische reactie vrij snel onwerkzaam gemaakt. Deze inactiveeringen waren steeds irreversibel en konden door aanzuren niet meer ongedaan gemaakt worden. De houdbaarheid en steriliseerbaarheid werden door een zwak zure reactie zoodanig verhoogd, dat ik het bewaren en zuiveren van de erginproducten het liefst na aanzuren ter hand nam. Pas bij het gereed maken van de eigenlijke voedingsbodems herstelde ik door toevoeging van loog weer de neutrale reactie.

Overziet men de in het bovenstaande beschreven, vaak min of meer toevallige, waarnemingen omtrent enkele eigenschappen der groeistoffen, dan lijkt het verantwoord de thermoresistente actinomycetengroeistoffen tot de erginen der B-groep (Bios of Vitamine B) te rekenen. Hun resistentie tegen warmte en droogte, hun oplosbaarheid in water, kleurloosheid, gevoeligheid tegen alkali, alles pleit voor deze zienswijze. Het zou trouwens ook in overeenstemming zijn met de algemeene opvatting in de betreffende litteratuur, waar ook duidelijke voorbeelden van groeibevordering bij bacteriën eigenlijk alleen in de B-groep regelmatig waargenomen werden [1]). Nog meer wint deze

[1]) Loc. cit. p. 156.

veronderstelling echter aan waarschijnlijkheid door mijn talrijke waarnemingen, dat analoge groeibevorderingen vaak ook door extracten van verschillende plantaardige stoffen en levende plantendeelen te voorschijn geroepen konden worden. Ook deze extracten bleken in de autoclaaf te kunnen worden verhit en zelfs tot droog ingedampt te kunnen worden zonder hun activiteit te verliezen. Het meest productief was in dit opzicht een extract van aardappelknollen. Maar ook uit wortelen, versche spinazie, gerstmout, persgist en in enkele gevallen ook uit vleesch en zelfs uit urine konden zeer werkzame waterige extracten bereid worden. De erginen der cellulose splitsende microben behooren dus tot de in alle weefsels van plant en dier zeer algemeen voorkomende. Haast geen andere erginengroep is zoo algemeen als juist de B-groep.

De hier voor de cellulose splitsende organismen geldende eigenschappen der groeistoffen komen in hoofdtrekken goed overeen met het door DEN DOOREN DE JONG [1]) voor zijn *Micrococcus Eijkmanii* gevonden ergin, dus voor een geheel andere physiologische groep van microben.

Of de voor warmte gevoelige groeistoffen der bacteriën en de aan het levende protoplasma gekoppelde ook tot de B-groep gerekend moeten worden, is niet gemakkelijk te zeggen. Hun gevoeligheid voor warmte strookt niet met de algemeene eigenschappen der bioserginen. Ik onthoud mij in deze gevallen dus liefst van elke uitspraak, hoewel ik wel geneigd ben, ook hen tot de groote groep der B-groeistoffen te rekenen, te meer, daar niet alleen de erginen der actinomyceten, doch ook enkele der relatief snel diffundeerende groeistoffen uit aërobe bacillen in hun werking versterkt worden door toevoeging van een gezuiverd preparaat van inosiet (Bios I) [2]). Inosiet alléén had nl. geen waarneembaren invloed op de onderzochte cellulosesplitsers, wel echter in samenwerking met enkele der natuurlijke groeistoffen.

§ 4. DE SPECIFICITEIT DER GROEISTOFFEN.

Hoewel ik dus eenerzijds veronderstel, dat misschien de meeste door mij bij de cellulosesplitsing waargenomen erginen tot één groep behooren en dus in wezen verwante stoffen zijn, moet ik hier meteen op hun groote specificiteit wijzen. Want lang niet alle bevorderingsgevallen waren onderling uitwisselbaar. In tegendeel, heel vaak was voor elk bevorderd organisme slechts één bevorderaar de meest gunstige,

[1]) Loc. cit. p. 155.
[2]) Dit preparaat was afkomstig uit het laboratorium van Prof. Dr. BARTOW te Iowa.

terwijl de andere groeistofvormende analoge microben niet of maar zwak werkzaam waren. Bovendien bleek het door den bevorderaar gesynthetiseerde ergin soms wel, maar heel vaak ook niet door een kunstmatig bereid extract vervangen te kunnen worden. Men treft dus een bonte en vrij ingewikkelde verscheidenheid onder de groeistoffen aan met betrekking tot hun werkzaamheid op bepaalde microben.

Alvorens echter concrete voorbeelden van de specificiteit aan te voeren, moet aangegeven worden, hoe men de bevorderingsgevallen en de daarbij betrokken microben kan indeelen. Daar verreweg de meeste stammen der cellulosesplitsers niet geïdentificeerd en dus ook niet benoemd werden, moest ik mij van cijfers en letters voor een klassificatie bedienen.

a. Indeeling der microben.

Alle groeistofeischende microben werden vereenigd in de groep I, terwijl de erginproducenten met II aangeduid werden. De verdere indeeling der beide groepen volgde de algemeene morphologisch-systematische groepeering:

I*a* — cellvibrionen;
I*b* — sporenvormers;
I*c* — cytophagen;
I*d* — polyangiden;
I*e* — proactinomyceten en
I*f* — actinomyceten.

Een analoge onderverdeeling werd ook bij II gevolgd, alleen ontbreken voorbeelden van bevorderend werkende cellvibrionen, cytophagen, polyangiden en proactinomyceten tot nu toe, terwijl verscheidene bevorderaars onder de cellulose niet splitsende bacteriën, sarcinen en cystenlooze myxococcen aangetroffen werden, naast ontelbare bacillen en actinomyceten.

De indeeling der bevorderaars is dan ook als volgt:

II*a* — bacteriën;
II*b* — bacillen;
II*c* — sarcinen;
II*d* — micrococcen;
II*e* — actinomyceten;
II*f* — myxococcen (myxobacteriën).

In elk der zoo aangeduide ondergroepen werden alle waargenomen gevallen doorloopend genummerd. Men kreeg zoo dus aanduidingen als b.v.: Ia_1; Ia_2; Ia_3; etc. en net zoo ook voor I*b*, I*c*, enz. en ook

voor alle ondergroepen van II. Deze indeeling beoogt niets anders dan een katalogiseering, om zoodoende een kortere schrijfwijze van al de symbiosen te hebben. In den voorlaatsten paragraaf van dit hoofdstuk zullen enkele der meest sprekende voorbeelden van bevordering opgesomd worden.

b. Specificiteit der microbenerginen.

Terugkomende op de specificiteit der erginwerking kunnen hier de uitkomsten van enkele proeven over het onderlinge vervangen van verschillende bevorderende en ook bevorderde organismen weergegeven worden. De eerste dezer vergelijkingen is vereenigd tot Tabel XVIII en heeft betrekking op cellvibrionen en bacillen (dus I*a* en I*b*), bevorderd door de meest algemeene groep van bevorderaars, de actinomyceten (II*e*).

Tabel XVIII.

Ontwikkeling van enkele cellvibrionen en bacillen onder invloed van actinomyceten als bevorderaars op celluloseagar.

	Celluloseagar alleen	Celluloseagar met			
		IIe_1	IIe_2	IIe_3	IIe_4
$I\ a_1$	–	+++	+	++	+++
$I\ a_2$	–	+	+	+	+++
$I\ a_3$	–	+	–	–	++++
$I\ b_2$	–	+++	+++	+++	++++
$I\ b_3$	–	+++	++	++	++++
$I\ b_4$	–	++++	+++	+++	++++

Men ziet dus, dat de hier onderzochte bacillen (I*b*) weinig kieskeurig zijn ten opzichte der groeibevorderende stoffen der actinomyceten, maar dat de cellvibrionen (I*a*) een duidelijk uitgesproken voorkeur voor bepaalde bevorderaars toonen.

Uit den aard der zaak zijn in den regel de best werkende bevorderaars juist diegenen, welke ook waargenomen en geïsoleerd zijn in symbiosen met het betreffende bevorderde organisme. Zoo is b.v. IIe_1 geïsoleerd uit een symbiose met Ia_1 en IIe_4 uit een met Ia_3. Maar er zijn toch ook vele uitzonderingen op dezen regel: de bevorderaar IIe_2 b.v. is gevonden in symbiose met Ib_2 en IIe_2 zelfs met Ib_3. Pas achteraf bleek IIe_4 zoowel Ib_2 als ook Ib_3 veel sterker te stimuleeren dan de oorspronkelijk er bij behoorende bevorderaars. De actinomyceet IIe_4

(behoorende tot mijn groep I) is trouwens over het algemeen bijzonder actief en veelzijdig en bevordert vrijwel alle vertegenwoordigers der groepen I*a*, I*b*, I*d*, I*e* en I*f*. Het is bij den tegenwoordigen stand van het onderzoek niet te zeggen, waarom de ééne bevorderaar slechts op één of enkele microben stimuleerend werkt, terwijl een andere zeer algemeen bevorderend optreedt.

Dezelfde en soortgelijke actinomyceten zijn ook bevorderend werkzaam op sommige polyangiden, proactinomyceten en ook op sommige echte actinomyceten (dus op de groepen I*d*, I*e* en I*f*). In deze groepen is de specificiteit der erginbehoefte vaak nog sprekender dan onder de cellvibrionen en bacillen. Enkele onderzochte gevallen zijn weer vereenigd in Tabel XIX.

Tabel XIX.

Ontwikkeling van enkele polyangiden, proactinomyceten en actinomyceten op celluloseagar onder invloed van actinomycesgroeistoffen.

	Celluloseagar alleen	Celluloseagar met					
		II e_1	II e_4	II e_2	II e_7	II e_8	II e_{12}
I d_1	+	++	++++	+	++++	+	+
I d_4	+	++	+++	+	++++	+	+
I e_4	+	++	+++	+	+	++++	+
I f_1	−	+++	++	−	+	−	++++
I f_3	+	++	++++	+	+	+	++++

Weliswaar kunnen de meeste dezer organismen ook zonder bevorderende organismen groeien, maar toch komt de specificiteit der erginen hier zeer duidelijk tot uiting.

Van alle groeistofeischende microben waren de cytophagen (I *c*) de eenige, die nooit door actinomyceten (II*e*) gestimuleerd werden. De beste bevordering ondervonden zij van verschillende bacillen (zoowel cellulose splitsende als ook cellulolytisch inactieve). Binnen deze groep hadden zij echter geen voorkeur. Al deze bacillen vormden dus vermoedelijk dezelfde of aanverwante groeistoffen, want zoowel in de enkele gevallen van een duidelijke bevordering van de cysten vormende stammen als ook bij al de absoluut op ergintoevoer aangewezen cystenlooze, waren steeds vrijwel alle bevorderende bacillen even goed bruikbaar. Men kan er wel zeer sterk en zwak werkzame bevorderaars onder herkennen, maar steeds gold deze gradatie voor al de onderzochte *Cytophaga*-stammen. Behalve door bacillen werden cytophagen in enkele gevallen ook door sarcinen en dooiergeel ge-

kleurde micrococcen bevorderd. Deze beide gevallen heb ik nog niet nader onderzocht en de beide betreffende organismen niet nader geïdentificeerd. Zij splitsten geen van beiden cellulose en konden op een glucosepeptonhoudenden voedingsbodem gemakkelijk gekweekt worden. De door hen geproduceerde groeistoffen waren verwant of identiek met die der bacillen, want ook zij bevorderden dezelfde cytophagen en op dezelfde wijze.

De bevorderend werkende bacteriën en bacillen (II*a* en II*b*) zijn niet alleen voor de cytophagen van belang, ook verscheidene gevallen van een duidelijke begunstiging van cellvibrionen door deze organismen zijn bekend geworden en zelfs enkele cellulose splitsende bacillen werden bevorderd door een anderen bacil of door een asporogeen staafje. Het aantal van al deze gevallen is echter veel geringer, zoodat zij wel één voor één onderzocht zijn, maar een systematische vergelijking van hun werking bij uitwisseling is niet geschied. Hun specificiteit kan dan ook niet exact aangegeven worden.

c. Specificiteit der extracten van plantaardige en dierlijke weefsels.

Naast de specificiteit van de bevorderende werking van bepaalde microben is ook van belang de ondervinding, opgedaan met de kunstmatig bereide extracten. Mijn onderzoek in deze richting is nog zeer fragmentarisch, zoodat het hier medegedeelde slechts als voorloopige waarnemingen opgevat moet worden.

Het meest toegepast werd aardappelperssap, dat trouwens ook het meest veelzijdig werkte. Het werd zoowel koud gesteriliseerd (door filtratie door Chamberlandkaarsen) als ook na sterilisatie in de autoclaaf gebruikt. Deze beide extracten zijn, wat betreft hun samenstelling, niet vergelijkbaar, daar bij de verhitting vele eiwitten uitvlokken en afgefiltreerd worden. Met de eiwitten wordt echter ook een deel der groeistoffen meegesleurd (adsorbtief, of omdat zij zelf coaguleerende eiwitten zijn of althans aan deze gebonden zijn), hetgeen duidelijk blijkt uit het feit, dat dit afgefiltreerde en zorgvuldig met heet water uitgewasschen neerslag na suspensie in celluloseagar op sommige cellulosesplitsers ook nog een sterk bevorderende werking vertoont. De meest algemeene en in den regel ook de sterkst bevorderende werking ging uit van het koud gesteriliseerde sap. Het was vrijwel zonder uitzondering op alle cellvibrionen, bacillen en proactinomyceten (I*a*, I*b* en I*e*) werkzaam en ook de polyangiden (I*d*) werden er merkbaar, maar toch niet volledig, door bevorderd. Slechts de cytophagen en actinomyceten (Ic en I*f*) reageerden er nauwelijks op. De meeste cellvibrionen en alle onderzochte bacillen werden

door het in de autoclaaf gesteriliseerde en gefiltreerde sap even sterk begunstigd, maar op de polyangiden en proactinomyceten had het verhitte een veel zwakkere werking dan het koud gesteriliseerde sap. Het eiwittenneerslag ten slotte bleek ook nog zeer sterk werkzaam te zijn op alle bacillen en op sommige cellvibrionen. De overige organismen werden er niet merkbaar door beïnvloed. De meeste werkzame stoffen van het aardappelsap zijn dus tegen warmte bestendig, maar toch schijnen er ook enkele voor warmte gevoelige in voor te komen, aangezien ook het na het verhitten niet gefiltreerde sap tegenover de polyangiden een mindere werking vertoonde dan het koud bereide.

Het aardappelsap bevat dus zeer zeker verscheidene erginen en kan daardoor het grootste gedeelte der specifiek werkende bevorderaars vervangen, maar toch bleven er gevallen over (cytophagen, polyangiden en actinomyceten), waarbij het niet in de plaats der symbionten kon treden. De door het in de autoclaaf gesteriliseerde aardappelsap en door andere plantenextracten vervangbare microbengroeistoffen en ook de werkzame agentia van het door verhitting gesteriliseerde aardappelsap zelf moeten krachtens deze resistentie tegen verhitting tot de B-groep der groeistoffen gerekend worden. Of echter de voor warmte gevoelige fractie van het aardappelsap en ook de niet vervangbare, specifieke, de myxobacteriën en actinomyceten bevorderende, microbenerginen tot de Biosstoffen behooren, kan aan de hand van mijn waarnemingen niet beslist worden. Onze kennis van de microbenerginen is trouwens in 't algemeen nog zóó gebrekkig, dat ook buiten het gebied der cellulosesplitsing in de algemeene litteratuur over microben-groeistoffen herhaaldelijk nog geheel ongeïdentificeerde specifieke erginen genoemd worden (bijv. de mucorineëngroeistoffen van SCHOPFER, de *Aspergillus*-groeistoffen van NIELSEN en de speciale bacteriëngroeistoffen van SARTORY c.s.), die bij nader onderzoek wellicht tot algemeen bekende groeistoffen teruggebracht zullen kunnen worden. Zoo zou ook de bonte rij van specifieke groeistoffen der cellulosesplitsers bij een nader onderzoek vermoedelijk sterk slinken en minder gecompliceerd worden.

De werking van enkele andere plantenextracten, die ik in het onderzoek betrokken heb, kwam grootendeels met die van aardappelsap overeen. Dat geldt vooral voor wortel- en spinazieperssap. Eenigszins afwijkend was het gedrag van gerstmoutextract, dat een veel minder algemeene bevordering te zien gaf en eigenlijk alleen de bacillen (I*b*) en sommige cellvibrionen (I*a*) volledig begunstigde, terwijl zijn werking op de polyangiden, proactinomyceten en enkele andere cellvibrionen slechts zwak of geheel onwaarneembaar was. Wel was echter het gehalte van gerstmout aan de voor de bacillen gunstige groeistoffen

zeer hoog, daar het moutextract zeer sterk verdund kon worden vóór het zijn werking verloor. Verhitting en droging hadden geen merkbaar effect op het moutextract en in sommige gevallen kreeg ik zelfs den indruk, alsof het na een sterilisatie in de autoclaaf nog sterker en sneller werkzaam werd.

Het vleeschwater was wederom zeer algemeen bevorderend werkzaam, vooral bij koude steriliseering en ook hier weer verdeelden de erginen zich bij het verhitten over het uitvlokkende neerslag en over het heldere filtraat. Onwerkzaam was vleeschextract alleen op de cytophagen en enkele actinomyceten.

Versche urine ten slotte werd slechts in enkele gevallen in het onderzoek betrokken. Zij bleek alle bacillen en tot op zekere hoogte ook de polyangiden tot beteren groei aan te zetten; op de overige onderzochte organismen bleef zij zonder uitwerking.

De in het voorgaande beschreven werkingen der extracten zijn overzichtelijkheidshalve vereenigd in onderstaande tabel XX, waarbij niet de groei der aparte stammen, doch die van het gemiddelde der systematische microbengroepen op celluloseagar met de betreffende extracten aangegeven is.

Tabel XX.

Ontwikkeling van verschillende cellulose splitsende microben op celluloseagar onder invloed van groeistoffen bevattende extracten.

Celluloseagar alleen	Celluloseagar met:								
	aardappelextract			spinazie extract	mout-extract	vleeschwater		gist-water	urine
	A	B	C	B	B	A	B	B	A
Ia	++++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+
Ib	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Ic	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Id	++	+	–	++	+	+++	+	++	++
Ie	+++	+	–	–	++	++	+	+	–
If	+	–	–	–	–	+	–	–	–

A = koud gesteriliseerd.
B = in autoclaaf gesteriliseerd.
C = het bij de sterilisatie uitgevlokte neerslag na uitwasschen.

d. Werking van gronddecoct.

De in het voorgaande besproken extracten komen in den grond niet voor. Hun onderzoek had dan ook alleen beteekenis voor het verkrijgen van eenig inzicht in den aard van de groeistoffen der cellu-

losesplitsers. Van veel meer waarde zijn de in grond, in mest en in compost van nature aanwezige groeistoffen. Zij bepalen immers, naast de door de microflora versch gesynthetiseerde erginen, de levensmogelijkheden in den grond.

Bij grond-, mest- en compostextracten kan uit den aard der zaak geen sprake zijn van eenige specificiteit. Deze grondstoffen zijn immers zóó gecompliceerd van samenstelling, dat slechts een zeer alzijdig werkzaam mengsel van de meest uiteenloopende erginen er uit verkregen kan worden. Men kan er in verwachten groeistoffen, afkomstig van levende plantenwortels (excretie), naast andere, die overgebleven zijn van vergane plantendeelen of dieren, of die zich gevormd hebben bij het humificatieproces; en van nog meer beteekenis als groeistofleveranciers zijn er de verschillende microben. Grond- en compostextracten werken dan ook steeds op vrijwel alle microben stimuleerend, vooral als zij gewonnen zijn door koude sterilisatie. En toch bleek de toevoeging van zelfs vrij groote hoeveelheden grondextract aan de synthetische voedingsbodems de vraag van sommige celluloseontleders naar groeistoffen niet geheel te bevredigen, zoodat ook dàn nog de vorming van symbiose en satellitisme mogelijk was. Sommige groeistoffen zijn blijkbaar zelfs in de rijkste gronden niet in voldoende hoeveelheid aanwezig om een volledige bevrediging der erginbehoefte van alle soorten microben te verzekeren. Het waren wederom de *Cytophaga's*, die door grond- of compostextract het minst bevorderd werden en die ook dan nog een duidelijke behoefte aan speciale door bacillen gevormde groeistoffen bleven toonen. Maar ook onder de andere microbengroepen zag ik op grondextractcelluloseagar vaak duidelijke gevallen van onderlinge bevordering en ook kon ik dan soms met aardappelsap of vleeschwater het bestaande tekort aanvullen. Er heerscht in den grond dus geenszins een overvloed van alle vereischte groeistoffen. Voor een optimale ontwikkeling van vele microben is ook in den grond vaak nog de erginensynthese door bepaalde bevorderaars onontbeerlijk.

Bovendien moet men bedenken, dat men door het bereiden van grondextract de discontinue verspreiding der groeistoffen opheft, terwijl zij in den natuurlijken grond juist op de groeiplaatsen der produceerende organismen aanwezig zijn. De natuurlijke grond moet dan ook als een samenstel van ontelbare symbiosen opgevat worden, die steeds ontstaan en weer uiteen vallen, afhankelijk van het verloop van de mineralisatie der organische bestanddeelen.

Hoe onvolledig de bevordering der cellulosesplitsers door grond of grondextract (resp. compost- of mestextract) ook moge zijn, de celluloseagar wordt er toch steeds zeer duidelijk door verbeterd,

zonder dat er al te veel oplosbare voedingsstoffen door toegevoegd worden. In alle gevallen, waarbij het er niet om te doen was symbiosen of groeibevorderende werkingen aan te toonen, maar slechts een optimale groei van de organismen nagestreefd werd, gebruikte ik dan ook celluloseagar met grond- of compostextract. Eenvoudigheidshalve gebruikte ik in den regel in de autoclaaf gesteriliseerd extract, dat door koken van grond met water verkregen was, daar het gebleken is, dat de werking ervan niet veel ten achter staat bij die van koud gewonnen en door bacteriedichte filtratie gesteriliseerd extract. De meeste in den grond aanwezige groeistoffen zijn nl. resistent tegen warmte. Ook was het mogelijk grondextract te drogen, zonder dat het zijn werking geheel verloor, mits het niet als zoodanig tot droog toe ingedampt, maar in een neutraal absorptiemiddel opgeslorpt werd (b.v. in zaagsel of filtreerpapier of in diatomeënaarde). Maar de werking verminderde er toch merkbaar door en de bereiding van zulke gedroogde producten en ook hun toepassing waren te tijdroovend om in de practijk gebruikt te kunnen worden.

Niet alle grondsoorten leveren even goede extracten op. De meest veelzijdige werking hebben extracten van basenrijke, neutraal reageerende, humusrijke gronden, die zoowel veel resistente echte humus bevatten, als ook veel versche of zelfs levende plantendeelen. Nog rijkere extracten verkrijgt men uit tuin- en afvalcompost, maar compost- en mestextracten zijn vaak al hinderlijk rijk aan oplosbare voedingsstoffen (koolhydraten en eiwitafbraakproducten).

Echte stalmest, vooral versche, levert veel minder algemeen bruikbare extracten dan grond of compost. Hij bevordert wel alle bacillen en ook sommige cellvibrionen (de niet specifieke, gele, van het z.g. „mest"-type) zeer sterk, maar de meeste andere organismen worden veel meer begunstigd door extract van grond of tuincompost.

De lichtere gronden met minder humus leveren veel schralere en zwakker werkende extracten en de zuur reageerende podsol- en veengronden zijn de slechtste grondstoffen voor extractbereiding. De werking van echt oud veen, dat slechts zeer weinig levende microben bevat, is trouwens van geheel anderen aard. Daar spelen niet zoo zeer de gewone groeistoffen als wel de humuszuren een rol. Aan deze stoffen wordt soms een groeibevorderende werking op microben toegeschreven; mij is het echter niet gelukt deze bij de celluloseontledende organismen aan te toonen. De proeven met een suspensie van fijn gemalen oud mosveen genomen, leverden steeds een negatief resultaat op.

§ 5. ENKELE VOORBEELDEN VAN GROEIBEVORDERING.

Als eerste voorbeeld kan een karakteristiek geval van bevordering van een *Cellvibrio*-stam, dus van I*a*, door een actinomyceet, dus II*e*, besproken worden. Dit is het meest voorkomende geval bij de cellulose-ontleding in den grond. Het bevorderde organisme — dat in mijn collectie aangeduid wordt met Ia_5 — is een in jonge cultuur vrij lang staafje van $\pm 2 \times \frac{1}{2}\mu$, meestal zwak gekromd, zeer beweeglijk met eindstandige ciliën, Gram-negatief. Bij het ouder worden ontstaan steeds kortere staafjes, totdat in $\pm$ 14 dagen oude cultures alleen zeer korte staafjes tot coccen aanwezig zijn. De beweeglijkheid is dan ook verdwenen. De stam Ia_5 is een vrij zwakke cellulosesplitser, die op de zuivere celluloseagar nauwelijks tot zichtbare ontwikkeling komt en slechts na ergintoevoeging normaal groeit. Op celluloseagar met grondextract ontwikkelt hij zich matig. Op glucose en zetmeel groeit hij zeer goed, maar ook alleen bij aanwezigheid van groeistoffen. De cellulosesplitsing blijft vrijwel onverminderd bestaan ook bij toevoeging van 0.25 % glucose bij de celluloseagar. In de agar vormt Ia_5 vuil-witte lensvormige koloniën. Op de agar ontstaan kleine vlakke koloniën met een iets geschulpten en zeer dun uitloopenden rand. De agar wordt niet aangetast. Ia_5 is dus een *Cellvibrio*-stam van het omnivore, kortcellige type, zooals het o. a. door KALNINS (80) herhaaldelijk beschreven is (fig. 109).

Het bevorderende organisme is een typische vertegenwoordiger van mijn *Actinomyces*-soortgroep II, zoodat zijn beschrijving hier achterwege kan blijven (zie pag. 110). (Zijn nummer in mijn collectie is IIe_3). Het is een kleurlooze actinomyceet met lichtgrijze sporen. Hij splitst agar nòch cellulose en ontwikkelt zich op de celluloseagar dus slechts zwak, zoodat hij pas na de cellulosesplitsing door Ia_5 zijn volle ontwikkeling bereikt.

Deze symbiose werd reeds in 1933 ontdekt op celluloseagarplaten, die geënt waren met een suspensie van kleigrond uit den proefpolder bij Andijk. Zij stamt dus uit den nog niet geheel gerijpten en zeer basenrijken, jongen zeeklei-grond, die toen pas 5 jaar geleden droog-gelegd was. Deze eerste ruwe cultuur bevatte al meteen niet minder dan 4 gevallen van mengkoloniën of satellitisme, waarvan Ia_5 — IIe_3 het meest opvallend was. IIe_3 trad er nl. niet als een toevallige infectie in een of enkele exemplaren op, maar was op alle platen van de juiste verdunning in verscheidene koloniën vertegenwoordigd. Al deze koloniën waren omringd door een vrij dichten zwerm der kleine Ia_5-koloniën. Het was een der mooiste voorbeelden van het *Graszbergersche* satellitisme, dat ik ooit gezien heb (fig. 110*a*).

Het isoleeren van den bevorderaar leverde geen enkele moeilijkheid op, daar hij zoowel op celluloseagar zelfstandig tot eenige ontwikkeling komt, als ook op de glucoseagar, waarop hij zich zeer welig ontwikkelt. Meer moeite had ik met Ia_5, omdat ik toen pas in het begin stond van het symbioseonderzoek en de techniek er van nog niet beheerschte en bovendien, omdat de zwermen van satellietkoloniën bij nader inzien uit niet minder dan 2 verschillende *Cellvibrio*-soorten en één sporenvormer bleken te bestaan, die alle door IIe_3 bevorderd werden, maar die daarnaast ook elkaar beïnvloedden. Ia_5 of de sporenvormer bleken nl. tegelijk met IIe_3 aanwezig te moeten zijn voor een volledige ontwikkeling van den tweeden *Cellvibrio*-stam. Door de gecompliceerdheid der onderlinge verhouding lukte het pas na herhaalde tegenslagen de symbiose te ontwarren en de simpele begunstiging van Ia_5 door IIe_3 vast te stellen.

Het door IIe_3 gesynthetiseerde ergin behoort tot de groote groep der traag diffundeerende tegen warmte en droogte bestendige *Actinomyces*-groeistoffen. Het laat zich in zijn werking op Ia_5 vervangen door aardappelsap en andere plantenextracten. Ook is IIe_3 te vervangen door eenige andere actinomyceten en enkele bacillen (fig. 110*b*). Men heeft hier dus te maken met een zeer algemeene groeistof, die volstrekt niet specifiek is.

Het tweede voorbeeld is van geheel anderen aard. In den loop van 1934 zag ik nl. vaak op platen, die met suspensies van zwaren grond uit de Wieringermeer geënt waren, min of meer geel gekleurde koloniën, die de cellulose vrij sterk splitsten, zelf echter niet forsch uitgroeiden. Microscopisch bestonden zij uit lange en korte staafjes van verschillend karakter met soms sporuleerende exemplaren er tusschen. Het overenten van deze, in sommige monsters zeer algemeen voorkomende koloniën mislukte aanvankelijk volkomen. Zij sloegen of in 't geheel niet aan of gaven slechts een zeer schrale ontwikkeling van kleine witte, de cellulose nauwelijks splitsende, koloniën, die uit sporuleerende groote staafbacteriën bestonden. Verdere overentingen dezer kleine koloniën op celluloseagar met of zonder grondextract mislukten steeds. Ook hun overenting op celluloseagar met speciale toevoegingen van glucose, pepton of manniet leverde geen groei op. Wel echter verkreeg ik zeer weelderig groeiende, groote, nat-glimmende, bolle, slijmige, dooiergele tot geelbruine koloniën op celluloseagar met glucose, als ik de oorspronkelijke gelige koloniën van de ruwe cultuur er op overentte. Een deel dezer koloniën bleek daarbij de cellulose zeer sterk en snel te ontleden en vormde breede, heldere velden, terwijl een ander gedeelte heelemaal geen cellulosesplitsing

te zien gaf. De cellulosesplitsende koloniën bleken na verloop van enkele dagen troebel te worden en vertoonden op het laatst vaak platte, witte uitloopers, die geheel en al uit de sporenvormende staafjes bestonden, die ook de schrale witte koloniën der eerste overenting op de celluloseagar vormden. Men had hier dus met mengkoloniën te maken. De niet splitsende koloniën bleven daarentegen bol-nat en veel doorschijnender. Hierin trof ik geen sporuleerende staven aan en het microscopische beeld maakte geheel den indruk van een zuivere cultuur van een staafbacterie van het coli-aërogenestype. Het isoleeren van deze bacterie leverde op celluloseagar met glucose verder geen moeilijkheden op. Veel moeilijker was het van den cellulosesplitsenden sporenvormer een geheel zuivere cultuur te winnen, daar hij zich alleen bij direct contact met de gele bacterie goed ontwikkelde — dus mengkoloniën vormde — maar al op kleinen afstand van de koloniën der gele bacterie niet tot ontwikkeling kwam. Ik kreeg er dus geen satellietkoloniën van, zoodat ik hem in den beginne dan ook alleen als mengcultuur met de gele bacterie kon voortkweeken. Eenigen tijd later bracht een toeval uitkomst uit deze moeilijkheid: op een der celluloseagarplaten (dus zonder glucose) met een overenting van zulk een mengkolonie vormde zich om een toevallige *Actinomyces*-kolonie een auxanogram van den sporenvormer. Hierdoor kon deze nu op dezelfde wijze als de *Cellvibrio* uit het eerste voorbeeld (Ia_5) rein gekweekt worden op celluloseagar, waarop entstrepen van den bevorderenden actinomyceet uitgestreken waren of op den met dezen „voorbereiden" voedingsbodem. De zoo gekweekte reine cultuur leverde het vereischte materiaal op voor alle verdere onderzoekingen. Ten eerste was het dus gebleken, dat de sporenvormer door twee verschillende bevorderaars begunstigd kon worden: ten eerste door den actinomyceet, die een voor deze groep karakteristieke gemakkelijk diffundeerende en thermoresistente groeistof levert, en ten tweede door de gele bacterie, die een aan de levende cel gekoppelde groeistof produceert. Tusschen den sporenvormer en den actinomyceet kreeg men dus een mooi satellitisme van het *Graszbergersche* type te zien en tusschen den sporenvormer en de gele bacterie een *Neissersche* mengkoloniën-vorming. De verhouding sporenvormer-actinomyceet zal hier niet nader besproken worden, de symbiose van den sporenvormer met de gele bacterie daarentegen is het mooiste voorbeeld van niet diffundeerende erginen en zal hier dus in 't kort geanalyseerd worden.

Het bevorderde organisme — de sporenvormer — is een op zich zelf weinig opvallende bacil, die op de grens staat van mijn groepen „Clostridium-type" en „Lange-type". Het is een beweeglijke bacil,

met peritrich ingeplante, talrijke, lange zweepdraden. De afmetingen der staven zijn op celluloseagar met glucose ca. 3 à 4 × ½ à ¾ μ. Bij het ouder worden neemt de lengte merkbaar af. De sporenvorming manifesteert zich pas vrij laat (in ± 10 dagen oude cultures), maar strekt zich dan over het grootste deel der individuën uit. De sporen zijn ovaal en ontstaan vrijwel eindstandig in de cellen. Zij zijn aanzienlijk dikker dan de cellen, zoodat trommelstokachtige vormen ontstaan. De afbeeldingen 111 en 112 toonen dit organisme in een jonge cultuur resp. bij het sporuleeren. Zijn kolonievorm en groeiwijze komt het meest overeen met die van het „Clostridium-type". In de agar ontstaan nl. samengesteldlensvormige gladde koloniën. Op het agar-oppervlak spreidt hij zich uit als platte witte koloniën met een verdikten rand.

Omtrent de voedingeischen van dit organisme kan vermeld worden, dat het, afgezien van de groeistoffen, zich met cellulose als eenige C-bron kan voeden. Het is echter volstrekt niet specifiek en kan even goed ook zetmeel en oplosbare suikers gebruiken. Als N-bron zijn NH_4- en NO_3-verbindingen beide bruikbaar, maar ook pepton en albumine geven even goeden groei. In mijn collectie is deze bacil opgenomen als Ib_1.

Het bevorderende organisme — de gele bacterie — beantwoordt aan de volgende omschrijving: Korte staafjes van circa 0.75 à 3 × 0.5 μ, met enkele langere individuën. In oude cultures veel opgezwollen involutievormen. Gram-negatief, beweeglijk, ciliën peritrich ingeplant, geen sporenvorming. Zeer karakteristiek is de neiging der staafjes om zich in stervormige groepjes te rangschikken (fig. 113), hetgeen vooral bij de cultuur in een hangenden druppel sprekend tot uiting komt. In de agar vormen zich bolle lensvormige koloniën, op de agar slijmige nat-glimmende waterige doorschijnende bolle koloniën. De kleur is steeds op alle gecontroleerde voedingsbodems eigeel tot bruingeel. Deze kleurstof diffundeert niet in de agar. Melk wordt niet veranderd. Op bouillon geen huidvorming. Zuur wordt uit geen der gecontroleerde koolhydraten gevormd (glucose, saccharose, maltose).

Overziet men deze omschrijving, dan komt men vrij zeker tot de conclusie, dat deze bacterie overeenstemt met *Bacterium herbicola* Burri et Duggeli volgens Lehman-Neumann [1]). Deze veronderstelling werd bovendien bevestigd door het vergelijken van mijn gele bacterie met een cultuur van *B. herbicola* uit de collectie van het Microbiologische Laboratorium der Landbouwhoogeschool te Wageningen. Zij bleken vrijwel identiek te zijn en, wat nog belangrijker is,

[1]) Lehman. K. B. und Neumann, R. O.; „Bakteriologie", 7e Aufl., 1927.

de cultuur uit Wageningen kan mijn gele bacterie ook geheel vervangen bij het bevorderen van Ib_1. Ik meen dan ook gerechtigd te zijn mijn gele bacterie met *B. herbicola* BURRI et DUGGELI te vereenzelvigen. Zij kan bij gebruik van een suikerrijken doch eiwitloozen voedingsbodem in elken grond gevonden worden. In mijn colletie is zij opgenomen als IIa_1.

Het verdere onderzoek der onderlinge beïnvloeding van Ib_1 door IIa_1 bracht aan het licht, dat de door *B. herbicola* voortgebrachte groeistof op geen enkele wijze van de levende cel van dit organisme gescheiden kan worden. Hij diffundeert niet naar buiten en vormt dus geen zone van bevordering om de koloniën heen. Ook lukt het niet hem door het koken der cultuur vrij te maken. Het was dus onmogelijk er mede „voorbereide" voedingsbodems te maken. Ook het mechanische stukwrijven der cellen door het bewerken van de cultuur met diatomeënaarde in een mortier of kogelmolen, voerde niet tot het beoogde doel, want een door bacteriedichte filtratie daaruit vervaardigd extract werkte volstrekt niet bevorderend. Het was dus noodzakelijk om een mengcultuur te doen ontstaan, wilde men de groeibevordering bereiken. Dit was dus een van de meest sprekende en meest merkwaardige voorbeelden van aan de levende cel gekoppelde erginen.

Hoe men zich de werking er van op het bevorderde organisme — dat zich toch steeds buiten de cel van den bevorderaar bevindt — moet voorstellen, is nog niet duidelijk, maar ik vermoed, dat de verklaring daarin gezocht moet worden, dat het ergin toch niet volstrekt ondiffundeerbaar is. Een min of meer toevallige waarneming heeft mij op dit denkbeeld gebracht. Boven werd reeds vermeld, dat Ib_1 niet alleen door *B. herbicola,* maar ook door een actinomyceet bevorderd werd. Deze bevordering was heel sprekend en deed $I\,b_1$ welig groeien en de cellulose behoorlijk splitsen. Nu bleek echter, dat ook verscheidene andere organismen en ook sommige kunstmatige extracten op Ib_1 een bevorderende werking hadden en wel ook extracellulair, dus door diffundeerende erginen. Sommige dezer stoffen werkten echter onvolledig. Zij stelden Ib_1 wel in staat zich eenigszins te ontwikkelen, maar een weelderige groei bereikte hij niet en bovendien bleef de cellulosesplitsing dan nagenoeg weg. Zeer mooi kwam deze beperkte bevordering tot uiting bij toevoer van grondextract. Op zulke grondextract bevattende celluloseagarplaten deed zich nu het merkwaardige verschijnsel voor, dat *B. herbicola* Ib_1 ook extracellulair kon bevorderen, al was het ook slechts zeer traag en alleen op zeer korten afstand (slechts enkele mm ver). Vlak tegen een kolonie van *B. herbicola* groeiden de schrale koloniën van Ib_1 forscher uit en splitsten dan op den duur ook de cellulose zichtbaar. Fig. 114 toont

zulk een bevordering van twee entstrepen van Ib_1 en IIa_1 naast elkaar. De tegen de *B. herbicola* gerichte zijde der kolonie van den sporenvormer is forscher uitgegroeid en heeft een oplossingszone in de cellulose gevormd.

Al deze waarnemingen van verschillende bevorderingen en verhoudingen van Ib_1 tot *B. herbicola* en tot andere groeistofleveranciers maken het zeer waarschijnlijk, dat men hierbij met een ingewikkeld stelsel te maken heeft, waarbij verscheidene groeistoffen naast elkaar werkzaam zijn. Wij staan hier nog voor een vrijwel onontward probleem en het zou zeer zeker de moeite waard zijn hierin meer klaarheid te brengen door een gedetailleerde scheiding en identificatie der erbij betrokken erginen en enzymen, waardoor men wellicht zelfs een meer algemeen geldig schema van de onderlinge beïnvloeding van microben zou kunnen opstellen.

Het derde voorbeeld vertegenwoordigt een zeer hechte symbiose van een *Cellvibrio*-soort, die als voedingsleverancier, maar tevens als groeistofconsument optreedt (dus I*a*) met een de cellulose niet splitsende *Cytophaga* (= cystenlooze *Myxococcus* dus II*f*). De bevorderaar, de *Myxococcus*, werd reeds beschreven als het eerst ontdekte dezer organismen op pag. 95—96. De *Cellvibrio* is een vrij karakteristieke vertegenwoordiger dezer groep. Hij is iets te kort om tot de groep I*a* der cellvibrionen (zie pag. 60) gerekend te kunnen worden en moet als een overgangsvorm tusschen I*a* en I*b* opgevat worden. Hij is vrijwel kleurloos en zeer beweeglijk. Verder is hij gekarakteriseerd door zijn uitgesproken specificiteit voor cellulose, waarin hij dus niet onderdoet voor de meest gespecialiseerde stammen, zooals IV_{1a} of IV_{11}, uit mijn collectie.

Deze symbiose werd pas in 1937 ontdekt in den zandgrond uit het Noorden van de Wieringermeer, dus in basenrijken zeezandgrond. De op de platen der ruwe cultuur verschijnende koloniën maakten den indruk van *Cytophaga*-koloniën; zij vertoonden echter in het centrum van de oplossingszone steeds een macroscopisch zichtbare witte kolonie. Bij overenting verkreeg ik twee kolonietypen: 1. dezelfde als in de ruwe cultuur en 2. vuilgele, trechtervormig in de agar ingezonken, kleine, de cellulose niet splitsende koloniën. De eersten bestonden uit een *Cellvibrio*- en een *Cytophaga*-achtig organisme, terwijl het tweede kolonietype alleen de *Cytophaga* bevatte (fig. 62).

Deze laatste bleek zeer gemakkelijk als geheel zuivere cultuur gekweekt te kunnen worden, daar zij zeer weinig eischend was en zelfs op leidingwateragar zonder toevoegingen zich vrij behoorlijk ontwikkelen kon, dank zij haar vermogen agar te splitsen (vandaar de

ingezonken putjes-vormige groei). Maar een nog betere groei verkreeg men op zetmeelagar, waar het zetmeel ook sterk afgebroken werd en op leidingwateragar met een geringe hoeveelheid glucose (b.v. 0.1 %). Hoogere concentraties van oplosbare koolhydraten werkten schadelijk. Deze *Myxococcus* werd ook door grondextract en eenigszins door sommige bacillen (o. a. door *Bac. subtilis* COHN.) merkbaar bevorderd, maar noodzakelijk was deze bevordering niet. Op kiezelzuurplaten zonder eenige energiebron behalve cellulose kwam hij alleen in symbiose met cellulosesplitsers tot ontwikkeling. Hier was dus de levering van celluloseafbraakproducten voor zijn voeding noodzakelijk.

De door den *Myxococcus* gesynthetiseerde groeistof bleek ook tot de groep der niet diffundeerende, aan de levende cel gekoppelde erginen te behooren en werkte alleen bij een direct contact der levende cellen van bevorderaar en bevorderde. Het aantoonen dezer verhouding had in dit geval ongeveer hetzelfde verloop als bij het vorige voorbeeld, zoodat een nadere omschrijving ervan achterwege kan blijven. In mijn collectie komen deze organismen voor als Ia_{14} resp. IIf_1. De door IIf_1 geproduceerde groeistof — die zooals alle niet diffundeerende erginen zeer teer en onbestendig is — kan eigenlijk door geen der onderzochte extracten, nòch door een product van een microbe geheel vervangen worden. Dit symbiosegeval is dus een der meest op zich zelf aangewezene, die ik ontmoet heb.

In dit verband moet er nog op gewezen worden, dat een analoge werking van een ondiffundeerbare groeistof ook uitgaat van de eenigen tijd later ontdekte tweede cellulose niet splitsende *Cytophaga* (zie pag. 97), die een *Proactinomyces*-soort stimuleert. Dit is echter een facultatieve en geen obligate bevordering, daar de proactinomyceet ook in reincultuur al vrij behoorlijk groeit. Dit is dus een geval van een bevordering van Ie door II*f*.

Terwijl de voorbeelden 2 en 3 — hoe interessant zij ook zijn — vrij zeldzame gevallen vertegenwoordigen, betreft het hieronder volgende vierde voorbeeld wederom een zeer algemeen voorkomend type van bevordering, n.l. dat van echte *Cytophaga's* (cystenvormende en cystenlooze) door bacillen. Men heeft hierbij te maken met de gemakkelijkst en snelst diffundeerende groeistoffen, die ik bij de cellulosesplitsers gevonden heb. Als voorbeeld zal hier worden genoemd een cystenlooze *Cytophaga* (Ic_4), bevorderd door een zelf de cellulose niet splitsenden bacil (IIb_3). Binnen deze symbiosegroep is de specificiteit slechts gering. Door den bevorderaar in kwestie wordt dan ook niet alleen deze *Cytophaga*, doch zonder uitzondering àlle *Cytophaga's* uit mijn collectie bevorderd.

De bevorderaar is een zeer kleincellige bacil van het „lange-sporentype" met overigens zeer weinig opvallend uiterlijk. De afmetingen der cellen zijn op celluloseagar ca. 2 × 0.5 μ. De langwerpige sporen verschijnen vrij laat en zijn op celluloseagar zelden talrijk, op suikerhoudende voedingsmedia is de sporulatie na uitputting van den voedingsbodem vrij algemeen. Jonge cultures zijn zeer beweeglijk; hun beweging is in den regel krachtig en tuimelend, waardoor men een polaire inplanting der ciliën zou kunnen vermoeden. De cellen zijn bovendien vaak eenigszins gekromd en in het midden iets dikker dan aan de polen. Deze beide kenmerken en de geringe afmetingen der cellen wijzen er op, dat deze bacil op celluloseagar uitsluitend in het dwergstadium aanwezig is (Zie pag. 72—74, fig. 115 en 116). Op suiker- en eiwithoudende voedingsmedia komen naast even kleine cellen ook veel grootere tot ontwikkeling. Daar treden dus de normale en de dwergvorm naast elkaar op. In de agar vormt deze bacil korrelig-vertakte koloniën zonder de agar te splijten (fig. 117). Op de agar en tusschen agar en glas spreidt hij zich zeer snel en soms ver uit als een zeer dunne en soms nauwelijks zichtbare laag.

De voedingeischen van IIb_3 zijn eveneens weinig opvallend. Hij is niet in staat onoplosbare polysacchariden aan te tasten (agar, cellulose, zetmeel) en heeft dus suikers noodig. Maar hij is zeer weinig eischend, zoodat hij op celluloseagar en leidingwateragar al tot een zichtbare ontwikkeling komt. Zijn stikstofbehoefte kan hij met NH_4, NO_3 en ook met eiwitten dekken.

Aan een nader onderzoek heb ik dit organisme niet onderworpen, daar het volstrekt geen exclusieve positie inneemt. Zijn rol kan bij de bevordering der *Cytophaga's* door vele andere — deels zelfs zeer algemeen bekende — bacillen overgenomen worden, o. a. werken *Bac. subtilis en Bac. mesentericus* zeer gunstig. De beteekenis van IIb_3 is alleen gelegen in zijn zeer algemeene verspreiding in vrijwel alle grondsoorten en in de hardnekkigheid, waarmee hij zich met de *Cytophaga's* symbiontisch vermengd houdt. Toch zijn niet alle aërobe sporenvormers in staat *Cytophaga's* op celluloseagar te bevorderen. Vele soorten zijn geheel onwerkzaam en enkele werken zelfs antagonistisch, terwijl zij toch nòch morphologisch nòch in hun voedingeischen van de bevorderend werkende soorten belangrijk afwijken. Er bestaat dus wel degelijk een duidelijke specificiteit onder de bacillen.

De *Cytophaga* Ic_4 kan hier geheel onbeschreven blijven, daar zij vrijwel in alles het type der cystenlooze *Cytophaga's* vertegenwoordigt. Zij is zeer klein van stuk. Op celluloseagar zijn de cellen van jonge cultures ca. 3.0 × 0.2 μ groot.

Dit geval van bevordering werd vele malen waargenomen en bestudeerd; het kwam in vrijwel alle grondsoorten voor, maar was het meest algemeen in compost en dergelijke ophoopingen van organisch materiaal. *Cytophaga*-cultures, vooral die van de cystenlooze soorten, zijn bij den eersten kweek op agar practisch gesproken altijd zeer sterk vermengd met sporenvormers en wel het meest met den zoo juist beschreven kleinen bacil IIb_3. Deze sporenvormer behoort dan ook tot de meest algemeene grondbewoners; door zijn groeiwijze valt hij echter niet op en alleen zijn functie van *Cytophaga*-bevorderaar stempelt hem tot een belangrijke microbe. Door zijn geringe afmetingen, zijn vermogen om zich snel en bijna onzichtbaar òp en ònder de agar te verspreiden (te kruipen) en door de vorming van slecht zichtbare, vage koloniën in de agar is IIb_3 een zeer hardnekkige en moeilijk te elimineeren begeleider der *Cytophaga*'s. Het heeft mij dan ook vaak veel moeite gekost *Cytophaga*-cultures er geheel van te zuiveren. Dit is vooral lastig, omdat hij in de schrale celluloseagar als reine cultuur zeer slecht en onopvallend groeit en slechts vermengd met de *Cytophaga*-koloniën of vlak er tegen aan tot betere ontwikkeling komt en daardoor goed waarneembaar wordt.

Het zou interessant zijn, IIb_3 te vergelijken met de begeleidende organismen, die STAPP en BORTELS (174) bij hun cystenlooze *Cytophaga*'s vonden. Het is niet onmogelijk, dat hij identiek zal blijken te zijn met een van deze, niettegenstaande hij een sporenvormer is en zij alleen van bacteriën spreken, want de sporenvorming treedt bij IIb_3 pas laat op en is zelden algemeen.

Het laatste, hier in het kort te memoreeren voorbeeld is dat van de bevordering van één actinomyceet door een andere. Deze gevallen zijn over het algemeen niet talrijk onder de cellulosesplitsers, daar de actinomyceten in den regel actieve erginproducenten zijn en dus weinig behoefte hebben aan ergintoevoer van buitenaf. De hier te noemen uitzondering is daardoor des te interessanter, vooral ook omdat de bevorderende actinomyceet ook door verscheidene bacteriën vervangen kan worden.

In mijn collectie komt het bevorderde organisme voor als If_{13}. Het is een myceliumarme, traag groeiende actinomyceet, grijszalmkleurig met donkerbruine sporenophoopingen. De kleine bolronde sporen worden in en op het substraat afgescheiden en vormen donkere korstjes in het centrum der kolonie. Luchtmycelium ontbreekt geheel. De hyphen zijn zeer variabel van dikte, rijkelijk vertakt en weinig gekromd. De voor vele myceliumrijke actinomyceten karakteristieke spiraalvormig opgerolde hyphentakken heb ik bij If_{13} nooit kunnen

waarnemen. Het is dus een vertegenwoordiger van mijn soortgroep VI.

De bevorderaar — in mijn collectie IIe_7 — is een snel en krachtig groeiende vertegenwoordiger van mijn soortgroep I, van licht grijswitte kleur met iets langwerpige sporen. Een nadere beschrijving is overbodig. Hij splitst zelf de cellulose niet, zoodat zijn ontwikkeling op celluloseagar slechts zwak is (fig. 101).

Dit geval van bevordering is zeer weinig specifiek: IIe_7 kan dan ook door vele andere actinomyceten — vooral van de soortgroepen I en II — als ook door *Bact. herbicola* en sommige andere bacteriën vervangen worden. De enkele groeistof-eischers onder de actinomyceten zijn dus weinig kieskeurig en laten zich door ettelijke organismen bevorderen. De voor de *Cytophaga's* zoo bij uitstek werkzame sporenvormers bleken hier echter geheel te falen. Door grond- en compostextract wordt If_{13} ook al vrij sterk bevorderd. Extracten van versche plantendeelen (aardappel, wortel, meel, etc.) werkten echter zeer slecht.

If_{13} is geen obligate erginconsument, daar hij op zuivere celluloseagar ook zelfstandig eenigszins tot ontwikkeling komt en dus ongelimiteerd hierop voortgekweekt kan worden, maar een normale ontplooiing is alleen mogelijk met de vereischte groeistoffen. De benoodigde hoeveelheid ervan schijnt echter zeer gering te zijn, daar zelfs een paar druppels compostextract reeds voldoende zijn om de groeiremming op te heffen; ook ziet men bij het overenten steeds een duidelijk versterkte groei vlak rondom de kleine van de oude cultuur afkomstige agarbrokjes, ook al was die oude cultuur op zuivere celluloseagar en ver van een kolonie van den bevorderaar gegroeid. Opvallend voor If_{13} is het ook, dat zijn groei-remming door ergin-gebrek steeds duidelijke verzwakking der celluloseontleding ten gevolge heeft (fig. 118, 119 en 120).

If_{13} is een zeer algemeen voorkomende grondbewoner, dien ik in vrijwel alle onderzochte gronden aantrof, vooral in de humusarme, basenrijke, jonge zeeklei- en zavelgronden. Of hij in de natuur voor de celluloseontleding van groot belang is, is zeer twijfelachtig, daar hij een zeer trage groeier is. Onder de myceliumarme actinomyceten van mijn soortgroepen V en VI heb ik trouwens verscheidene op groeistoftoevoer van buitenaf aangewezen soorten gevonden, een algemeen verschijnsel is het er echter niet en de snelgroeiende *Actinomyces*-typen zijn steeds in staat zelf in hun erginbehoefte te voorzien.

§ 6. „COÖPERATIE-GROEPEN" VAN MICROBEN IN DEN GROND.

In den loop van de vele isoleeringen van cellulosesplitsers uit verschillende grondsoorten is zeer sprekend tot uiting gekomen een zekere constantheid in de samenstelling der bij den eersten uitzaai op de platen tot ontwikkeling komende microben. Steeds zag ik dezelfde soorten bij elkaar, en wel niet alleen cellulosesplitsers, maar ook begeleiders en satellieten. Deze waarneming zou in 't geheel geen aandacht getrokken hebben, indien zij zich alleen manifesteerde bij het werken met één grond of met nauwverwante grondtypen, maar het feit, dat vaak zeer uiteenloopende grondtypen vrijwel dezelfde soorten in de ruwe cultures opleverden, die dan ook steeds tezamen òf alle aanwezig, òf alle afwezig waren, is wel het vermelden waard. Het maakte dus geheel den indruk, alsof bepaalde soortencombinaties van microben zich steeds vormden, zoodra er in het milieu aan bepaalde essentieele voorwaarden voldaan was, terwijl zij overigens zeer ongevoelig zijn voor bijkomstige veranderingen in hun omgeving.

Een exacte experimenteele bewerking van dit verschijnsel is uit den aard der zaak moeilijk, daar de grond een al te gecompliceerd en moeilijk hanteerbaar milieu is, terwijl elke toepassing van selectieve voedingsbodems het geheele phenomeen op losse schroeven zet. Aanvankelijk was het bij de door mij geconstateerde soortencombinaties volstrekt niet zeker, dat het werkelijke — in den grond al aanwezige — groepeeringen zijn. Het was even goed mogelijk, dat al de soorten, waaruit de vermeende combinatie opgebouwd is, in vrijwel alle gronden wel aanwezig zijn te midden van ontelbare andere microben, maar dat zij alleen diegenen zijn, die zich op de celluloseagar laten kweeken. De waargenomen combinaties — ik wil ze voortaan „coöperatie-groepen" noemen — zouden dan slechts het eerste resultaat van de selectieve werking van de celluloseagar zijn.

De eerste sterke aanwijzingen, dat men hierbij met werkelijke vaste groepeeringen te maken heeft, die in den grond reeds als zoodanig bestaan, verkreeg ik pas op den duur, toen ik over zeer veel waarnemingen beschikte en er generaliseerende conclusies uit kon trekken; toen ik dus met zekerheid kon vaststellen, dat ten eerste de soortsamenstelling van elke waargenomen coöperatie-groep vrijwel constant is, zoodat overgangen nauwelijks bestaan en dat ten tweede op denzelfden celluloseagarvoedingsbodem en bij dezelfde werkwijze zich uit verschillende monsters soms dezelfde, maar soms ook geheel verschillende coöperatie-groepen ontwikkelen. Bovendien komen vaak eenige duidelijk herkenbare coöperatie-groepen naast elkaar in denzelfden grond voor

of volgen elkaar daarin althans op, zonder dat men duidelijke redenen van hun opkomst en achteruitgang kan aanwijzen. Maar steeds komen en gaan zij in hun geheel en is het geen geleidelijke overgang van de eene groep in een andere. Men is dus gerechtigd aan te nemen, dat de telkens weer gevonden soortencombinaties reëele groepeeringen zijn, die zich als automatisch zichzelf begrenzende coöperatie- of levensgemeenschappen van constanten opbouw vormen, afhankelijk van de heerschende levensomstandigheden en allicht ook in voortdurenden concurrentiestrijd met andere dergelijke coöperatie-groepen. Men moet echter wèl bedenken, dat de op de celluloseagar gevonden constante soortencombinaties slechts verwrongen afspiegelingen van de ware coöperatie-groepen kunnen zijn, bestaande alleen uit dié, tot zulk een groep behoorende, soorten, welke zich op celluloseagarplaten kunnen ontwikkelen. De ware, complete associaties zullen vermoedelijk uit méér verschillende microben bestaan, waarvan sommige op andere voedingsbodems tot ontwikkeling gebracht zouden moeten worden.

De voornaamste reden voor het zich aaneensluiten van de leden van zulk een coöperatie-groep moet gezocht worden in de onderlinge begunstiging van de afzonderlijke soorten, die elkaar aanvullen en ondersteunen bij de voeding. Daarom omvat elke coöperatie-groep ook physiologisch zeer verschillende organismen, terwijl het optreden van méér dan een physiologisch gelijkwaardige soort in één groep vrij zeldzaam is.

Selectieve voedingsbodems zijn bij uitstek geschikt om de natuurlijke coöperatie-groepen te benadeelen. Men kan zich er dus over verbazen, dat op de celluloseagar in 't algemeen nog iets van deze groepen is overgebleven. Vermoedelijk moet het op de levensomstandigheden in den natuurlijken grond gelijkende, aan oplosbare voedingsstoffen arme, karakter van de celluloseagar — vooral als grondextract eraan is toegevoegd — hiervoor als verklaring dienen.

Ik moet mij voorloopig tevreden stellen met de behandeling van op celluloseagar tot ontwikkeling komende soortencombinaties. Het zal nog zeer veel werk vereischen om geleidelijk de in den grond werkelijk aanwezige, complete coöperatie-groepen te leeren kennen. Toch lijkt het mij gewenscht hier een drietal voorbeelden van sprekende coöperatie-groepen, zooals zij zich op celluloseagar voordoen, te beschrijven. Men kan daarbij het best uitgaan van de in de vorige paragraaf reeds besproken voorbeelden van groeibevordering, daar zulke duidelijke symbiosen vaak de kern vormen van geheele coöperatie-groepen. Vermoedelijk is nl. productie en consumptie van groeistoffen mede een der voornaamste oorzaken van de vorming en in stand houding van de coöperatie-groepen.

Zoo vormt dan ook het eerste, op pag. 179—180 omschreven, bevorderingsvoorbeeld van een cellvibrio (Ia_5) door een actinomyceet (IIe_3) de kern van een grootere gemeenschap, die behalve deze beide organismen steeds ook nog twee andere actinomyceten, één *Polyangium*, één coliachtige bacterie en niet minder dan drie proactinomyceten of mycobacteriën bevat. Vaak sluit zich daarbij ook de kleine bacil aan, die op pag. 185—187 als bevorderaar van cytophagen beschreven werd. Cellulolytisch werkzaam is in deze coöperatie-groep alleen de *Cellvibrio* en in zwakke mate één der actinomyceten, de rest is voor zijn voeding aangewezen op oplosbare stoffen. Al deze organismen komen op celluloseagarplaten (met grondextract) naast elkaar tot ontwikkeling en zijn zelfs zóó aan elkaar gebonden, dat men ze bij dikken uitzaai onbeperkt lang in hun geheel van plaat op plaat kan overenten.

Deze in de meeste basenrijke minerale gronden voorkomende en zeer sprekende coöperatie-groep is karakteristiek voor gronden zonder toevoer van celluloserijk versch organisch materiaal. Zoodra er weer versch materiaal aanwezig is (na onderploegen van een stoppel, groenbemesting of stalmest), verdwijnt deze groep in haar geheel of wordt althans verdrongen door een andere, eveneens karakteristieke en constante groep, die juist typeerend is voor de eerste phasen van de ontleding van plaatselijk opgehoopte plantenresten. Zij bestaat uit één of twee cellulose splitsende actinomyceten, beide behoorend tot mijn soortgroep V en verder uit één welig groeienden sporenvormer van het type *Bac. subtilis* één *Polyangium*-soort (van een ander type dan bij de eerst genoemde coöperatiegroep) en minstens drie verschillende geel gekleurde, zeer kortcellige vibrionen, van het z.g. „mest-type", waarvan één zwak cellulolytisch werkzaam is (zie pag. 60 en 149—150).

Het verdringen van de ééne coöperatie-groep door een andere verloopt niet gelijktijdig door den geheelen grond, maar beperkt zich tot zeer kleine gebieden. Zoo kan er bij een worteltje of ander plantendeel de ééne groep en op eenige cm er vandaan een andere den boventoon voeren. Gaat men van gemengde en gehomogeniseerde grondmonsters uit, dan manifesteeren de coöperatiegroepen zich in den regel niet zoo duidelijk, daar men dan steeds mengsels van eenige ervan uitzaait, maar als men kleine kruimeltjes grond gebruikt, heeft men heel veel kans de coöperatie-groepen in zuiveren vorm te verkrijgen. Zeer waarschijnlijk waren de soortencombinaties, die WINOGRADSKY (216) bij toepassing van zijn nieuwe methode zag, zulke coöperatie-groepen.

Er treden haast altijd, plaatselijk van elkaar gescheiden, verschillende coöperatie-groepen tegelijk op in een grond. In den basenrijken mineralen grond van het jonge mariene Alluvium, waarin de beide

bovenstaande coöperatie-groepen thuis hooren, komen zeer zeker nog enkele andere analoge groepen voor, die ik wel vaak gevonden, maar nog niet nader bestudeerd heb. Eén er van groepeert zich om de symbiose van cellulosesplitsende polyangiden met begeleidende actinomyceten, een andere om cellulolytisch actieve proactinomyceten en begeleidende actinomyceten en *B.herbicola*-achtige organismen. In elk type grond kan men dus naast elkaar verscheidene van zulke coöperatie-groepen aantreffen en dat alleen al op het gebied der celluloseontleding. Zeer waarschijnlijk echter is het geheele microbenleven in den grond gegroepeerd in dergelijke vaste soortencombinaties, zoodat hun aantal heel groot kan zijn, als men alle physiologische groepen er bij behandelt.

Het op pag. 185—187 omschreven geval van bevordering van *Cytophaga's* door bacillen kan als derde en wederom als een sprekend voorbeeld van de vorming van een geheele coöperatie-groep om zulk een symbiose dienen. De op celluloseagar zich steeds weer ontwikkelende soortencombinatie omvat in dit geval naast de elkaar rechtstreeks bevorderende cytophagen en bacillen nog minstens twee actinomyceten — de eene behoorende tot mijn soortgroep VI, de andere tot de soortgroep I — één *Bact. herbicola*-achtige bacterie en verscheidene elkaar na verwante, kleine, geel gekleurde pseudomonadaceeën, waarvan sommige zwakke cellulosesplitsers zijn. Deze laatste organismen werden op pag. 149—150 reeds als een „hoofd"vorm voor compost, mest en dergel. beschreven. Zij maken ook deel uit van de vorige beschreven coöperatie-groep.

Het eerst beschreven voorbeeld van een coöperatie-groep is het eenige, dat nauwkeuriger geanalyseerd is. De er bij behoorende organismen werden alle rein gekweekt en nader onderzocht. Een volledige determinatie er van heb ik niet verricht. Bij de overige waargenomen coöperatie-groepen heb ik mij beperkt tot het empirisch herkennen en microscopisch analyseeren er van. Toch hoop ik t. z. t. in deze richting verder te kunnen doorgaan, aangezien het nog een volkomen braak liggend terrein is en een oriënteering in deze richting ons inzicht in den opbouw en de functie van de microflora in den grond in nieuwe banen kan leiden.

Het is opmerkelijk, dat het bestaan van geconsolideerde coöperatiegroepen van een constante soortsamenstelling onder de microben tot nu toe niet duidelijk waargenomen is, terwijl het toch als een vanzelfsprekend iets geldt bij de hoogere planten en dieren. Er is ook geen enkele reden aan te voeren, waarom de eencellige bewoners van den grond zich niet zouden voegen naar het algemeene natuurstreven om bij de verschillende milieux aangepaste centripetale associaties te vormen. De sterke neiging tot het aangaan van sym-

biosen wegens het vormen en consumeeren van groeistoffen maakt de microben juist bijzonder geschikt voor het leven in hecht associatieverband. De onzichtbaarheid van de microben en het werken met electieve voedingsbodems hebben echter steeds de natuurlijke groepeering der soorten verborgen, zoodat men den indruk kreeg, alsof de microben in den grond geheel zonder regelmaat en ongegroepeerd aanwezig zijn. Ook ik heb mij steeds van electieve voedingsbodems bediend bij het onderzoek der celluloseontleding en het is dan ook slechts een gelukkig toeval, dat de celluloseagar met grondextract een milieu is, dat zich in zijn voedingstoestand nauw aansluit bij natuurlijken grond, zoodat hierop enkele der natuurlijke coöperatie-groepen of althans fragmenten ervan als herkenbare eenheden tot ontwikkeling konden komen. Mischien moeten de groepen van begeleidende microben, die STAPP en BORTELS (174) steeds bij hun cystenlooze cytophagen vonden en waarvan ten slotte toch slechts één of enkele als echte bevorderaars noodzakelijk bleken te zijn, als zulke coöperatie-groepen opgevat worden. Of het ooit zal gelukken de volledige microbenassociaties in den grond te leeren kennen, zoodat men, analoog aan de plantensociologie ook de microbensociologie zal kunnen opbouwen, is nog zeer de vraag, gezien de vele technische moeilijkheden; een poging om de grondbeginselen er van te leeren kennen is echter alleszins de moeite waard.

Wil men de studie van associatievorming bij de microben systematisch opzetten, dan zal men vermoedelijk niet bij den grond moeten beginnen, maar bij minder gecompliceerde media met een soortenarmere populatie. Desnoods zou men kunstmatige media kunnen vervaardigen, b.v. uit kwartszand, minerale voedingsoplossing en slechts één of enkele organische energiebronnen, zooals zuivere cellulose of zuivere glucose, die men dan echter aan de volledige natuurlijke immigratie (= infectie) moet blootstellen. Cellulose is voor dit doel trouwens ook niet de meest geschikte stof, daar zij via vele tusschenproducten afgebroken en gemineraliseerd wordt, zoodat zeer veel physiologisch ver uiteenliggende microben er bij tot ontwikkeling kunnen komen. Stoffen met kleinere moleculen, zooals glucose, zullen hiervoor vermoedelijk beter geschikt zijn.

Bijvoegsel:

§ 7. METHODIEK VAN HET KWEEKEN VAN CELLULOSE SPLITSENDE MICROBEN, DIE GROEISTOFFEN VEREISCHEN.

Het onvermogen van sommige cellulose splitsende microorganismen om zelfstandig op de streng selectieve (z.g. „synthetische") voedingsbodems te groeien, is vaak zeer hinderlijk, daar het een normale werkwijze bij het isoleeren en kweeken dezer organismen onmogelijk maakt. In den loop van mijn werk

ben ik dan ook herhaaldelijk vastgeloopen op deze moeilijkheid, waarbij het isoleeren van reine cultures mislukte. Steeds deed zich weer het verschijnsel voor, dat een organisme, dat in ruwe cultures zeer welig groeide en actief de cellulose aantastte, na het elimineeren van de begeleidende microben niet meer wilde aanslaan.

De vele pogingen om van al deze organismen toch goede en welig groeiende zuivere cultures te verkrijgen hebben mij in den loop der tijd verscheidene bruikbare methodes doen vinden, die ik hier in het kort zal opsommen om anderen het opnieuw overwinnen van dezelfde moeilijkheden zoo veel mogelijk te besparen.

1. In de eerste plaats kan vaak een afdoende remedie verkregen worden door het *toevoegen van extracten van plantaardig of dierlijk materiaal* aan den cellulose-voedingsbodem. Vaak kon ik door toevoeging van slechts kleine hoeveelheden van plantenextracten (aardappel, wortel, spinazie, sinaasappel, etc.) de groeistagnatie in eens opheffen. Vooral de — trouwens zeldzame — groeistofeischende bacillen werden door plantenextracten duidelijk begunstigd, maar ook vele cellvibrionen en zelfs actinomyceten konden door zulke extracten in staat gesteld worden op celluloseagar te groeien. Van nog meer belang en veel universeeler in zijn uitwerking is echter mest-, compost- of grondextract. Dit is gebleken verreweg het gunstigste extract te zijn. Een bevorderende werking van compost- of grondextracten was zelfs zóó algemeen onder de cellulosesplitsers, dat ik op den duur er toe overging in de meeste gevallen ± 5 vol. % er van aan de voedingsbodems toe te voegen en ik liet het voortaan alleen weg in die gevallen, waarin een streng synthetische voedingsbodem vereischt werd.

Voor de bereiding van extracten van plantaardige en dierlijke weefsels kan het volgende schema als voorbeeld dienen: het betreffende weefsel wordt, na fijngehakt te zijn, 2 uur lang met water geëxtraheerd bij een temperatuur van ca. 50° C, daarna opgekookt (niet langer dan 5 minuten) en heet gefiltreerd. Dan volgt een steriliseering in de autoclaaf, 10 minuten op 115° C. Ontstaat daarbij opnieuw een neerslag, dan laat men deze bezinken en hevelt voor gebruik de bovenstaande heldere vloeistof af, zulks om een onnoodige herhaling der steriliseering te voorkomen. In de keus van de gewichtsverhouding weefsel — water is men vrij. Uit gemaksoverwegingen trachtte ik steeds geconcentreerde extracten te bereiden, waarvan dan in sommige gevallen slechts enkele druppels toegevoegd behoefden te worden. Bij versche plantendeelen werd in den regel deze verhouding gekozen als 1 : 2. Bij droge stoffen moest meer water (bijv. 1 : 3) genomen worden. Bij het opkoken dient men voortdurend te roeren om aanbakken en oververhitting te voorkomen. Het winnen van volkomen heldere filtraten is vrijwel altijd zonder speciale maatregelen mogelijk, als men het eerst doorloopende troebele vocht weer op het filter brengt. Al spoedig wordt het filtraat dan geheel helder.

Ook bij de bereiding van grond- of compostextracten en van persgistextract werden soortgelijke schema's gevolgd. Grond werd in de verhouding van 1 op 2 en gist in die van 1 op 3 à 1 op 4 gebezigd.

Naast al deze decocten moeten soms ook koud gewonnen extracten bereid worden, aangezien bij de verhitting sommige extracten hun bevorderende werking verliezen. Dat geldt vooral voor de bevordering van cytophagen en cellvibrionen. Daarvoor werden de grondstoffen liefst zonder eenige water-toevoeging uitgeperst in een hydraulische pers tot 500 atm. druk. Alleen bij zeer droge stoffen moest de fijn verdeelde stof met water aangemengd worden.

Na schudden gedurende 2 à 3 uur in een schudtoestel werd door filtratie het extract gewonnen.

Bij het winnen van perssappen dient men de stof in kwestie niet te fijn te verdeelen. Grovere snippers laten zich in den regel gemakkelijker uitpersen dan heel fijn raspsel.

Zulke perssappen of extracten werden dan op de gebruikelijke wijze door Chamberland-kaarsen bacterievrij gefiltreerd en na controle van hun steriliteit bewaard. Deze controle moet zeer zorgvuldig geschieden en tijdens het bewaren nog enkele keeren herhaald worden, daar de Chamberland-kaarsen vaak scheurtjes krijgen, ten gevolge waarvan vóór dien betrouwbare kaarsen ineens microben gaan doorlaten.

Op pag. 174—176 werd reeds de werking van de natuurlijke extracten beschreven. Hier zij alleen nog gewaarschuwd voor het gebruik van te véél extract. Van de aftreksels van versche plantendeelen moeten ten hoogste 1 à 2 vol. % gegeven worden en zelfs het extract van gewonen kleigrond mag niet meer dan 5 à 10 % bedragen. Bij hoogere giften krijgt men al heel gauw een te voedingrijk milieu met een onderdrukking der celluloseontleding en in vele gevallen ook een abnormalen groei der betreffende organismen.

2. In vele gevallen, waarin grond- of plantenweefselextract geen afdoende hulp brengt, kan het beoogde doel bereikt worden door het *toevoegen van een gunstig werkenden bevorderaar*. De meest primitieve werkwijze is het gemengde uitzaaien. In den regel is dit echter niet noodig en kan men den begeleider zelf vervangen door diens extract, wederom òf door sterilisatie in de autoclaaf verkregen, òf bereid als koud gesteriliseerd aftreksel. Hiervoor moet de bevorderaar dan van te voren op een vloeibaren of agarvoedingsbodem gekweekt worden. Deze voedingsbodem wordt dan òf in zijn geheel gefiltreerd en gesteriliseerd en aan den synthetischen cellulosevoedingsbodems toegevoegd, òf men trekt hem — in de gevallen van vaste voedingssubstraten — met water uit en gebruikt dit extract. In den regel is ook hierbij een toevoeging van slechts een kleine hoeveelheid voldoende om het beoogde doel te bereiken.

Nog doeltreffender bleek het in sommige gevallen, niet de verkregen extacten aan den cellulosevoedingsbodem toe te voegen, doch den bevorderaar éérst op den celluloseagar te laten groeien, deze dan te steriliseeren en daarna op dezelfde voedingsbodem den cellulosesplitser in kwestie te enten. Ik heb de zoo bereide voedingsbodems „voorbereide" voedingsbodems genoemd. Deze laatste werkwijze is vooral in die gevallen noodzakelijk, waarin de bevorderaar slechts weinig van het ergin produceert, zoodat sterke verdunning niet mogelijk is. Dan kan men op deze wijze de hoogste concentratie van de groeistof bereiken.

Voor het routinewerk kan men vaak met een nog eenvoudigere werkwijze volstaan, men kan n.l. den levenden bevorderaar op een agarplaat naast het te onderzoeken organisme uitstrijken, zoodat zich entstrepen van beide microben naast elkaar bevinden. Of men brengt entstrepen van den bevorderaar op gietcultuurplaten van het te onderzoeken organisme aan, waardoor rondom de entstrepen koloniën ervan tot ontwikkeling komen. Men maakt zoo dus kunstmatige satellietkoloniën.

In deze simpele uitvoering is de werkwijze van het ruimtelijk naast elkaar kweeken van bevorderaar en bevorderde echter niet bruikbaar als één van beiden in sterke mate over het agaroppervlak kruipt en in vloeibare voedingsbodems is zij uit den aard der zaak ook onuitvoerbaar. In deze omstandigheden kan men echter zijn toevlucht nemen tot bacteriedichte poreuse begrenzing door

b.v. den bevorderaar in een Chamberlandkaars te kweeken en het bevorderde organisme er buiten, of door het gebruik van de bacteriedichte filtreerplaatjes van gesinterd glas van Schott u. Gen. Ook is het mogelijk speciale cultuurbuizen te laten vervaardigen, die door zulk een poreus glasschotje in twee helften gescheiden zijn, hetgeen wel duur is, maar het werk zeer vergemakkelijkt en veel mogelijkheden biedt.

3. Bij de op pag. 163 omschreven *gevallen van „auto-katalytische" bevordering*, dus bij de organismen, die alleen aan den gang komen bij dichte overenting, kan men in den regel toch geïsoleerd liggende koloniën op een agarplaat doen ontstaan, als men op een dun geënte gietcultuurplaat bovendien nog een dikke entstreep aanbrengt. Deze entstreep brengt dan in haar nabijheid ook de afzonderlijke kiemen aan het groeien, zoodat goed zichtbare en toch reine en geïsoleerde koloniën ontstaan.

In de gevallen van een echte vitale bevordering, waarbij dus alleen het rechtstreeksche contact van levende cellen van bevorderaar en bevorderde tot een goede ontwikkeling leidt, is uit den aard der zaak geen reine cultuur mogelijk, tenzij hetzelfde ergineischende organisme met een anderen bevorderaar ook tot ontwikkeling kan komen en wel met diffundeerende groeistoffen. Een dergelijk geval is het op pag. 181 omschreven voorbeeld van niet diffundeerende groeistoffen.

SAMENVATTING.

HOOFDSTUK I. LITTERATUUROVERZICHT.

Aangezien één der doelstellingen van dit onderzoek daarin bestond de al vrij groote en zeer verspreide litteratuur over de aërobe bacterieele celluloseontleding te ordenen en de vele daarin voorkomende tegenstrijdigheden te verklaren en uit den weg te ruimen, werd aan de litteratuurstudie een voorname plaats ingeruimd. Aan het slot kan dan ook een vrijwel volledige lijst der op dit onderwerp betrekking hebbende werken gegeven worden. Reeds uit de litteratuurstudie blijkt duidelijk, dat het vermogen om cellulose af te breken in het microbenrijk wijd verbreid is.

HOOFDSTUK II. METHODIEK.

In de omvangrijke litteratuur zijn reeds talrijke isoleerings- en kweek-methoden beschreven. Elke onderzoeker paste echter steeds maar één of enkele werkwijzen toe, waardoor hij een éénzijdig beeld van de cellulolytische microflora verkreeg. Elke methode werkt immers min of meer electief. Dit verklaart ook de vele tegenspraken in de litteratuur. Telkens werden slechts één of enkele cellulose splitsende soorten gevonden, die zich bij de toegepaste werkwijze konden ontwikkelen; en deze werden dan als de eenige of althans de voornaamste soorten beschouwd. Voor een volledig onderzoek bleek het dan ook noodzakelijk te zijn naast elkaar verschillende methodes toe te passen en verschillende media te gebruiken. De gunstigste werkwijze bleek te zijn het directe uitzaaien van grondsuspensies op celluloseagarplaten. Het gebruik en de bereiding van dezen voedingsbodem zijn dan ook uitvoerig weergegeven. Zelfs een vrij betrouwbare telling van alle in den grond voorkomende aërobe cellulosesplitsers bleek op den celluloseagar mogelijk te zijn. Daarnaast was het echter in vele gevallen noodzakelijk, aan de plaatcultuur het kweeken in een voedingsvloeistof met cellulosebrij te laten voorafgaan, of schijven filtreerpapier in den te onderzoeken grond in te graven.

Voor het beoordeelen van de intensiteit der celluloseafbraak door de verschillende microben moest een doeltreffende werkwijze uitgewerkt worden. Het kweeken der te onderzoeken cultures op strookjes filtreerpapier, rustende op schuin gestolde voedingsagar (zonder cellulose) in reageerbuizen, bleek een zeer goede methode te zijn.

HOOFDSTUK III. BESCHRIJVING DER CELLULOSE-ONTLEDENDE ORGANISMEN.

Een volledig beeld van de celluloseontleding in den grond kan alleen verkregen worden als men alle voorkomende cellulosesplitsers isoleert en hun beteekenis leert kennen. Daarom streefde ik er allereerst naar, een zoo volledig mogelijke inventarisatie der cellulose splitsende microben (behalve de echte actinomyceten en schimmels) te verkrijgen.

Het is mij, door de isoleeringstechniek zoo veel mogelijk te varieeren, bij deze pogingen gelukt, vrijwel alle in de litteratuur vermelde microben terug te vinden en te isoleeren. Bovendien bleken ook in enkele systematische groepen, waarin celluloseontleders tot nu toe onbekend waren, toch zulke soorten voor te komen (proactinomyceten, mycobacteriën).

De voornaamste groepen uit de lange lijst van cellulolytisch actieve microben zijn de volgende:

1. De cellvibrionen, waartoe ik alle vibrionen of pseudomonadaceën, die cellulolytisch werkzaam zijn, reken, dus niet alleen de oorspronkelijk door WINOGRADSKY zoo genoemde microben, maar ook zijn *Cellfalcicula* en de vele microben van KELLERMAN c.s., KALNINS, STAPP en BORTELS, etc. Tot deze organismen behooren zoowel zeer eenzijdig op cellulosevoeding gespecialiseerde organismen, als ook zeer omnivore soorten, die de cellulose slechts afbreken, als er geen gemakkelijker aantastbare stoffen aanwezig zijn. De cellvibrionen zijn zeer talrijk en vormen een der belangrijkste cellulose splitsende groepen in basenrijke aërobe gronden. Een goede systematische indeeling der cellvibrionen is niet mogelijk, aangezien zij geen eenheid vormen, doch slechts de cellulose ontledende stammen uit een zeer groote morphologische groep vertegenwoordigen. Morphologisch zijn de cellvibrionen immers niets anders dan vibrionen of pseudomonadaceën, en cellulose ontledende vertegenwoordigers treft men in vrijwel alle typen der pseudomonadaceën aan, naast ettelijke andere stammen, die dit vermogen missen, hoewel zij morphologisch van de eersten vaak niet te onderscheiden zijn. De benaming *Cellvibrio* is dan ook niet houdbaar.

2. De cytophagen. Dit is de groep van microben, die bij uitstek op de voeding met cellulose aangewezen is. Verscheidene bijzonderheden in hun morphologie en levenswijze, waarover in de litteratuur geen eenstemmigheid heerschte, werden nader geanalyseerd, o. a. de vorming en kieming der cysten, de beweeglijkheid en de specificiteit ten opzichte der cellulose. Het laatste punt leidde tot de conclusie,

dat de cytophagen toch minder specifiek zijn, dan oorspronkelijk aangenomen werd; door zeer kleine hoeveelheden oplosbare suikers worden zij in hun ontwikkeling zelfs bevorderd en pas concentraties van boven 0.1 % zijn schadelijk. Het lukte voorshands echter niet hen alléén van suikers, zonder cellulose, tot ontwikkeling te doen komen, hetgeen bij alle andere cellulosesplitsers wèl mogelijk is[1]).

De cytophagen vormen een vrij soortenrijke groep. Men kan er soorten in onderscheiden, die bij het ouder worden microcysten vormen, naast andere, die dit vermogen missen. De laatste zijn verreweg de talrijkste en moeten waarschijnlijk als de primitieve grondvorm beschouwd worden.

Naast de gewone cytophagen — zoowel cystenvormende als ook cystenlooze — werden verscheidene stammen van morphologisch gelijksoortige organismen geïsoleerd, die echter het vermogen om cellulose te splitsen misten en zich alleen met oplosbare koolhydraten konden voeden. Naar aanleiding hiervan werd de systematische plaats en indeeling van de geheele groep der cytophagen nader bezien, en werd voorgesteld hen — ook de cellulose-niet-splitsende soorten — als de meest primitieve vertegenwoordigers van het geslacht *Myxococcus* THAXTER der *Myxobacteriaceae* te beschouwen. De benaming *Cytophaga* dient dan te vervallen[2]).

3. De polyangiden. Deze behooren eveneens tot de *Myxobacteriaceae*, doch omvatten juist in tegenstelling tot de myxococcen de soorten met stompe celeinden. De ophooping van de losse individuen bij de vorming van groote vruchtlichamen is bij hen veel verder ontwikkeld dan bij de cytophagen, bij welke laatste slechts de z.g. „Sterren" als zeer primitieve of rudimentaire vruchtlichamen opgevat kunnen worden. Het is pas kort geleden, dat onder de polyangiden ook cellulosesplitsers gevonden werden. De mededeelingen konden nu bevestigd en verder uitgebreid worden. Alle celluloseontledende stammen behooren tot de geslachten *Sorangium* of *Archangium*. De door mij geïsoleerde stammen zijn nauw verwant of zelfs identiek met de door de KRZEMIENIEWSKI's en door IMŠENECKY en SOLNTZEWA beschreven organismen.

4. De bacillen. Ook deze vormen een voor de celluloseontleding zeer belangrijke groep, waarin talrijke zeer actieve soorten voorkomen. In tegenstelling tot de cellvibrionen en de cytophagen kon ik echter geen enkelen strikt specifieken cellulosesplitser onder de bacillen vinden, hoewel enkele stammen aan cellulose zeer zeker de voorkeur gaven, vergeleken bij oplosbare koolhydraten. De talrijke

[1]) Zie voetnoot op pag. 91.
[2]) Zie voetnoot op pag. 97.

cellulose ontledende bacillen kunnen in twee groepen verdeeld worden: in snel groeiende, zeer omnivore soorten en in traag groeiende, die min of meer specifiek aangepast zijn aan cellulose en andere macromoleculaire onoplosbare koolhydraten.

Ook morphologisch bleek onder de cellulose splitsende bacillen veel variatie voor te komen. Naast de karakteristieke groot-cellige rechte vormen, vindt men ook kleinere, vaak duidelijk gekromde stammen met min of meer polair ingeplante zweepdraden. Verscheidene dezer laatste stammen zijn zelfs zoodanig vibrio-achtig van bouw, dat men ze zeker tot deze organismen zou rekenen, indien zij geen endosporen vormden. In dit verband kan gewezen worden op de publicatie van STARKEY over de sporenvorming bij *Microspira desulfuricans*. De waarde van de sporenvorming als kenmerk van een geheele klasse van microben wordt hierdoor sterk verkleind. Maar ook afgezien van het vibrio-achtige karakter van sommige bacillen kunnen er een drietal morphologische groepen in onderscheiden worden. Een nauwkeurige omschrijving dezer groepen wordt gegeven.

5. De actinomyceten. Deze zijn hier minder diepgaand bestudeerd, daar zij geen specifieke cellulosesplitsers zijn en ook al door verscheidene onderzoekers beschreven werden. Toch moet men hieruit niet afleiden, dat zij van geringe beteekenis zijn voor de afbraak der cellulose. In tegendeel zijn zij, dank zij hun buitengewone talrijkheid, in de meeste gronden juist de belangrijkste cellulosesplitsers. Uit de onderzoekingen van WAKSMAN was reeds bekend, dat een hoog percentage der bekende *Actinomyces*-soorten in staat is cellulose te ontleden. Deze mededeeling kan bevestigd worden. Ook kan ik mij vereenigen met de zienswijze van JENSEN, dat niet alleen onder de typische actinomyceten, doch ook onder de door ØRSKOW ervan afgescheiden groep der *Micromonosporae* talrijke cellulose splitsende stammen voorkomen.

Hoewel ik alleen de cellulose ontledende soorten der echte actinomyceten nader bestudeerd heb, is zelfs bij deze oriënteerende onderzoekingen duidelijk gebleken, dat het geslacht *Actinomyces* te uitgebreid is. De verscheidenheid binnen deze eenheid is te groot om er slechts sóórten in te kunnen onderscheiden. Onafhankelijk van WAKSMAN moest nu dus een indeeling in „soortgroepen" aangebracht worden. Twee dezer soortgroepen heb ik echter tot vastere eenheden, dus tot genera of sub-genera, verheven, nl. de actinomyceten met in het substraat opzwellende en in sporen uiteenvallende hyphen, en de soorten met zeer lange rechte uit het substraat te voorschijn komende takken, die bros zijn en in onregelmatige brokstukken uiteenvallen. Van een benaming van deze sub-genera en groepen heb ik voor-

loopig nog afgezien, daar ik slechts de cellulose ontledende soorten bestudeerd heb, terwijl een juiste systematische indeeling ook bij de actinomyceten slechts mogelijk is, als men alle soorten erbij betrekt. Mijn soortgroepen en sub-genera wijken dan ook af van de door WAKSMAN onderscheiden groepen.

6. De proactinomyceten en mycobacteriën of corynebacteriën. In deze groepen van microben waren tot nu toe nog geen cellulose splitsende soorten gevonden. Door het onophoudelijk varieeren van de isoleeringstechniek is het nu echter gelukt ook onder deze microben verscheidene cellulose ontledende stammen aan te toonen, zoodat nu ook deze leemte in de lijst der cellulosesplitsers aangevuld is. De meeste actieve celluloseontleders behooren tot de groep der proactinomyceten met een relatief forsch ontwikkeld, wijd vertakt mycelium. Deze soorten onderscheiden zich trouwens ook in vele andere opzichten principieel van de mycelium-arme soorten, die een overgang naar de mycobacteriën vormen. Het geslacht *Proactinomyces* zou dus volgens deze kenmerken in twee sub-genera verdeeld kunnen worden.

Uit het gegeven overzicht komt wel heel duidelijk naar voren, welk een alom verspreide eigenschap de celluloseontleding in het microbenrijk is. Zeer waarschijnlijk is zij herhaaldelijk opnieuw ontstaan bij geheel verschillende organismen, gelijk dat met zoo vele vermogens der bacteriën het geval is. Het aantal cellulolytisch actieve microbensoorten is dan ook zeer groot zoowel in absoluten zin, als ook in verhouding tot het totaal van alle microben. Door dit inzicht wordt voorgoed gebroken met de nog vaak gehuldigde opvatting, als zou het ontleden der cellulose een eigenschap zijn, die beperkt is tot slechts weinige microben uit slechts enkele systematische groepen. Als systematisch kenmerk heeft de cellulosesplitsing daarmee veel van haar waarde ingeboet.

HOOFDSTUK IV. DE VERSPREIDING EN DE ROL DER CELLULOSE ONTLEDENDE MICROBEN IN DEN GROND.

Naast de catalogiseering en bestudeering van zoo veel mogelijk verschillende cellulosesplitsers werd als tweede doel van het onderhavige onderzoek getracht, een gefundeerd inzicht te verkrijgen in de verspreiding en de rol van de voornaamste cellulose ontledende microben in verschillende grondsoorten.

Gewapend met de verbeterde isoleerings- en herkenningstechniek konden nu in de onderzochte gronden de voornaamste soorten en

groepen van het bonte gezelschap der celluloseontleders kwantitatief bepaald worden. Zoodoende werd een inzicht verkregen in het aantal, de verspreiding en de functie van de verschillende cellulosesplitsers in de meest uiteenloopende grondsoorten.

Dit onderzoek richtte zich aanvankelijk voornamelijk op de normale cultuurgronden (weiland en bouwland) in ons zeeklei-gebied en op de jonge gronden van den Wieringermeerpolder. Later werd het echter ook uitgebreid tot de zandige gronden van het mariene alluvium en daarna ook tot gepodsoleerde diluviale zandgronden. Ten slotte werden ook verschillende zouthoudende gronden van de slikken en schorren als ook zee- en rivierbodemmonsters en een tuincompost in het onderzoek betrokken.

Voor de waarneming van de rolverdeeling bij de afbraak van celstofrijk materiaal werden de meeste grondsoorten onderzocht in den natuurlijken toestand en daarnaast ook na een bemesting met cellulose. Helaas moest dit gedeelte van het onderzoek zeer onvolledig blijven, zoodat het slechts als een eerste oriënteering opgevat moet worden, terwijl het aan latere onderzoekingen overgelaten moet worden andere milieux (veen, stalmest, geactiveerd slib, darminhoud, etc.) — ook in andere klimaten — op een soortgelijke wijze te behandelen. Toch kunnen nu al twee conclusies getrokken worden:

Ten eerste bleken vrijwel alle microbengroepen hun bepaalde min of meer belangrijke rol bij de cellulosesplitsing te vervullen. Het is dan ook ongemotiveerd om aan de hand van onvolledige waarnemingen sommige groepen of soorten als „belangrijk", andere als „onbelangrijk" te bestempelen. Men ziet integendeel een duidelijke successie dezer groepen bij de afbraak van versche organische deeltjes in den grond. Een zeer groote rol komt in de meeste gronden aan de actinomyceten toe, die numeriek vaak alle andere groepen tezamen overtreffen.

Ten tweede bleken in de meeste gronden na een bemesting met celstofrijk materiaal altijd maar enkele soorten kwantitatief van belang te zijn. Zulke soorten hebben dan het leeuwenaandeel in de cellulosesplitsing in den betreffenden grond. Deze „hoofd"-soorten werden aan een nader onderzoek onderworpen. In basenrijke gronden treden als „hoofd"-celluloseontleders in den regel actinomyceten, cellvibrionen of polyangiden op, hoewel in de zandige mariene gronden ook de schimmel *Stachybotrys alternans Bon.* als zoodanig werkzaam is. In de zure podsol-gronden treden alleen de schimmels *Cladosporium pisicolum* SNYDER, een *Chaetomium*-soort en *Humicola grisea* TRAAEN als „hoofd"-soorten op. In zeebodemmonsters komt deze rol toe aan enkele vibrio-achtige bacillen, terwijl ik in tuincompost steeds

de speciale korte cellvibrionen van het z.g. „mest"-type massaal aantrof.

Indien men een uitspraak wil hebben omtrent de al of niet belangrijkheid der verschillende cellulose splitsende microben, dan kunnen deze „hoofd"-soorten bijzonder belangrijk genoemd worden. Zij zijn dat echter alleen bij de snelle eerste phase der cellulose-ontleding.

HOOFDSTUK V. GROEISTOFWERKING BIJ DE CELLULOSEONTLEDING.

Het laatste onderdeel van deze studie vormt het onderzoek naar de werking van groeistoffen op de cellulose ontledende microben. Gedurende het geheele werk met de aërobe cellulosesplitsers werden nl. telkens gevallen van zeer geprononceerde groeistofwerking waargenomen, althans zoolang men zich van de vrijwel „synthetische" celluloseagar bediende. Deze voedingsbodem was bij uitstek geschikt voor het onderzoek naar een eventueele behoefte aan groeistoffen.

Het bleek al ras, dat zeer vele cellulose splitsende bacteriën in hun groei sterk bevorderd worden door de toevoeging van extracten van plantaardige of dierlijke stoffen, grond- of mestextract, urine en dergelijken en vaak ook door de stofwisselingsproducten van verschillende andere microben. De grootste behoefte aan zulke groeistoffen bezitten de min of meer specifiek op cellulose aangepaste organismen. In den regel heeft men hierbij te maken met vitamine-achtige biogene groeistoffen of erginen en niet met spoorelementen. Het zijn macromoleculaire stoffen of zij zijn althans aan eiwitachtige macromoleculaire stoffen als dragers gebonden. De meeste dezer groeistoffen bleken in water oplosbaar en vrij resistent tegen verhitting en uitdroging te zijn, maar zeer gevoelig voor een alkalische reactie. Vermoedelijk heeft men hier dus te maken met stoffen van de B-groep (Bios); een exact onderzoek naar hun aard en een maximale zuivering heb ik echter niet verricht. In enkele gevallen heeft men te maken met geheél, of zoo goed als geheel, onoplosbare stoffen, die onafscheidelijk met de hen synthetiseerende organismen verbonden schijnen te zijn.

In de meeste gevallen kunnen verschillende extracten en ook verschillende groeistofvormende microben elkaar in hun werking vervangen, zoodat het daarbij zeer algemeen voorkomende groeistoffen blijkt te betreffen, maar in sommige gevallen heeft men met specifieke stoffen te maken, die slechts door bepaalde begeleidende microben gesynthetiseerd worden.

De waargenomen gevallen van groeibevordering kunnen volgens verschillende criteria in groepen verdeeld worden. Zoo kan o. a. een gradatie aangebracht worden volgens de oplosbaarheid in water en de diffusiesnelheid — dus indirect volgens de molecuulgrootte der groeistoffen. Ook andere eigenschappen (resistentie tegen droogte, tegen hooge temperaturen, tegen alkalische reactie, houdbaarheid, etc.) kunnen dienen voor een indeeling der groeistoffen in groepen. Bovendien kunnen zij ingedeeld worden naar de organismen, waardoor zij gevormd worden; en ten slotte moet men scherp onderscheiden tusschen stoffen, die de algeheele ontwikkeling van bepaalde cellulosesplitsers begunstigen en andere, die alleen de ontleding der cellulose stimuleeren.

Het is opvallend, dat onder de cellulosesplitsers zoo vaak een uitgesproken behoefte aan groeistoffen aangetroffen wordt, terwijl vele andere microben dezelfde groeistoffen rijkelijk synthetiseeren kunnen. Hierdoor treft men bij de celluloseontleding vele verschijnselen van onderlinge begunstiging van verschillende microben aan. Dan eens zijn het mengkoloniën die slechts moeilijk in hun componenten gesplitst kunnen worden, dan weer wordt men op agarplaten getroffen door sprekende gevallen van de vorming van satelliet-koloniën. Steeds zijn de groei en de celluloseontleding optimaal in mengcultures, terwijl reincultures op de gewone synthetische cellulose-voedingsmedia soms zelfs in 't geheel niet levensvatbaar zijn. Men moet dan zijn toevlucht nemen tot het gebruik van groeistofhoudende extracten of tot het bereiden van de z.g. „voorbereide" voedingsbodems, dus van voedingsmedia, waarop eerst bepaalde begeleidende groeistof leverende microben gekweekt zijn, die dan door steriliseering gedood werden zonder hun groeistofwerking te verliezen. De talrijke gevallen van groeistofbehoefte maakten het werken met de cellulosesplitsers vaak lastig en ingewikkeld, zoodat vele methodische moeilijkheden eerst overwonnen moesten worden, alvorens men de eigenlijke problemen kon aanpakken. De voornaamste hierbij opgedane ervaringen zijn in een aanhangsel aan het laatste hoofdstuk samengevat.

Uitvoeriger dan de groeibevorderende stoffen zelf heb ik de verschijnselen van de onderlinge groeibevordering van cellulosesplitsers en begeleiders onderzocht. In den regel vindt de sterkste begunstiging plaats tusschen systematisch ver uiteen liggende organismen. Veel voorkomend is de begunstiging van cellvibrionen door actinomyceten. Een ander zeer belangrijk en algemeen geval is de bevordering van cytophagen door bacillen. Maar in enkele gevallen kunnen ook nauw verwante microben elkaar bevorderen — zooals de eene actinomyceet een andere.

Aan het slot van dit hoofdstuk worden enkele voorbeelden van

onderlinge groeibevordering van microben nader geanalyseerd. Aan de hand hiervan wordt een theorie opgesteld over de vorming van bepaalde associaties van microben in den grond, waarbij de leden vaste functies hebben en elkaar aanvullen. Deze associaties, analoog aan de associaties van hoogere planten, kunnen „Coöperatiegroepen" genoemd worden. Verschillende zulke „Coöperatiegroepen" kunnen gelijktijdig naast elkaar gelocaliseerd in den grond bestaan, zich aanpassend aan de plaatselijk heerschende omstandigheden. Zij volgen elkaar in den loop van het proces der mineraliseering van celstofrijk materiaal op in een bepaalde successie. Ook van zulke „Coöperatiegroepen" worden enkele voorbeelden uitvoeriger besproken en geanalyseerd.

CHAPTER I. SURVEY OF LITERATURE.

One of the aims of this investigation was the preparation of a comprehensive literature-survey on aerobic bacterial cellulose decomposition (which literature is both fairly extensive and widely scattered) and to explain and attempt to remove many contradictory statements occurring. Much importance was attached to the study of this literature. So it was possible at the end of this chapter to give a practically complete list of works referring to this subject. The mere study of the literature already proves that the ability to decompose cellulose is widespread among the microbes.

CHAPTER II. METHODOLOGY.

In the extensive literature numerous methods of isolation and culture have already been described. Each investigator, however, applied only a single method. In this way he obtained a one-sided notion of the cellulolytic microflora, every method being more or less elective. This one-sidedness also explains the many contradictions in the literature. Every time only one or a few cellulolytic species were found which could develop by the method adopted. These were then considered the only or at least the chief agents. For a complete investigation, however, it proved to be necessary to apply different methods side by side and to use various media. The best method proved to be to inoculate soil suspensions on plates of celluloseagar. Therefore the use and the preparation of this medium have been treated at some length. It even proved possible, on this medium, to obtain fairly reliable counts of the aerobic cellulolytic organisms occurring in the soil. Moreover it was often found necessary to grow the organisms in a liquid medium with cellulose pulp or on discs of filterpaper dug into the soil to be examined, prior to plating on cellulose agar.

An adequate method had to be developed to measure the intensity of cellulose-disintegration by different microbes. A very good method proved to be to culture the strains in question on strips of filterpaper spread upon agar slants (without cellulose).

CHAPTER III. DESCRIPTION OF THE CELLULOSE DECOMPOSING ORGANISMS.

A complete idea of the decomposition of cellulose in the soil can only be obtained when all of the cellulose-decomposing organisms present are isolated and their significance evaluated. Therefore I tried in the first place to obtain an inventarisation of the cellulolytic microbes (the genuine actinomycetes and moulds excepted).

By varying the methods of isolation as much as possible, I succeeded in detecting and isolating nearly all of the microbes which are mentioned in the literature. It appeared, moreover, that such species also occurred in some taxonomic groups where decomposition of cellulose had been hitherto unknown (proactinomycetes and mycobacteria).

The chief groups from the long list of cellulolytic microbes are the following:

1. The *Cellvibrio*-group; including all *Vibrioneae* or *Pseudomonadaceae*, which are cellulolytically active and not only the microbes originally so named by WINOGRADSKY, but also his *Cellfalcicula* and the many microbes of KELLERMAN c.s., KALNINS, STAPP and BORTELS, etc. Not only organisms narrowly specialized on cellulose belong to this group, but also very omnivorous species which only disintegrate cellulose when no other carbon food is available. The cellvibrios are very numerous and form one of the most important cellulolytic groups in neutral or alcaline aërobic soils. It is impossible to give a good systematic classification of the cellvibrios, because they do not form a unity but only represent cellulose-decomposing strains within a large morphological group. For morphologically the cellvibrios are nothing but vibrios or *Pseudomonadaceae*, and representatives which dissolve cellulose are found in nearly all types of *Pseudomonadaceae*, besides several other strains which do not possess this ability, although they are often morphologically indistinguishable from the former. Therefore the name „*Cellvibrio*" is untenable.

2. The *Cytophaga*-group. This is a group of microbes which is preeminently dependent upon cellulose as a foodstuf. Several details in their morphology and development, about which the literature was not unanimous, were further analysed, i. a. the forming and germination of cysts, mobility and specificity in respect to cellulose. This last point led tc the conclusion that the *Cytophagae* are less specific than was originally assumed. They are even stimulated in their development by very small quantities of soluble sugar and only concentrations of more than 0.1 % of these substances are injurious. For the moment we have not yet succeeded in cultivating them on

sugar only, without cellulose, which was possible for all other cellulose-dissolvers [1]).

The *Cytophagae* form a rather varied group. Species may be distinguished which, on maturation, form microcysts, beside other species in which microcysts are lacking. The latter species are by far the most numerous and are to be considered as primitive forms.

Apart from the ordinary *Cytophagae* — those forming cysts as well as those which lack cysts — several strains of morphologically similar organisms were isolated, which, however, lacked the ability to decompose cellulose, and could only subsist on soluble carbohydrates. Consequently the systematic position and division of the whole group of *Cytophagae* was further investigated. It was suggested to consider them (also those species which do not decompose cellulose) as the most primitive representatives of the genus *Myxococcus* THAXTER of the *Myxobacteriaceae*. In this case the name *Cytophaga* should be abandoned [2]).

3. The *Polyangides*. These also belong to the *Myxobacteriaceae*, but include the species with rounded cell-ends, as contrasted with the *Myxococci*. The accumulation of the separate individuals in the formation of large fruiting bodies is much more developed among them than among the *Cytophagae*, where only the so-called „Stars" may be considered very primitive or rudimentary fruiting bodies. Only recently cellulose dissolvers were also found among the Polyangides. This could now be verified and extended. All the strains which dissolve cellulose belong to the genus *Sorangium* or *Archangium*. The strains isolated by me are closely related to, or even identical with, the organisms described by the KRZEMIENIEWSKI's and by IMŠENECKY and SOLNTZEWA.

4. The *Bacilli*. Also in this group numerous species occur which actively decompose cellulose. In contrast with the cellvibrios and the *Cytophagae*, however, I could not find one single strictly specific cellulose decomposing organism among the *Bacilli*, although some strains prefer cellulose to soluble carbo-hydrates. The numerous *Bacilli* which dissolve cellulose may be divided into two groups: in fast-growing omnivorous species and in slow-growing species which

---

[1]) When this study was ready for printing, I received some communications by R. Y. STANIER and by G. FÅHRAEUS, which were published during the war, and which therefore were not available for us until now. Their opinion is also, that the cytophagas can feed on glucose. They have studied this problem even more completely, than I have done.

[2]) When this study was finished, I received some publications by R. Y. STANIER, published during the war, where he describes different organisms belonging to the same type as my omnivorous Cytophagas. His opinion is in most respects indentical with mine.

have been more or less specifically adapted to cellulose and other macromolecular, insoluble, carbohydrates.

Morphologically the cellulolytic *Bacilli* also proved to belong to very different types. Apart from the characteristic large and straight rods, we also find smaller, often clearly bent strains with polar cilia. Several of these last-mentioned strains are so much like Vibrio's, that they should be included in this genus, if they did not form endospores. In this connection STARKEY's publication on the formation of spores by *Microspira desulfuricans* may be mentioned. The value of spore-formation as a characteristic of a whole class of microbes was greatly reduced by this. Apart from the vibriolike strains three morphological groups may be distinguished. A minute description of these groups is given.

5. The *Actinomycetes*. These have been studied less thoroughly, because they are not specific cellulose-disintegrators and have already been described by several investigators. From this it does not follow however, that they are of small importance for the disintegration of cellulose. On the contrary, owing to their great number, they are the chief cellulose-disintegrators in most soils. From the investigations of WAKSMAN we knew already that a high percentage of the known species of *Actinomyces* are able to decompose cellulose. This observation could be confirmed. I also agree with JENSEN's view that many cellulolytic strains occur not only among typical actinomycetes, but also among the *Micromonosporae* which are considered as a separate group by ØRSKOW.

Although I only studied more fully the cellulolytic species of the genuine actinomycetes, even these preliminary investigations proved clearly that the genus *Actinomyces* is too large for a mere subdivision in species. The variety in this genus is so great that independently from WAKSMAN a division into groups of species had to be made. Two of these groups, however, were raised to a more permanent unity (genera or sub-genera) viz. the actinomycetes with submerged hyphae swelling within the substrate and disintegrating into spores, and at the other hand, the species with very long and straight branches emerging from the substratum, which branches are brittle and disintegrate into irregular fragments. For the moment I have refrained from naming these sub-genera and groups, because I only studied those species which decompose cellulose. And a correct systematic division is only possible when all of the known species are included. Therefore my groups and sub-genera differ from those distinguished by WAKSMAN.

6. *Proactinomyces* and *Mycobacteria* or *Corynebacteria*. In these

groups of microbes no cellulose-decomposing species had as yet been found. By varying the methods of isolation continually we have, however, succeeded in finding many cellulolytic strains among these microbes as well, so that this gap in the list of cellulose-decomposing organisms has also been filled. Most of the active cellulose-decomposing forms belong to the group of proactinomycetes with a comparatively strongly developed, finely-branched mycelium. Also in many other respects these species differ essentially from those with poorly-developed mycelium, which form a transition to the *Mycobacteria*. According to these characteristics the genus *Proactinomyces* might be divided into two sub-genera.

This survey shows very clearly how widespread cellulose decomposition is among the microbes. Very probably this quality repeatedly manifested itself anew in quite different organisms, as it appears to be the case for so many properties of the bacteria. The number of cellulolytically active microbes is therefore very large in an absolute sense as well as in comparison to the total number of the microbes. This view has altogether done away with the thesis, often upheld, that cellulose decomposition is a quality which is limited to only some microbes out of a few taxonomic groups. The above consideration shows that cellulose decomposition has lost much of its value as a taxonomic characteristic.

CHAPTER IV. THE DISTRIBUTION OF CELLULOLYTIC MICROBES AND THEIR FUNCTION IN THE SOIL.

Besides registrating and studying as many different cellulose decomposing microbes as possible, the further purpose of the present investigation was to try to obtain a thorough insight into the distribution of the chief cellulolytic microbes and their function in different types of soils.

The improved methods of isolation and determination of these microbes enabled me to diagnose their chief species and groups and to count the specific organisms in the soils examined. In this way an insight was obtained into the number, the distribution and the function of different cellulose decomposing microbes in widely different soils.

At the outset chiefly the usual types of cultivated soils (pasture and arable land) in our marine clay region and the newly-reclaimed soils of the „Wieringermeerpolder" were examined. Afterwards this

investigation was extended to sandy soils of marine alluvium and to podsolised diluvial soils. Finally different saline soils of the tidal marshes as well as samples of the sea-and river-bottom and garden compost were included.

In order to observe the collaboration of the different microbes in the disintegration of materials containing much cellulose, most soils were examined in natural conditions and likewise after manuring with cellulose. This part of the investigation had to remain very incomplete, so that the results only have a preliminary character. Future investigators will have to treat other media (peat-soil, stable-manure, activated sludge, intestinal contents, etc.) in a similar way, and also in other climates. Still two conclusions may already be drawn:

Primo: nearly all groups of microbes appeared to play their special, more or less important part in the decomposition of cellulose. It is, therefore, unwarranted to call some groups or species important and others unimportant by reason of incomplete observations. On the contrary the different groups succeed one another during the process of decomposition of organic particles in the soil. In most soils a very important part is played by the actinomycetes, which numerically often exceed all other groups together.

Secundo: in most soils, after manuring with material containing much cellulose, only a few species proved to be quantitatively important. These species then have a lion's share in the cellulose decomposition in a given soil. These principal species were subjected to a further investigation. In alcaline soils as a rule actinomycetes, cellvibrios or polyangides occur as principal cellulose decomposing organisms, although in sandy marine soils the mould *Stachybotrys alternans* BON. is also very active. In the acid podsol soils only the moulds *Cladosporium pisicolum* SNYDER, a *Chaetomimum* species and *Humicola grisea* TRAAEN occur as principal species. In samples of seabottom this part is played by some vibrio-like *Bacilli*. In garden compost I always found the special short cellvibrios of the so-called „manure type" in great numbers. If an opinion is required about the importance of different cellulolytic microbes, these principal species may be considered as such. But they are only important in the first and active phase of cellulose decomposition.

CHAPTER V. IMPORTANCE OF ACCESSORY GROWTH-PROMOTING SUBSTANCES FOR CELLULOSE DECOMPOSING ORGANISMS.

The last part of this investigation concerns the study of the importance of growth-promoting substances to cellulolytic microbes. During our study on aërobic cellulose decomposing organisms we repeatedly met cases in which the great importance of growth-promoting substances seemed apparent, at least as long as use was made of the nearly synthetic cellulose agar. This medium proved to be eminently suitable for the investigation of a possible need of such substances. Very many cellulolytic bacteria soon appeared to be markedly stimulated in their growth by the addition of extracts of vegetable or animal materials, of soil or stable manure, urine, etc. and often by products of the metabolism of several other microbes. The organisms dependent, more or less specifically, upon cellulose, exhibit the greatest need of these materials. As a rule these are vitamin-like biogens or „ergines" [1]) and no trace-elements. They are materials with a rather high molecular weight or they are coupled with albuminoid macro-molecular materials as carriers. Most of these materials proved to be soluble in water and resistant against heating and desiccation, but they were very sensitive to an alcaline reaction. Probably these are materials of the Bios group; a precise investigation of their nature and a final purification were not carried out, however. In some cases we met with substances entirely, or nearly, insoluble. These substances apparently are inseparably connected with the organisms which generate them.

Most ergines are widespread, because different extracts and also several microbes, which produce these ergines, can replace one another in their activity. But in some cases we find specific ergines, which are only formed by special microbes.

The observed cases of growth stimulation may be divided into groups according to different criteria. A gradation may, among others, be applied according to the solubility in water and to the rate of diffusion — properties related to the molecular size of the ergines. But also other qualities, e.g. resistance against desiccation, to high temperatures, to alcaline reaction, stability, etc. may serve as criteria for a further classification. They may also be divided according to the organisms by which they are formed and, finally, we should differentiate sharply between substances which promote the entire development of certain cellulose-decomposing microbes and others which only stimulate the decomposition of cellulose.

[1]) See foot-note pag. 156.

It is a striking fact that, among cellulose decomposing organisms, we so often find a pronounced need of ergines, whereas many other microbes are able to form the same materials. Therefore, many cases of mutual stimulation are found in cellulose decomposition. Sometimes we find mixed colonies which may only with difficulty be segregated into their components, while in other instances a striking formation of satellite colonies is found on agar plates. Growth and cellulose decomposition are always optimal in mixed cultures, whereas pure cultures are often not even viable on the ordinary synthetic media. We must then have recourse to the use of extracts containing the ergines or make use of the so-called "prepared media", i. e. media on which certain ergine-producing microbes have been cultivated, with subsequent sterilization without destruction of the activity of the ergines. The frequent dependance upon ergines often makes work with cellulose decomposing microbes difficult and intricate. Therefore many methodical difficulties had to be overcome, before the problems themselves could be tackled. The chief methodological experiences have been summarized in an appendix to the last chapter.

The phenomena of mutual growth stimulation in cellulose decomposition were more thoroughly examined than the ergines themselves. As a rule the strongest stimulation takes place between systematically widely differing organisms. For instance the stimulation of cellvibrios by actinomycetes occurs frequently. Another important and general case is the promotion of *Cytophagae* by *Bacilli*. But in a few cases also closely related microbes can stimulate each other e. g. some species among the actinomycetes.

At the end of this chapter some cases of mutual growth promotion of microbes are further analysed. Based upon these investigations a theory is proposed on the formation of certain associations of microbes in the soil, the separate members of which have special functions and are able to assist one another. These associations, which are analogous to associations of higher plants, may be called "cooperation groups". Several of these "cooperation groups" may exist simultaneously in the soil, localized in different soil particles and adapted to the prevailing circumstances. They follow one another in a definite succession in the course of the process of mineralisation of materials containing much cellulose. A further analysis and discussion is given of certain of these "cooperation-groups".

The whole experimental work, the investigation of the available literature and the writing of this study were accomplished in the

year 1939. But the war-conditions prevented publication until now. In the first stage of the war I was mobilised, while later on it was impossible to graduate, unless you were a national socialist or a collaborator.

During the occupation of our country we received from abroad only the German publications. Very recently, however, I received from America, Russia and Sweden some publications dealing practically with the same subjects, I have described in some chapters of my study. Some of these communications analyse these problems even more detailed and more succesfully than I have done. It was now, however, impossible to include their new findings, which are mostly confirmations of my opinions, in this fully completed study. All I could do was to add these modern publications to the list of literature cited and to mention them in footnotes (zee page 91, 97 and 208).

ALPHABETISCH REGISTER DER LITTERATUUR OVER AËROBE CELLULOSEAANTASTING.

1. ARLINGTON-ANDERSON, J., „Inverkan av lättlösliga kväveföreningar på cellulosasönderdelningen i jorden". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 291, 1925.
2. ARND, TH., „Beiträge zur Kenntnis der Mikrobiologie unkultivierter und kultivierter Hochmoore". Zentralbl. f. Bakt., II, *45*, 1916, 544.
3. ASCHNER, M., „Cultivation of cellulose-splitting bacteria on membranes of *Acetobacter xylinum*". J. of Bact., *33*, 1937, 249.
4. BADIAN, J., „Z cytologji miksobakteryi (Zur Zytologie der Myxobakterien)". Acta Societatis Botanicorum Poloniae, *VII*, 1930, 55.
5. — „Badania cytologiczne nad miksobakterją *Polyangium fuscum* (Eine zytologische Untersuchung über die Myxobakterie *Polyangium fuscum*)." Acta Societatis Botanicorum Poloniae, *X*, 1933, 361.
6. — „Eine zytologische Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der Bakterien". Arch. f. Mikrobiol., *4*, 1933, 409.
7. BAKER, F., „Preliminary note on the role of coccoïd micro-organisms in the disintegration of cell-wall substances". Zentralbl. f. Bakt., II, *84*, 1931, 452.
8. — „Studies in the microbiology of organisms associated with the disintegration of vegetable remains, etc.". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 17.
9. BAKER, F., MARTIN, R., „Some observations of the iodophile microflora of the Caecum of the rabbit; with special regard to the disintegration of cell-wall substances". Zentralbl. f. Bakt., II, *96*, 1937, 18.
10. — „Observations upon the disintegration of cell-wall substances in the Caecum of the Guinea-Pig". Zentralbl. f. Bakt., II, *97*, 1937, 201.
11. BALDACCI, E., „La conception d'espèce chez les actinomycètes par rapport à leur classification et à leur détermination". Bolletino della Secione Italiana, Società Internaz. di Microbiologia, *IX*, 1937, 138.
12. BARTHEL, CHR., BENGTSSON, N., „Bidrag till frågan om stallgödselns verkningssätt vid cellulosasönderdelningen i åker-

jorden". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 248. 1923.
13. — „Action of stable manure in the decomposition of cellulose in tilled soil". Soil Sci., *XVIII*, 1924, 185.
14. — „Sönderdelning av inkrusterad cellulosa i jord." Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 300, 1926.
15. BAUR, E., „Myxobakterien-Studien." Arch. f. Protistenk., *5*, 1905, 92.
16. BENGTSSON, N., „Bestämning av inkrusterad cellulosa i jord". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 279, 1925.
17. BOJANOWSKY, R., „Zweckmäszige Neuerungen für die Herstellung eines Kieselsäurenährbodens und einige Beiträge zur Physiologie aerober Zelluloselöser." Zentralbl. f. Bakt., II, *64*, 1925, 222.
18. — „Über eisenbedürftige zellulosezerstörende Bakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 1.
19. — „Über das Eisenbedürfnis eines zellulosezerstörenden Pilzes und seinen Zusammenhang mit dem adsorptions-chemischen Verhalten des Ferroions". Zentralbl. f. Bakt., II, *99*, 1938, 48.
20. BOKOR, R., „*Mycococcus cytophagus n. sp.* 1929 (*Spirochaeta cytophaga* Hutch. et Clayt. 1919). Untersuchungen über aerobe, bakterielle Zellulosezersetzung mit besonderer Berücksichtigung des Waldbodens". Arch. f. Mikrobiol., *1*, 1930, 1.
21. BRADLEY, L. A., „A preliminary note on cellulose decomposing bacteria". Abstr. of Bacteriol., *VII*, 1923, 354.
22. BRADLEY, L. A., RETTGER, L. F., „Studies on aerobic bacteria commonly concerned in the decomposition of cellulose". J. of Bact., *13*, 1927, 321.
23. CARBONE, D., „Su la decomposizione aerobica della cellulosa". Boll. Soc. med. Pavia, *1*, 1910, 13, V; *?*, 1911, 1, IV. (Refer.: Zentralbl. f. Bakt., II, *32*, 1912, 252).
24. CHARPENTIER, C. A. G., „Kvantitativ bestämning av jordars cellulosasönderdelande förmåga". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 205, 1920.
25. — „Studien über den Einflusz des Rindvieh- und Pferdestallmistes auf die Zersetzung der Zellulose in der Ackererde". Dissert. Tavastehus, 1921.
26. — „Studier över stalljödselns inverkan på cellulosans sönderdelning i åkerjord". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 218, 1921.
27. CHRISTENSEN, H., „Ein Verfahren zur Bestimmung der Zellu-

losezersetzenden Fähigkeit des Bodens". Zentralbl. f. Bakt., II, *27*, 1910, 449.

28. — „Mikrobiologische Untersuchungen von Hoch- und Niederungs-Moortorf". Zentralbl. f. Bakt., II, *37*, 1913, 414.

29. — „Studien über den Einflusz der Bodenbeschaffenheit auf das Bakterienleben und den Stoffumsatz im Erdboden". Zentralbl. f. Bakt., II, *43*, 1915, 1.

30. CLAUSEN, P., „Studien über anaerobe Zellulosebazillen unter besonderer Berücksichtigung der Züchtungstechnik". Zentralbl. f. Bakt., II, *84*, 1931, 20.

31. CLEVELAND, L. R., „The physiological and symbiotic relationships between the intestinal Protozoa of Termites and their host with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar". Biolog. Bull. of the Marine Biolog. Labor., Woods Hole, Mass., *XLVI*, 1924, 178.

32. — „The ability of Termites to live perhaps indefinitely on a diet of pure cellulose". Biolog. Bull. of the Marine Biolog. Labor., Woods Hole, Mass., *XLVIII*. 1925, 289.

33. — „The effects of oxygenetion and starvation on the symbiosis between the Termite *Termopsis* and its intestinal Flagellates". Biolog. Bull. of the Marine Biolog. Labor., Woods Hole, Mass., *XLVIII*, 1925, 309.

34. — „Further observations and experiments on the symbiosis between Termites and their intestinal Protozoa". Biolog. Bull. of the Marine Biolog. Labor., Woods Hole, Mass., *54*, 1928, 231.

35. — „The symbiosis between the wood-feeding roach *Cryptocercus punctulatus* Scudder, and its intestinal Flagellates". Anatom. Rec., *47*, 1930, 293.

36. — „The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its Protozoa, and the symbiosis between Protozoa and roach". Mem. of the Amer. Acad. of Arts and Sci., *17*, 1934, 185.

37. CONN, H. J., „Soil Flora studies". V. „Actinomycetes in soil". N. Y. Agric. Exper. Stat. Techn. Bull. No. 60, 1917.

38. COOLHAAS, C., „Bijdrage tot de kennis der dissimilatie van vetzure zouten en koolhydraten door thermophiele bacteriën". Dissert. Wageningen, 1927.

39. COWLES, P. B., RETTGER, L. F., „Isolation and study of an apparently widespread cellulose-fermenting anaerobe *Cl. cellulosolvens* (n. sp?)". J. of Bact., *XXI*, 1931, 167.

40. DICKMAN, A., „Studies on the intestinal flora of Termites with reference to their ability to digest cellulose". Biolog. Bull.

of the Marine Biolog. Labor., Woods Hole, Mass., *61*, 1931, 85.
41. DISTAZO, A., „Sur un microbe qui désagrège la cellulose (*Bacillus cellulosae desagregans n. sp.*)". Compt. Rend. Hebd. d. S. et Mem. de la Soc. de Biol., *I*, 1911, 995.
42. DRECHSLER, CH., „Morphology of the genus *Actinomyces*". The Bot. Gaz., *LXVII*, 1919, 65; 147.
43. DUBOS, R. J., „The decomposition of cellulose by aerobic bacteria". J. of Bact., *XV*, 1928, 223.
44. — „Influence of environmental conditions on the activities of cellulose decomposing organisms in the soil". Ecology, *IX*, 1928, 12.
45. ELLENBERGER, W., „Zur Frage der Zelluloseverdauung". Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Phisiol. Chem., *96*, 1915-'16, 236.
46. FÅHREUS, G., „Wirkung von Glukose auf die Zellulosezersetzung einiger *Cytophaga*-Arten". Zentralbl. f. Bakt., II, *104*, 1941, 264.
47. FLEHMIG, T., „Untersuchungen über aerobe bakterielle Zellulosezersetzung". Dissert., Göttingen, 1932.
48. GEITLER, L., „Über *Polyangium parasiticum n. sp.*, eine submerse, parasitische Myxobakteriacee". Arch. f. Protistenk., *50*, 1925, 67.
49. GESCHER, N. v., „Über zellulosezersetzende Bacterien". Faserforschung, *II*, 1922, 28.
50. GOSMANN, W., „Einleitung zur Untersuchung des Zelluloseabbaus im menschlichen Darm". VII Mitteilung der Serie: „Über die Bakterien-flora des Darms" von VAN DER REIS. Zeitschr. f. d. ges. Exper. Med., *46*, 1925, 607.
51. GRAY, P. H. H., CHALMERS, C. H., „On the stimulating action of certain organic compounds on cellulose decomposition by means of a new aerobic microorganism that attacks both cellulose and agar." Ann. of Appl. Biol., *XI*, 1924, 324.
52. GRAY, P. H. H., THORNTON, H. G., „Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds". Zentralbl. f. Bakt., II, *73*, 1928, 74.
53. GROENEWEGE, J., „Untersuchungen über die Zersetzung der Zellulose durch aerobe Bakterien". Bull. du Jardin Bot., Ser. III, *II*, 1920, 261.
54. HENNEBERG, W., „Untersuchungen über die Darmflora des Menschen mit besonderer Berücksichtigung der jodophilen Bakterien im Menschen- und Tierdarm sowie im Kompostdünger". Zentralbl. f. Bakt., II, *55*, 1922, 242.
55. HEUKELEKIAN, H., „Decomposition of cellulose by the various groups of microorganisms of the soil". Abstr. of bact., *VIII*, 1924, 9.

56. Hopffe, A., „Bakteriologische Untersuchungen über die Zelluloseverdauung". Zentralbl. f. Bakt., I, Orig., *83*, 1919, 374.
57. — „Über einen bisher unbekannten zelluloselösenden, im Verdauungstractus vorkommenden Aspergillus, „*Aspergillus cellulosae*", seine Züchtung und seine Eigenschaften". Zentralbl. f. Bakt., I, Orig., *83*, 1919, 531.
58. Hoppe-Seyler, F., „Gährung der Cellulose". Ber. d. deutschen Chem. Ges., *16*, 1883, 122.
59. — „Über die Gährung von Cellulose mit Bildung von Mathan und Kohlensäure". II „Der Zerfall der Cellulose durch Gährung unter Bildung von Methan und Kohlensäure und die Erscheinungen, welche dieser Process veranlasst". Zeitschr. f. Physiol. Chem., *10*, 1886, 401.
60. Horowitz-Wlassowa, L. M., „Zur Frage der aeroben Zellulosezersetzung". Zentralbl. f. Bakt., II, *93*, 1936, 347.
61. Hutchinson, H. B., Clayton, J., „On the decomposition of cellulose by an aerobic organisms (*Spitrochaeta cytophaga* n. sp.)". J. of Agric. Sci., *IX*, 1918—1919, 143.
62. Imšenecky, A., Solntzewa, L., „(On aerobic cellulose-decomposing bacteria)". (Russisch). Bull. de l'Acad. d. Sci. de l'U.R.S.S., Classe d. Sci. Math. et Natur., ser. Biol., *1*, 1936, 1115.
63. — „(On cellulose decomposing Myxobacteria)". (Russisch). Microbiology, *VI*, 1937, 1.
64. Issatchenko, B. L., „Contribution to the question of aerobic decomposition of cellulose in connection with the formation of medicinal slime". Bull. Russ. Hydr. Inst., *1*, 1921, 164. (Refer. Abstr. of Bact., *VIII*, 1924, 77).
65. Issatchenko, B. L., Wackenhut, A. M., „Einige Beobachtungen über den Entwicklungszyklus des zellulosezersetzenden Organismus". Arch. f. Mikrobiol., *5*, 1934, 303.
66. Iterson, C. van, „De aantasting van cellulose door aërobe microorganismen". Versl. d. Kon. Acad. v. Wetensch., *XI*, 1903, 807.
67. — „Die Zersetzung von Cellulose durch aerobe Mikroorganismen". Zentralbl. f. Bakt., II, *XI*, 1904, 689.
68. Jahn, E., „Die Polyangiden". Beiträge zur botanischen Protistologie, I, Leipzig, 1924.
69. — „Kulturmethoden und Stoffwechsel-Untersuchungen bei Myxobakterien (Polyangiden)". Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. XII, Teil 2, Heft 6, 921, 1936.
70. Jensen, H. L., „Actinomycetes in danish soils". Soil Sci., *XXX*, 1930, 59.
71. — „The genus *Micromonospora* Ørskov, a little known group

of soil microorganisms". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LV*, 1930, 231.
72. — „Notes on a cellulose-decomposing soil Fungus of an unusual character". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LV*, 1930, 699.
73. — „Contributions to our knowledge of the *Actinomycetales*". I „A case of hereditary variation in the genus *Actinomyces*". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LVI*, 1931, 79.
74. — „A note on the systematic position of *Mucobacterium coeliacum*". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LVI*, 1931, 201.
75. — „Contributions to our knowledge of the *Actinomycetales*". II „The definition and subdivision of the genus *Actinomyces* with a preliminary account of Australian soil Actinomycetes". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LVI*, 1931, 345.
76. — „The microbiology of farmyard manure decomposition in soil". II „Decomposition of cellulose". J. of Agr. Sci., *21*, 1931, 81.
77. — „Contributions to our knowledge of the *Actinomycetales*". III „Further observations on the genus *Micromonospora*". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LVII*, 1932, 173.
78. — „Contributions to our knowledge of the *Actinomycetales*". IV „The identity of certain species of *Mycobacterium* and *Proactinomyces*". Proc. of the Linn. Soc. of New South Wales, *LVII*, 1932, 364.
79. Johnson, D. E., „Some observations on chitin-destroying bacteria". J. of Bact., *XXIV*, 1932, 335.
80. Kalnins, A., „Aerobic soil bacteria that decompose cellulose". Latvijas Ūniversitātes Raksti, Rīga, 1930, I, Sējums Tomus, 221.
81. Karnicka, H. Felsz-, „Rozkad cellulozy w glebach kwaśnych. (Sur la décomposition de la cellulose dans les sols acides)". Mém. de l'Inst. Nat. Polon. d'Econ. Rur. à Pulawy, *XVI*, Livr. 1, 1935, Mémoire No. 240, 1936.
82. Karnicka, H., Ziemięcka, J., „Cellulose decomposition in acid soils". Transact. of the Third Internat. Congr. of Soil Sci., Oxford, 1935, Vol. III, 109.
83. Karrer, P., Joos, B., Staub, M., „Zur Kenntnis des Lichenins". II. Helv. Chim. Acta, *6*, 1923, 800.
84. Kellerman, K. F., McBeth, J. G., „Soil organisms which destroy cellulose". Zentralbl. f. Bakt., II, *34*, 1912, 63.
85. — „The fermentation of cellulose". Zentralbl. f. Bakt., II, *34*, 1912, 485.

86. KELLERMAN, K. F., MCBETH, J. G., SCALES, F. M., SMITH, N. R., „Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria". Zentralbl. f. Bakt., II, *39*, 1913, 502.
87. KHOUVINE-DELAUNEY, Y., „Une anaérobie de l'intestin humain digérant la cellulose". Compt. Rend. Soc. Biol., (Paris), *87*, 1922, 922.
88. KHOUVINE, Y., „Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme. *B. cellulosae dissolvens n. sp.*". Ann. de l'Inst. Pasteur, *37*, No. 8, 1923, 711.
89. — „Cellulose et bactéries. Décomposition et synthèse". Exposées de chimie biologique, publ. sous la dir. de GABRIEL BERTRAND, No. 164, II, 1934.
90. KIESEL, A., SEMIGANOWSKY, N., „Zellulose-Bestimmung durch quantitatieve Verzuckerung". Ber. d. deutschen Chem. Ges., *60*, 1927, 333.
91. KOCH, A., „Über Luftstickstoffbindung im Boden mit Hilfe von Zellulose als Energie-Material". Zentralbl. f. Bakt., II, *27*, 1910, 1.
92. KOFLER, L., „Die Myxobakterien der Umgebung von Wien". Sitzungsber. d. Kais. Acad. d. Wiss. Mathem. Nat. Kl., *122*, Abt. I, 1913, 845.
93. KOSIN, N. J., „Über aerobe Zersetzung von Zellulose durch Schimmelpilze". Moskou, *2*, 1921, 57. (Refer.: Chem. Zentr., *93*, III, 1922, 874).
94. KRAINSKY, A., „Zur Frage der Zellulose-Zersetzung durch Mikroorganismen". Russ. Journ. f. exp. Landw., *14*, 1913, 255 (Russisch). (Refer.: Zentralbl. f. Bakt., II, *41*, 1914, 296).
95. — „Die Actinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur". Zentralbl. f. Bakt., II, *41*, 1914, 649.
96. KROULIK, A., „Über thermophile Zellulosevergärer". Zentralbl. f. Bakt., II, *36*, 1913, 339.
97. KRZEMIENIEWSKA, H., „Le cycle évolutif de *Spirochaeta cytophaga* H. et Cl." Acta Soc. Bot. Polon., *VII*, 1930, 507.
98. — „Contribution à l'étude du genre *Cytophaga* (WINOGRADSKY)". Arch. f. Mikrobiol., *4*, 1933, 394.
99. KRZEMIENIEWSKI, H. I S., „Miksobakterje Polski". („Die Myxobakterien von Polen".) Acta Soc. Bot. Pol., *IV*, 1926, 1.
100. — „Morfologja komórki miksobakteryi". („Zur Morphologie der Myxobakterienzelle".) Acta Soc. Bot. Pol., *V*, 1927, 46.
101. — „Miksobakterje Polski. Uzupenienie". („Die Myxobakterien von Polen. Anhang".) Acta Soc. Bot. Pol., *V*, 1927, 79.
102. — „Rozsiedlienie miksobakteryj". („Über die Verbreitung der

Myxobakterien im Boden".) Acta Soc. Bot. Pol., *V*, 1927 — 1928, 102.
103. — „Miksobakterje Polski". III („Die Myxobakterien von Polen. III".) Acta Soc. Bot. Pol., *VII*, 1930, 250.
104. — „Die Zellulosezersetzenden Myxobakterien". Bull. Intern. de l'Acad. Polon. des Sci. et des Lettres, Classe des Sci. Mathem. et Natur., Série B: Sci. Natur., 1937, No. 1—5, 11.
105. — „Über die Zersetzung der Zellulose durch Myxobakterien". Bull. Intern. de l'Acad. Polon. des Sci. et des Lettres, Classe des Sci. Mathem. et Natur., Série B: Sci. Natur., 1937, No. 1—5, 33.
106. Lange-Posdeiewa, I. P., („A new method for studying micro-organisms in their immediate soil surroundings".) (Russisch) Microbiology, *VI*, 1937, 217.
107. Lek, J. B. van der, „*Vibrio agarliquefaciëns* Gray". Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microb. en Serol., 1928, 276.
108. Lieske, R., „Morphologie und Biologie der Strahlenpilze". Leipzig, 1921.
109. Lipman, C. B., Waynick, D. D., „A detailed study of effects of climate on important properties of soils". Soil Sci., *I*, 1916, 5.
110. Löhnis, F., Lockhead, G., „Über Zellulose-Zersetzung". Zentralbl. f. Bakt., II, *37*, 1913, 490.
111. — „Experiments on the decomposition of cellulose by aerobic bacteria". Zentralbl. f. Bakt., II, *58*, 1923, 430.
112. Loicianskaja, M. S., Compt. Rend. Acad. Sci. URSS., *14*, 1937, 381. (Refer.: Zentralbl. f. Bakt., II, *104*, 1941, 269).
113. Lymn, A. H., Langwell, H., J. of the Soc. of Chem. Ind., *XLII*, 1923, 280 T.
114. McBeth, J. G., „Studies on the decomposition of cellulose in soils". Soil Sci., *I*, 1916, 437.
115. McBeth, J. G., Scales, F. M., „The destruction of cellulose by bacteria and filamentous Fungi". U. S. Dep. of Agric. Bureau of Plant Ind., Bull. 266, 1913.
116. McBeth, J. G., Scales, G. M., Smith, N. R., „Characteristics of cellulose-destroying bacteria". Science, *38*, 1913, 415.
117. Merker, E., „Parasitische Bakterien auf Blättern von *Elodea*". Zentralbl. f. Bakt., II, *31*, 1912, 578.
118. Meyer, R., „Beiträge zur Kenntnis der Zellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung". Arch. f. Mikrobiol., *5*, 1934, 185.
119. Milovidov, P. F., „Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den

Myxobakterien und einigen anderen Bakterien". Arch. f. Mikrobiol., *6*, 1935, 475.
120. MÜTTERLEIN, C., „Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und im Boden". Dissert., Leipzig, 1913.
121. NEUBERG, C., COHN, R., Über Zwischenprodukte des bakteriellen Abbaues von Zellulose". Bioch. Zeitschr., *139*, 1923, 527.
122. NORTHRUP, Z., „A new method of preparing cellulose for celluloseagar". Abstr. of Bacteriol., *III*, 1919, 7.
123. OMELIANSKI, W., „Über die Gärung der Cellulose". Zentralbl. f. Bakt., II, *8*, 1902, 193; 225; 257; 289; 321; 353, 385.
124. — „Über die Trennung der Wasserstoff- und Methan-Gärung der Cellulose". Zentralbl. f. Bakt., II, *11*, 1904, 369.
125. — „Die histologischen und chemischen Veränderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Mikroben der Pektin-, und Cellulosegärung". Zentralbl. f. Bakt., II, *12*, 1904, 33.
126. — „Zur Frage der Cellulosegärung". Zentralbl. f. Bakt., II *36*, 1913, 472.
127. ØRSKOV, J., „Investigation into the morphology of the Ray-Fungi". Copenhagen, 1923.
128. — „Untersuchungen über Strahlenpilze, reingezüchtet aus dänischen Erdproben". Zentralbl. f. Bakt., II, *98*, 1938, 344.
129. OTTO, H., „Untersuchungen über die Auflösung von Zellulosen und Zellwänden durch Pilze". Dissert., Berlin, 1916.
130. PETERSON, W. H., SNIESZKO, S., „Further studies on the thermophilic fermentation of cellulose and cellulosic materials". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 410.
131. PINOY, M. E., „Sur la nécessité d'une association bactérienne pour le développement d'une Myxobacterie — *Chondromyces crocatus*". Compt. Rend. Hbd. d. Séances de l'Acad. des Sci., *157*, 1913, 77.
132. POCHON, J., „Sur une bactérie cellulolytique isolée de la panse des ruminants". Compt. Rend. Hbd. de la Soc. de Biol., II, *113*, 1933, 1323.
133. — „Influence du milieu de culture sur les propriétés biologiques d'une bactérie cellulolytique de la panse du boeuf". Compt. Rend. Acad. Sci., *198*, 1934, 1808.
134. POPOFF, L., „Über die Sumpfgasgärung". Arch. f. d. ges. Physiol. etc., *10*, 1875, 113.
135. PRAZMOWSKI, A., „Zur Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten". Bot. Zeit., *37*, 1879, 408.
136. — „Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten". Dissert., Leipzig, 1880.

137. PRINGSHEIM, H., „Über die Verwendung von Zellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs". Zentralbl. f. Bakt., II, *23*, 1909, 300; *26*, 1910, 222.
138. — „Über den fermentativen Abbau der Zellulose". Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem., *28*, 1912, 266.
139. — „Über die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *38*, 1913, 513.
140. — „Die Beziehungen der Zellulosezersetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur". Mitt. d. deutschen Landw. Ges., 1913, 26; 43; 295.
141. — „Der biologische Abbau dei Zellulose". Angew. Bot., *II*, 1920, 217.
142. — „Die Polysaccharide". Berlin, 1923.
143. PRINGSHEIM, H., LICHTENSTEIN, S., „Zur vermeintlichen Reinkultur der Zellulosebakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *60*, 1924, 309.
144. PRINGSHEIM, H., MAGNUS-VON MERKATZ, A., „Fermentversuche an Zelluloseabbau-Produkten". Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. *105*, 1919, 173.
145. QUEHL, A., „Untersuchungen über die Myxobakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *16*, 1906, 9.
146. REINKE, J., BERTHOLD, G., „Die Zersetzung der Kartoffel durch Pilze". Unters. aus d. Botan. Labor. d. Univ. Göttingen, I, 1879, Berlin.
147. RIPPEL, A., „Der biologische Abbau der pflanzlichen Zellmembranen". Angew. Bot., *I*, 1919, 78.
148. — „Erwiderung an H. PRINGSHEIM". Angew. Bot., *II*, 1920, 222.
149. RIPPEL, A., FLEHMIG, T., „Untersuchungen über den aeroben Zellulosezersetzer *Itersonia ferruginea*". Arch. f. Mikrobiol., *4*, 1933, 229.
150. ROKITSKAYA, A. I., („Phases of the vital process of the cellulose destroying microbe *Spirochaeta cytophaga* and its spreading in soils of the Ukraine".) (Russisch), Pedology, *28*, 1933, 209.
151. RUBENTSCHIK, L., „Über Sulfatreduktion durch Bakterien bei Zellulosegärungsprodukten als Energiequelle". Zentralbl. f. Bakt., II, *73*, 1928, 483.
152. — „Zur anaeroben Zellulosezersetzung in Salzseen". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 182.
153. — „Zur aeroben Zellulose-Zersetzung auf den Rieselfeldern". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 186.
154. SACK, J., „Nitratbildende Bakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *62*, 1924, 15.

155. — „Zellulose angreifende Bakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *62*, 1924, 77.
156. SANBORN, J. R., „Physiological studies of accesory and stimulating factors in certain media". J. of Bact., *XII*, 1926, 1.
157. „Physiological studies of association". J. of Bact., *XII*, 1926, 341.
158. — „Essential food substances in soil". J. of Bact., *XIII*, 1927, 113.
159. — „The China-Blue-Aurin-Cellulose-medium for the physiological study of cellulose destroyers". J. of Bact., *XIV*, 1927, 395.
160. SANBORN, J. R., HAMILTON, W. B., „The influence of *Azotobacter chroococcum* upon the physiological activities of cellulose destroyers". J. of Bact., *XVIII*, 1929, 169.
161. SARLES, W. B., FRED, E. B., PETERSON, W. H., „Some factor that influence the formation of products in the thermophilic fermentation of cellulose". Zentralbl. f. Bakt., II, *85*, 1932, 401.
162. SCALES, F. M., „Some filamentous Fungi tested for cellulose destroying power". The Bot. Gaz., *60*, 1915, 149.
163. — „A new method of precipitating cellulose for cellulose agar". Zentralbl. f. Bakt., II, *44*, 1916, 661.
164. SCHEUNERT, A., „Beiträge zur Kenntnis der Zelluloseverdauung im Blinddarm und des Enzymgehaltes des Coecalsecretes". Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem., *48*, 1906, 9.
165. SCHWALBE, C. G., „Die Chemie der Zellulose". Berlin, 1911.
166. SENUS, A. H. C. VAN, „Bijdrage tot de kennis der cellulosegisting". Dissert., Leiden, 1890.
167. SIMAKOWA, T. L., („The influence of iron on the life-activity of nitrifying and cellulose destroying bacteria".) (Russisch), Microbiology, *VI*, 1937, 47.
168. SIMOLA, P. E., „Über den Abbau der Zellulose durch Mikroorganismen". I en II. Academ. Abh., Helsinki 1931.
169. SKINNER, C. E., „The decomposition of cellulose by type strains of certain bacteria". Zentralbl. f. Bakt., II, *78*, 1929, 508.
170. ŚNIESZKO, S., „Beiträge zur Kenntnis der zellulosezersetzenden Bakterien". Zentralbl. f. Bakt., II, *78*, 1929, 375.
171. — „The isolation of a thermophilic cellulose-fermenting organism". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 403.
172. ŚNIESZKO, S., KIMBALL, N., „Studies of the bacteria commonly found in association with the thermophilic cellulose-fermenting organisms". Zentralbl. f. Bakt., II, *88*, 1933, 393.
173. SÖDERBAUM, H. G., BARTHEL, Chr., „Inverkan på växtligheten av träavfall (sågspån) i jorden". Meddel. från Centralanst. för försöksv. på jordbruksomr., No. 271, 1924.

174. STAPP, C., BORTELS, H., „Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu". Zentralbl. f. Bakt., II, *90*, 1934. 28.
175. TAPPEINER, H., „Über Zelluloseverdauung". Ber. d. deutschen chem. Ges., *15*, 1882, 999.
176. — „Untersuchungen über die Gärung der Zellulose insbesondere über deren Lösung im Darmkanale". Zeitschr. f. Biol., *20* (*2* neue Folge), 1884, 52.
177. TETRAULT, P. A., „The fermentation of cellulose at high temperatures". Zentralbl. f. Bakt., II, *81*, 1930, 28.
178. THAYSEN, A. C., J. of the Soc. of Chem. Ind., *XLII*, 1923, 283 T.
179. THAYSEN, A. C., BUNKER, H. J., „The microbiology of cellulose, hemicelluloses, pectin and gums". Monogr. London, 1927.
180. THAXTER, R., „On the *Myxobacteriaceae*, a new order of Schizomycetes". The Bot. Gaz., *XVII*, 1892, 389.
181. — „Further observations on the *Myxobacteriaceae*". The Bot. Gaz., *XXIII*, 1897, 395.
182. — „Notes on the *Myxobacteriaceae*". The Bot. Gaz., *XXXVII*, 1904, 405.
183. TIEGHEM, PH. VAN, „Sur le *Bacillus amylobacter* et sons rôle dans la putrefaction des tissus végétaux". Bull. de la Soc. Bot. de France, *24*, 1877, 128.
184. — „Sur la fermentation de la cellulose". Compt Rend. Acad. Sci., *88*, 1879, 205.
185. TOMADA, J., „Fermentation of cellulose by thermophilic bacteria". J. of the Soc. of Chem. Ind. Japan, *35*, 1932, 534 B.
186. TOPPING, L. E., „The predominant micro-organisms in soil". I „Description and classification of the organisms". Zentralbl. f. Bakt., II, *97*, 1937, 289.
187. — „The predominant micro-organisms in soil". II „The relative abundance of the different types of organisms obtained by plating and the relation of plate to total counts". Zentralbl. f. Bakt., II, *98*, 1938, 193.
188. TROTMAN, R. R., SUTTON, W., „The influence of micro-organisms in the weathering of wool and cotton". J. of the Soc. of Chem. Ind., *XLIII*, 1924, 190 T.
189. VAHLE, C., „Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriazeen und Bakteriazeen, sowie die Rhodobakteriazeen und Spirillazeen". Zentralbl. f. Bakt., II, *25*. 1910, 178.
190. VILJOEN, J. A., FRED, E. B., PETERSON, W. H., „The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria". J. of Agr. Sci., *XVI*, 1926, 1.

191. WAKSMAN, S. A., „Soil Fungi and their activities". Soil Sci., *II*, 1916, 103.
192. — „Cultural studies of species of *Actinomyces*". Soil Sci., *VIII*, 1919, 71.
193. — „Studies in the metabolism of Actinomycetes". I en II. J. of Bact., *IV*, 1919, 189; 307; *V*, 1920, 1.
194. — „The growth of Fungi in the soil". Soil Sci., *XIV*, 1922, 153.
195. — „A method for counting the number of Fungi in the soil". J. of Bact., *VII*, 1922, 339.
196. — „Principles of soil microbiology". 1927.
197. — „Zellulose als eine Quelle des „Humus" im Erdboden". Zellulosechemie (Wissensch. Beibl. zu der Zeitschr. „Der Papier-Fabrikant"), *8*, 1927, 97.
198. — „Decomposition of various chemical constituents, etc. of complex plant materials by pure cultures of Fungi and bacteria". Arch. f. Mikrobiol., *II*, 1931, 136.
199. WAKSMAN, S. A., CAREY, C., „The use of the silica-gel plate for demonstrating the occurence and abundance of cellulose-decomposing bacteria". J. of Bact., *XII*, 1926, 87.
200. WAKSMAN, S. A., CURTIS, R. E., „The Actinomyces of the soil". Soil Sci., *I*, 1916, 99.
201. — „The occurence of Actinomycetes in the soil". Soil Sci., *VI*, 1918, 309.
202. WAKSMAN, S. A., DUBOS, R., „Sur la nature des organismes qui decomposent la cellulose dans les terres arables". Compt. Rend. Acad. Sci., *185*, 1927, 1226.
203. WAKSMAN, S. A., HEUKELEKIAN, O., „Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility". VIII. „Decomposition of cellulose". Soil Sci., *XVII*, 1924, 275.
204. WAKSMAN, S. A., JOFFE, J. S., „Studies in the metabolism of Actinomycetes". III. J. of Bact., *V*, 1920, 31.
205. WAKSMAN, S. A., SKINNER, C. E., „Microorganisms concerned in the decomposition of celluloses in the soil". J. of Bact., *XII*, 1926, 57.
206. WAKSMAN, S. A., STARKEY, R. L., „Influence of organic matter upon the development of Fungi, Actinomycetes and bacteria in soil". Soil Sci., *XVII*, 1924, 373.
207. WALKER, E., WARREN, F., Biochem. Journ., *32*, 1938, 31 (Refer.: Zentralbl. f. Bakt., II, *104*, 1941, 269).
208. WEHMER, C., „Untersuchungen über Kartoffelkrankheiten". III „Die Bakterienfäule der Knollen (Nassfäule)". Zentralbl. f. Bakt., II, *4*, 1898, 540; 570; 627; 694; 734; 764; 795.

209. WERNER, E., „Der Erreger der Zelluloseverdauung bei der Rosenkäferlarve (*Potosia cuprea* Fbr.) *Bacillus cellulosam fermentans* n. sp." Zentralbl. f. Bakt., II, *67*, 1926, 297.
210. WESTERHOUT, A. M., REITSMA, C. W., Ingenieurs-verslagen L. H., Wageningen, 1935 (niet gepubliceerd).
211. WINOGRADSKY, S., „Sur la décomposition de la cellulose dans le sol." Compt. Rend. Hbd. d. Séances de l'Acad. des Sci., *183*, II, 1926, 691.
212. — „Recherches sur la dégradation de la cellulose dans le sol." Compt. Rend. Hbd. d. Séances de l'Acad. des Sci., *184*, 1927, 493.
213. — „Sur l'oxidation de la cellulose dans le sol." Compt. Rend. Hbd. d. Séances de l'Acad. des Sci., *187*, 1928, 326.
214. — „Études sur la microbiologie du sol." (Quatrième mémoire). „Sur la dégradation de la cellulose dans le sol." Ann. de l'Inst. Pasteur, *43*, 1929, 549.
215. — „Sur la décomposition aérobie de la cellulose par les bactéries. Travaux récents". Bull. de l'Inst. Pasteur, *XXX*, 1932, 369.
216. — „Études sur la microbiologie du sol". (Cinquième mémoire). „Analyse microbiologique du sol. Principe d'une nouvelle méthode." Ann. de l'Inst. Pasteur, *48*, 1932, 89.
217. — „The direct method in soil microbiology and its application to the study of nitrogen fixation". Soil Sci., *XXV*, 1928, 221.
218. WOODMAN, H. E., „The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism". I. J. of Afgr. Sci., *XVII*, 1927, 333.
219. WOODMAN, H. E., STEWART, J., „The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism". II „The transformation of cellulose into glucose by the agency of cellulose-splitting bacteria". J. of Agr. Sci., *XVIII*, 1928, 713.
220. ZUNTZ, N., „Gesichtspunkte zum kritischen Studium der neueren Arbeiten auf dem Gebiete der Ernährung". Landw. Jahrb., *8*, 1879, 65.

Na het ter perse gaan van dit werk kreeg ik ter inzage de volgende publicaties:

221. FÅHRAEUS, G., „Wirkung von Glucose auf die Zellulose-Zersetzung einiger Cytophaga-Arten". Zentralbl. f. Bact., II, *104*, 1941, 264.
222. — „Studies in aerobic cellulose decomposition". I. „The course of cellulose decomposition by *Cytophaga*". The Annals of the Agricultural College of Sweden, *12*, 1944.

223. STANIER, R. Y., „Studies on the Cytophagas". J. of Bact. *40, 1940,* 619.
224. — „Studies on marine agar-digesting bacteria". J. of Bact. *42,* 1941, 527.
225. — „The *Cytophaga* group: A contribition to the biology of Myxobacteria". Bacteriolog. Rev., *6,* No. 3, 1942, 143.

In de bovenstaande publicaties werd gerefereerd naar nog verscheidene andere werken over het hier behandelde onderwerp. Tot nu toe kon ik die echter niet raadplegen.

AFBEELDINGEN.

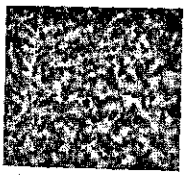

Fig. 1*a*.

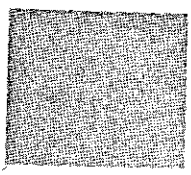

Fig. 1*b*.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

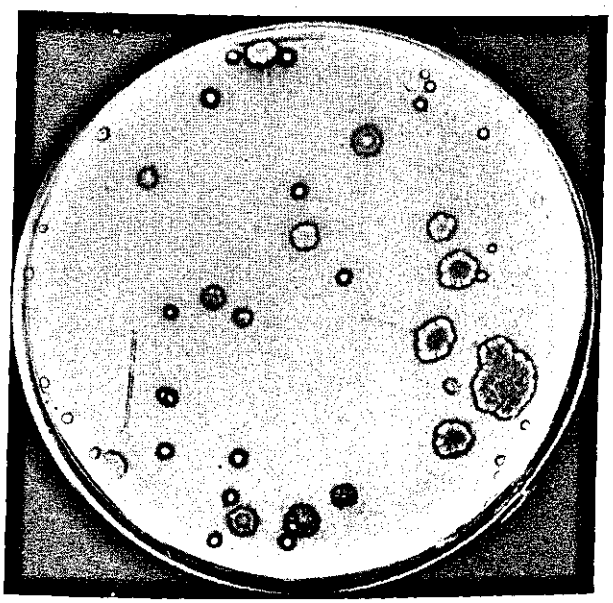

Fig. 5.

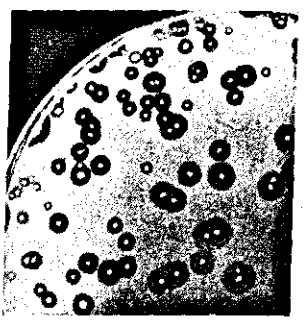

Fig. 6.

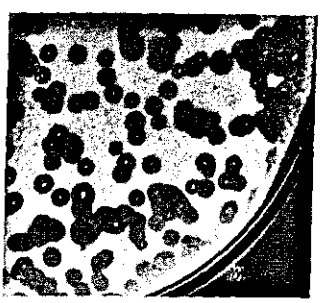

Fig. 7.

Fig. 1*a* en 1*b*. *a*. Uitgevlokte en *b*. Niet uitgevlokte cellulose in celluloseagar, 4 × vergroot.
Fig. 2. Langcellige *Cellvibrio*, stam $IV_1\alpha$, filtreerpapier in voedingsvloeistof, 7 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 3. Langcellige *Cellvibrio*, stam IV_1, celluloseagar met pepton, 6 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 4. Langcellige *Cellvibrio*, stam IV_{12}, celluloseagar, 10 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 5. Celluloseagarplaat met koloniën en oplossingsvelden van een langcellige specifieke *Cellvibrio*, stam $IV_1\alpha$, iets verkleind. (De koloniën op het agar-oppervlak of tusschen agar en glas groeien breed uit, de kleine koloniën zijn *in* de agar gegroeid).
Fig. 6. Celluloseagarplaat met koloniën en oplossingsvelden van een kortcellige omnivore *Cellvibrio*, stam IV_4, iets verkleind.
Fig. 7. Celluloseagarplaat (met compostdecoct) met koloniën en oplossingsvelden van een langcellige omnivore *Cellvibrio*, stam IV_{13}, iets verkleind. (De koloniën zijn bij dezen stam bijna even groot als de oplossingsvelden).

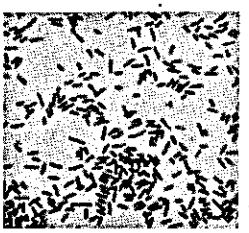

Fig. 8.

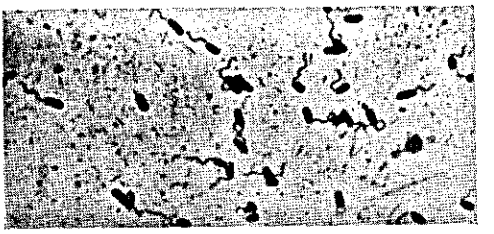

Fig. 9.

Fig. 9*a*.

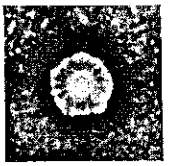

Fig. 10.

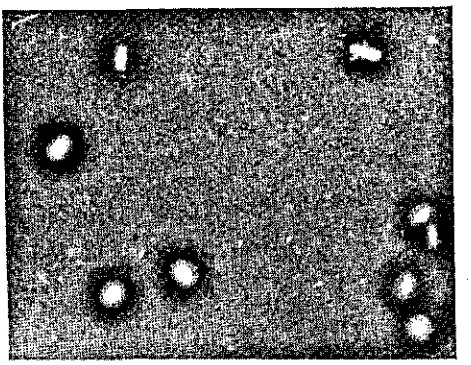

Fig. 11.

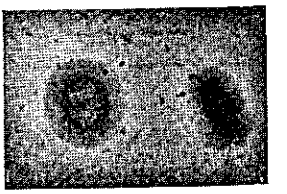

Fig. 12.

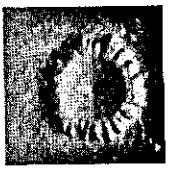

Fig. 13.

Fig. 15.

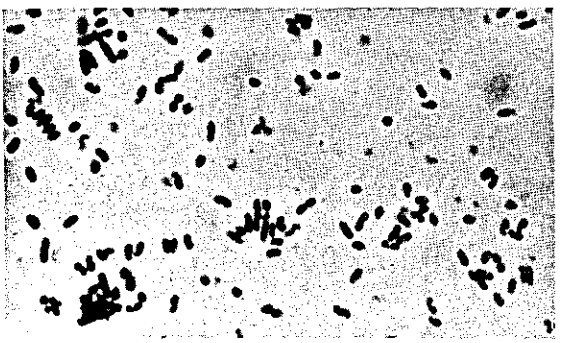

Fig. 14.

Fig. 16.

Fig. 8. Kleincellige *Cellvibrio*, stam N. O. P.$_{II}$, celluloseagar met compost-decoct, 4 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 9. Matig-langcellige *Cellvibrio*, (stam N. O. P.$_{I}$), 4 dagen oud, celluloseagar; cilienkleuring volgens LEVENSON, 1000 ×.
Fig. 9*a*. Als Fig. 9, doch 1500 ×.
Fig. 10. Kolonie van een langcellige *Cellvibrio* (stam IV_1) op celluloseagar, 8 ×.
Fig. 11. Koloniën met oplossingsvelden van een kleincellige *Cellvibrio* (stam NOP_{II}) in celluloseagar, 6 × (opgenomen tegen een donkeren achtergrond, met opvallend licht).
Fig. 12. Als fig. 11, doch 18 × vergroot en opgenomen met doorvallend licht.
Fig. 13. Gewelfde kolonie van een *Cellvibrio*, stam IV_1, op het oppervlak van celluloseagar met ingezonken rand, 3 ×, scheve belichting van links.
Fig. 14. Kortcellige omnivore *Cellvibrio*, stam IV_8, filtreerpapier in voedingsvloeistof, 7 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 15. Kortcellige *Cellvibrio*, stam T. m. $_3$, op celluloseagar met compostdecoct, 14 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 16. Jonge cultuur van een sporenvormer van het Clostridium-type, stam I_9, op celluloseagar, carbol-gentianaviolet, 1000 ×.

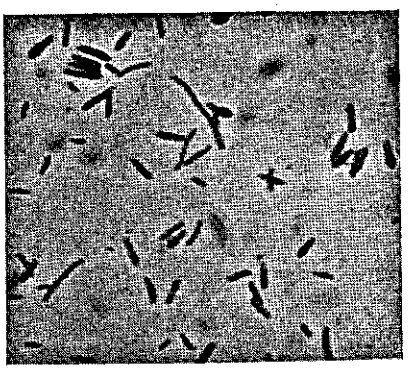

Fig. 17.

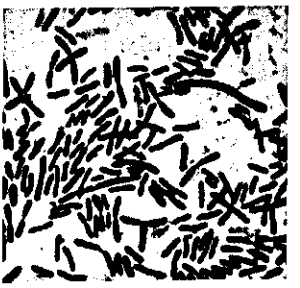

Fig. 18.

Fig. 19.

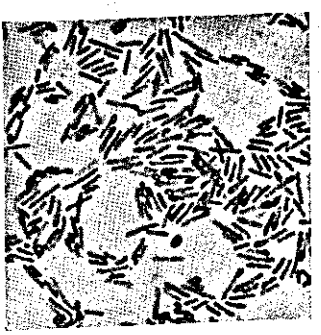

Fig. 20.

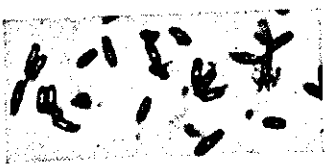

Fig. 21.

Fig. 22.

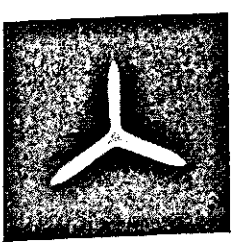

Fig. 23.

Fig. 17. Sporenvormer van het Clostridium-type, sporuleerend, stam IV_{14}, op celluloseagar met compost-decoct, 5 dagen oud, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 18. Sporenvormer van het Clostridium-type, stam IV_n, lange cellen in zeer jonge cultuur (12 uur), op glucoseagar, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 19. Zeer jonge cultuur van een sporenvormer van het Clostridium-type, stam IV_{ct}, met zeer lange draden, vaak tot spiralen en lussen opgerold, op celluloseagar, gentiana violet, 1000 ×.
Fig. 20. Sporenvormer van het lange type (trommelstok), stam IV_4, sporuleerend, op celluloseagar met compostdecoct, 6 dagen oud, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 21. Sporenvormer van het lange sporen-type, stam IV_7, sporuleerend, celluloseagar met compost-decoct, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 22. Kolonie van een sporenvormer van het Clostridium-type, stam IV_{ct}, in glucose-albumine-agar, 6 ×.
Fig. 23. Als fig. 22, in celluloseagar, 8 ×.

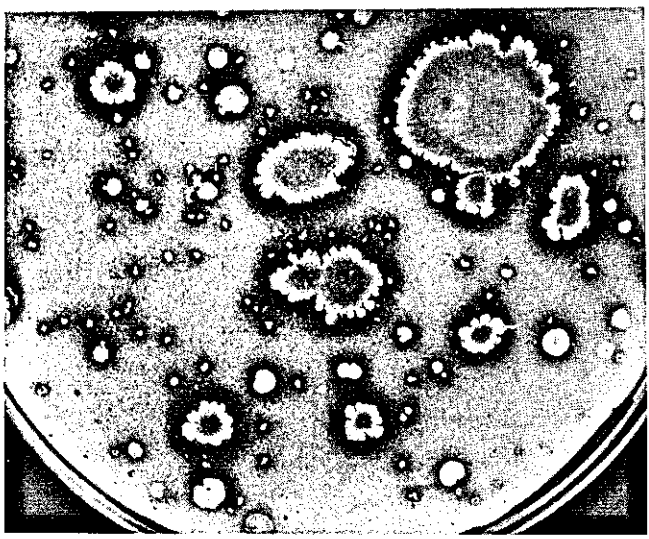

Fig. 24.

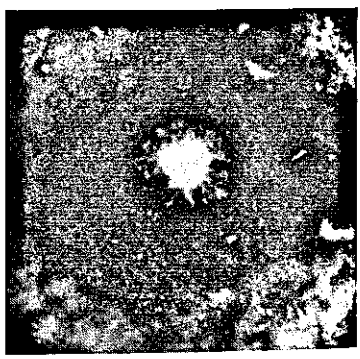

Fig. 25.

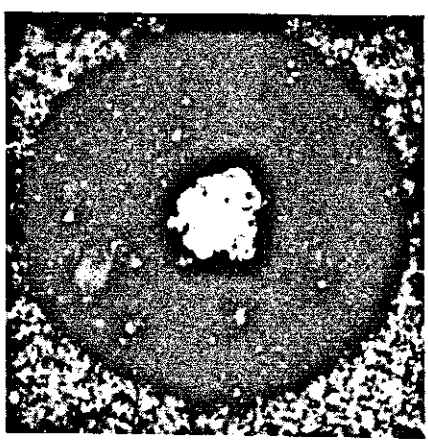

Fig. 26.

Fig. 27.

Fig. 24. Celluloseagarplaat met koloniën en oplossingsvelden van een sporenvormer van het Clostridium-type, stam IV_n, nat. gr..
Fig. 25. Kolonie-vorm van een sporenvormer van het lange type, stam IV_4, in celluloseagar, 20 ×.
Fig. 26. Als fig. 25, stam IV_3, 10 ×.
Fig. 27. Oplossingsvelden rondom onzichtbare, breed uitgeloopen koloniën van een sporenvormer van het lange sporentype, stam IV_5, op celluloseagar, iets verkleind.

Fig. 28.

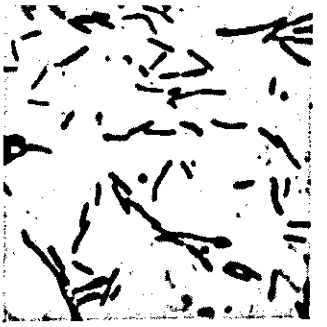

Fig. 29.

Fig. 30.

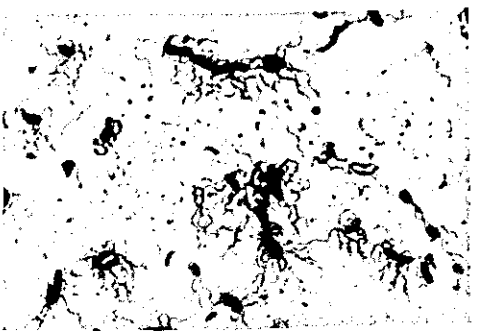

Fig. 31.

Fig. 32.

Fig. 33.

Fig. 34.

Fig. 28. Oplossingsveld op celluloseagar rondom een kruipend groeienden sporenvormer van het lange type, stam IV_4, iets verkleind.
Fig. 29. Verschillende afmetingen van cellen bij een sporenvormer van het clostidium type, stam IV_{cl}, op glucoseagar, 2 dagen oud, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 30. Verschillende afmetingen van cellen bij een sporenvormer van het vibrio-achtige type, stam $Ket._7$, op celluloseagar met compostdecoct, 3 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 31. Sporenvormer van het lange type, stam IV_3, celluloseagar met compostdecoct, 20 uur oud, ciliënkleuring volgens LEVENSON, 1000 ×.
Fig. 32. Sporuleerende bacil van het lange type, stam $I_{12.r.}$, op celluloseagar, 14 dagen oud, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 33. Spirillen-vormige staafjes van den sporenvormer, stam $Rpt._{VII}$, op celluloseagar met compostdecoct, 2 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 34. Sporenvormer van het vibrio-type, stam $Ket._7$, op celluloseagar, 3 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.

Fig. 35.

Fig. 36.

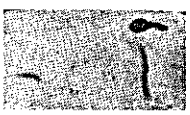

Fig. 37.

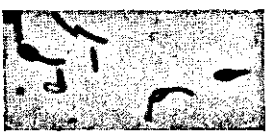

Fig. 38.

Fig. 40.

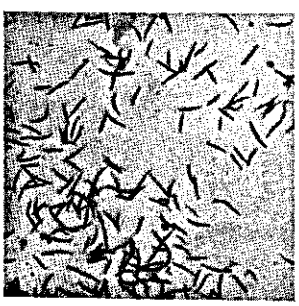

Fig. 39.

Fig. 43.

Fig. 42.

Fig. 41.

Fig. 35. Als fig. 34, stam Ket.$_2$, op celluloseagar met compostdecoct, 16 uur oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 36. Sporuleerende cultuur van een vibrio-achtigen sporenvormer, stam Rpt.$_7$, met trommelstokfiguren, op celluloseagar met compostdecoct, 6 dagen oud, gentiana violet, 1500 ×.
Fig. 37. Als fig. 36.
Fig. 38. Als fig. 36.
Fig. 39. Jonge cultuur — nog zonder cysten — van de cystenvormende *Cytophaga*, stam Cyt. m. 3, op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 3 dagen oud, carbol-fuchsine, 1000 ×.
Fig. 40. Een lange draadvormige cel van een cystenvormende *Cytophaga*, stam Cyt. gr., op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 7 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 41. Cystenvormende *Cytophaga*, stam Cyt.gr., tijdens de encystering, vrijwel alle overgangen van normale cellen tot rijpe cysten zijn aanwezig; op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 4 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 42. Eerste stadium van encystering — chromatinecontractie in het midden der cel, stam Cyt.gr., gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 43. Als fig. 43, verder gevorderd stadium, de cel is al eenigszins spoelvormig.

Fig. 44.

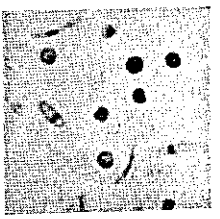

Fig. 46.

Fig. 47.

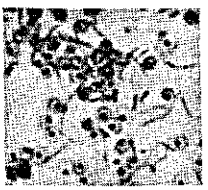

Fig. 48.

Fig. 45.

Fig. 50.

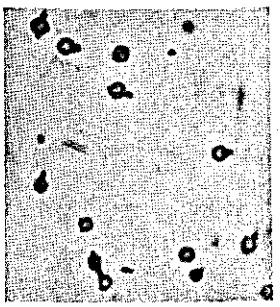

Fig. 49.

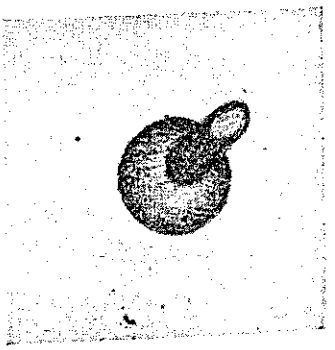

Fig. 51.

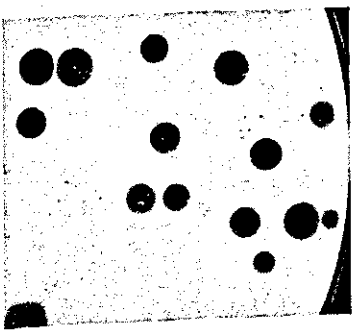

Fig. 52.

Fig. 44. Rijpe en enkele bijna rijpe cysten van stam Cyt.kl. met nog enkele normale cellen en spoeltjes, op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 4 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 45. Ontkiemende cyste van de *Cytophaga*, stam Cyt. gr., op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 6 uur oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 46. Verschillende stadia van ontkieming der cysten van de *Cytophaga*, stam Cyt.kl., op filtreerpapier in voedingsvloeistof, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 47. Als fig. 46, doch stam Cyt.m. 3.
Fig. 48. Nog onrijpe cysten van de *Cytophaga*, stam Cyt.gr.. De kleurstof wordt nog maar zwak geadsorbeerd, behalve door het chromatinelichaampje; op filtreerpapier in voedingsvloeistof, 2 dagen oud, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 49. Rijpende cysten van de *Cytophaga*, stam Cyt.gr., met de „stompjes" en chromatinestrengen; op filtreerpapier in voedingsvloeistof, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 50. Een rijpe cyste van de *Cytophaga*, stam Cyt. gr.. Het „stompje" is nog steeds zichtbaar. Cultuur als bij fig. 49.
Fig. 51. Als fig. 50, doch schematisch weergegeven (teekening) 9750 ×.,
Fig. 52. Onzichtbare koloniën (oplossingsvelden) van een *Cytophaga*, stam Cyt. m. 3, op cellulose-agar, Nat. gr..

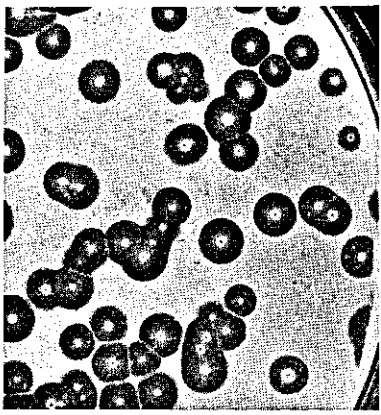

Fig. 53.

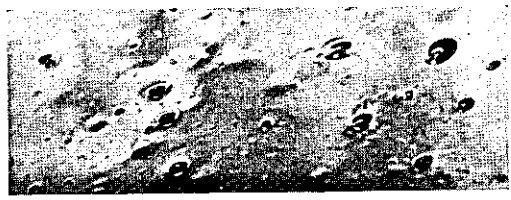

Fig. 55.

Fig. 54.

Fig. 56.

Fig. 57.

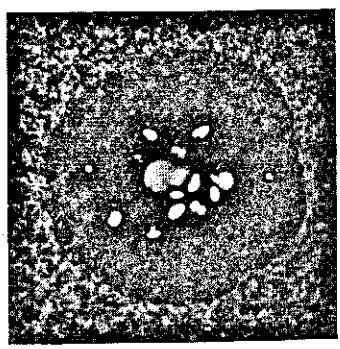

Fig. 58.

Fig. 59.

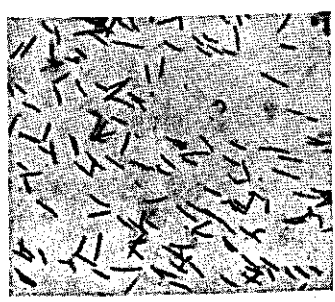

Fig. 60.

Fig. 53. Zichtbare koloniën en oplossingsvelden van de *Cytophaga*, stam Cyt.kl., op celluloseagar met 0,1 % glucose en compostdecoct, nat. gr..
Fig. 54. Als fig. 53, 2 × vergroot.
Fig. 55. Koloniën zonder oplossingsvelden van de *Cytophaga*, stam Cyt. kl., op celluloseagar met 0,25 % glucose en compostdecoct, bij scheef invallende belichting, 2 × vergroot.
Fig. 56. De *Cytophaga*, stam Cyt.kl., gekweekt op celluloseagar met 0,1 % glucose en compostdecoct. De cellen zien er nog vrijwel normaal uit, maar vormen geen cysten, 10 dagen oud, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 57. Als fig. 56 maar gekweekt op celluloseagar met 0,25 % glucose en compostdecoct. De cellen zijn volkomen gedeformeerd. Gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 58. Secundair zich vormende zichtbare koloniën in een oplossingsveld van de *Cytophaga*, stam Cyt.gr., op celluloseagar, 4 ×.
Fig. 59. Cystenlooze *Cytophaga*, stam Cyt. m. l., op filtreerpapier in voedingsvloeistof, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 60. Als fig. 59, doch stam Cyt.n., 1000 ×.

Fig. 61.

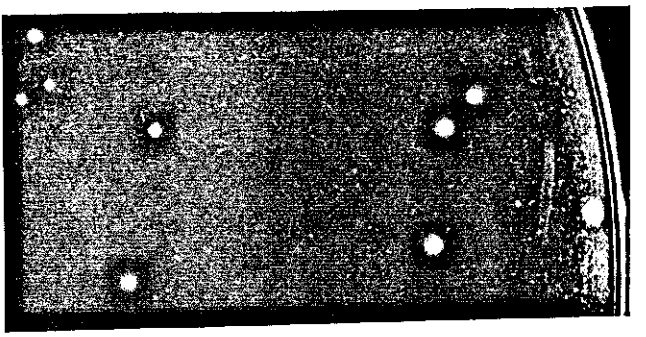

Fig. 62.

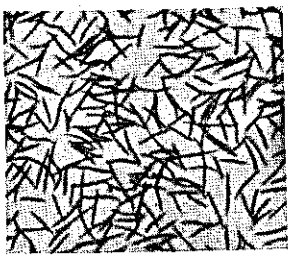

Fig. 64.

Fig. 63.

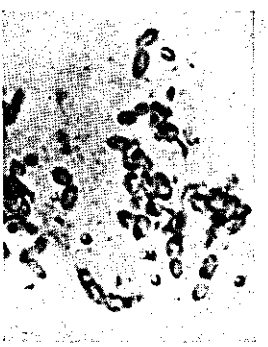

Fig. 66.

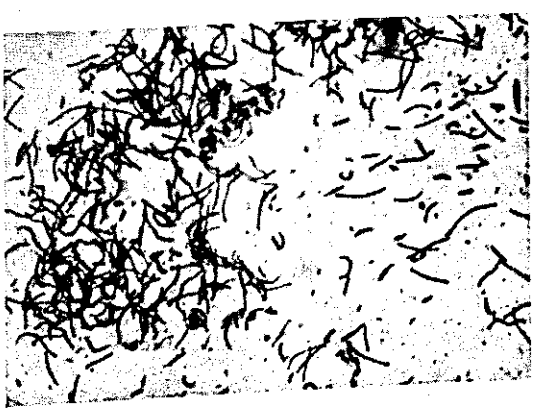

Fig. 65.

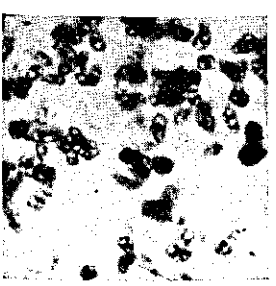

Fig. 67.

Fig. 61. Spirochaeten-achtige cellen van de *Cytophaga*, stam Cyt. m. 1., op filtreerpapier in voedingsvloeistof, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 62. Koloniën van de cellulose niet splitsende *Cytophaga*, stam Cytov.II, op minerale agar met 0.01 % glucose, 4 ×.
Fig. 63. Cellulose niet splitsende *Cytophaga*, stam Cyt. t. m. 4., op minerale agar met 0,25 % glucose, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 64. Cellulose niet splitsende *Cytophaga*, stam Cyt.Myx.n., op minerale agar met 0,25 % glucose, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 65. De polyangide, Sor.IV, op minerale agar met 0.25 % zetmeel, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 66. Beginstadium van encysteering buiten de vruchtlichamen van de polyangide, Sor.IV, op glucoseagar, gentianaviolet, 1500 ×. (Gekleurd en gefotografeerd in de agar in natuurlijke ligging).
Fig. 67. Als fig. 66, verder voortgeschreden stadium, 1000 ×.

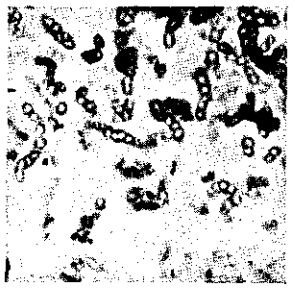

Fig. 68.

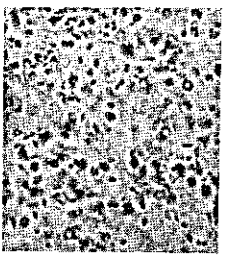

Fig. 69.

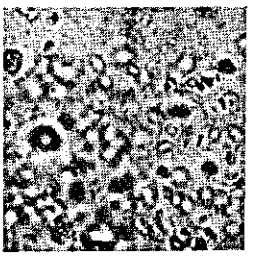

Fig. 70.

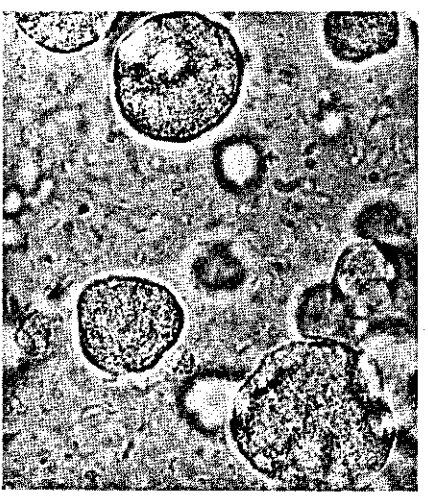

Fig. 71.

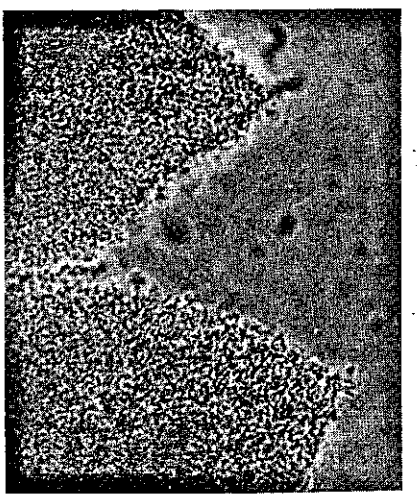

Fig. 75.

Fig. 72.

Fig. 73.

Fig. 74.

Fig. 68. Als fig. 66 en 67, rijpe „cysten", 1000 ×.
Fig. 69. Plek in een kolonie van een polyangide zonder vorming van macro-cysten. Ongekleurd gefotografeerd in celluloseagar, 460 ×.
Fig. 70. Andere plek in dezelfde kolonie, waar jonge macro-cysten ontstaan, overigens als fig. 69.
Fig. 71. Als fig. 70, verder uitgegroeide macro-cysten, 620 ×.
Fig. 72. Uit verscheidene macrocysten opgebouwd vruchtlichaam van de polyangide Sor.II in celluloseagar, ongekleurd gefotografeerd in de agar, 150 ×.
Fig. 73. Als fig. 72, maar stam Sor.IV, zeer groot vruchtlichaam, 30 ×.
Fig. 74. Verschillende typen van vruchtlichamen van de polyangide Sor.IV, ongekleurd in de agar gefotografeerd, 30 ×.
Fig. 75. Rand van een platgedrukten sorus van de polyangide Sor.IV, ongekleurd, 600 ×.

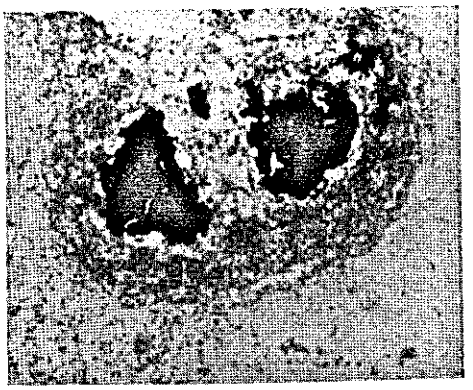

Fig. 76.

Fig. 77.

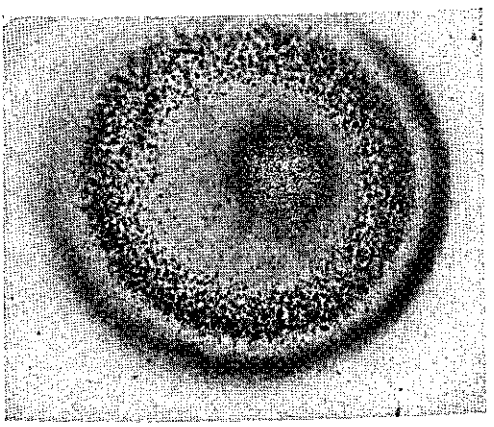

Fig. 78.

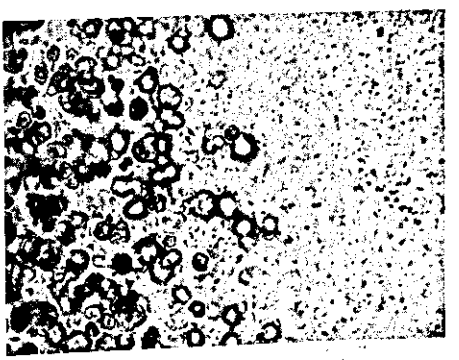

Fig. 79.

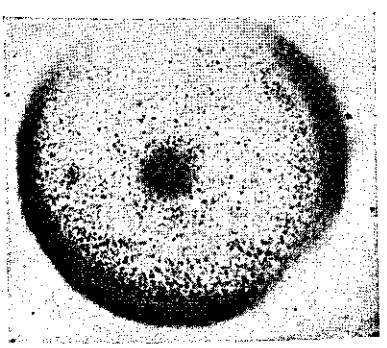

Fig. 80.

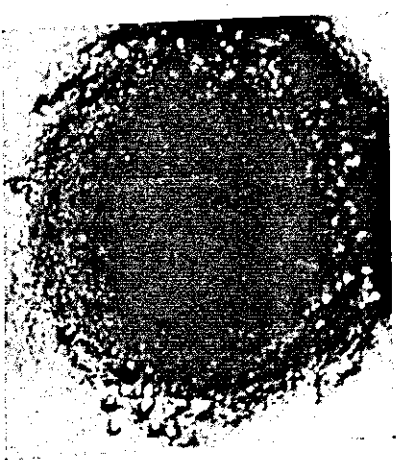

Fig. 81.

Fig. 76. Platgedrukte sorus van de polyangide Sor.IV omgeven door een zwerm van sporen, gentiana violet, 200 ×.
Fig. 77. Sporen en begeleidende cellen uit een sorus van de polyangide Sor.IV, methyleenblauw, 1500 ×.
Fig. 78. Kolonie van de polyangide Sor.I in celluloseagar met een ring van zeer talrijke kleine sori, ongekleurd, 22 ×.
Fig. 79. Detail uit fig. 78, aan den rand van den ring van sori, ongekleurd 180 ×.
Fig. 80. Als fig. 78, de kleine sori verspreid over de geheele kolonie.
Fig. 81. Groot centraal vruchtlichaam uit het centrum van een kolonie van de polyangide Sor.III op celluloseagar, ongekleurd, 150 ×.

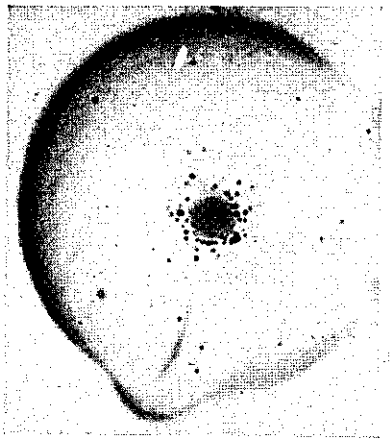

Fig. 82.

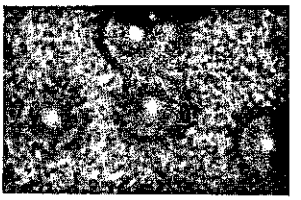

Fig. 83.

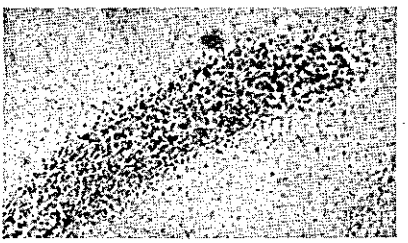

Fig. 84.

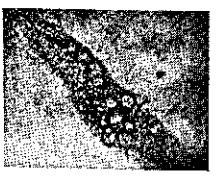

Fig. 85.

Fig. 87.

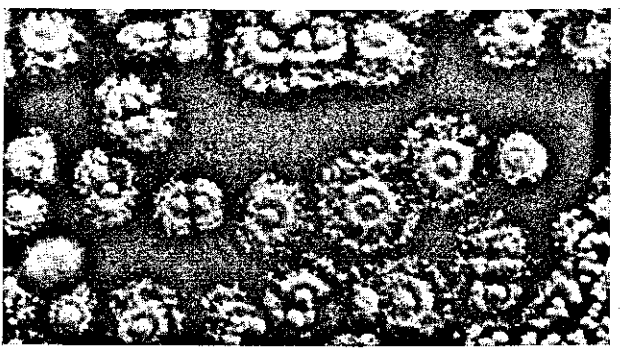

Fig. 86.

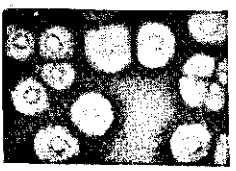

Fig. 88.

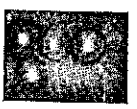

Fig. 89.

Fig. 90.

Fig. 82. Kolonie van de polyangide Sor.IV op celluloseagar met slechts weinig sori in het midden der kolonie, ongekleurd, 25 ×.
Fig. 83. Koloniën met oplossingsvelden van de polyangide Sor.IV op celluloseagar met compostdecoct, 5 ×.
Fig. 84. Een geheel verteerde cellulosevezel in agar die nu veranderd is in een massa van cellen van de polyangide, ongekleurd, 150 ×.
Fig. 85. Als fig. 84, in een later stadium, waarbij in de massa van de cellen sori gevormd zijn, ongekleurd, 85 ×.
Fig. 86. Koloniën van een actinomyceet, stam V_{31}, uit de soort-groep I, op celluloseagar met compostdecoct, 3 ×.
Fig. 87. Als fig. 86, stam V_{42}, uit de soortgroep II, 3 ×.
Fig. 88. Als fig. 86, stam V_{34}, uit de soortgroep V, 3 ×.
Fig. 89. Als fig. 86, stam $V_{K.A}$, uit de soortgroep VI, 3 ×.
Fig. 90. Als fig. 86, stam V_{2a}, uit den sub-genus *b* der actinomyceten met sporenvorming in het substraat, 3 ×.

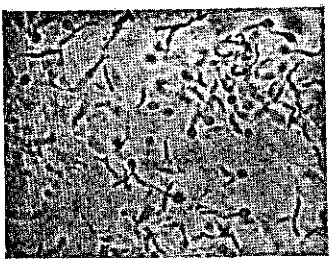

Fig. 91.

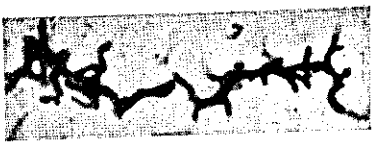

Fig. 93.

Fig. 94.

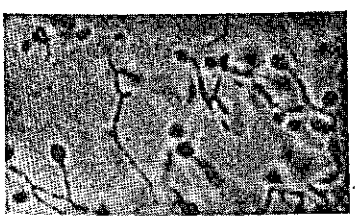

Fig. 92.

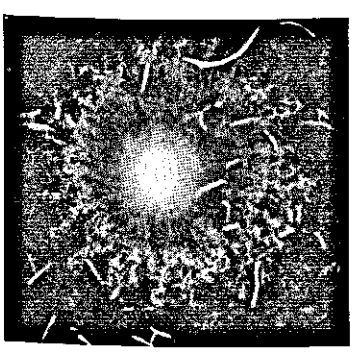

Fig. 95.

Fig. 96.

Fig. 91. Hyphen en eindstandige sporen van een *Micromonospora*, stam T. M. 5, op glucoseagar, niet gekleurd, in de agar gefotografeerd, 620 ×.
Fig. 92. Als fig. 90, 1000 ×.
Fig. 93. Jong mycelium van een *Micromonospora* uit het sub-genus *a* met sporenvorming in het substraat, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 94. Het rijker ontwikkelde mycelium van een *Micromonospora* uit het sub-genus *b* met sporenvorming aan het oppervlak, methyleenblauw, gekleurd en gefotografeerd in de agar, 1500 ×.
Fig. 95. Kolonie van een proactinomyceet, stam T. M. 4, op celluloseagar, ongekleurd, 12 ×. (De dikke witte streepjes zijn nog niet opgeloste grovere cellulosevezels).
Fig. 96. In stukken uiteenvallende hyphentakken in een jonge kolonie van den proactinomyceet, stam T.m.3, op celluloseagar met compostdecoct, gentianaviolet, in de agar gekleurd en gefotografeerd, 1000 ×.

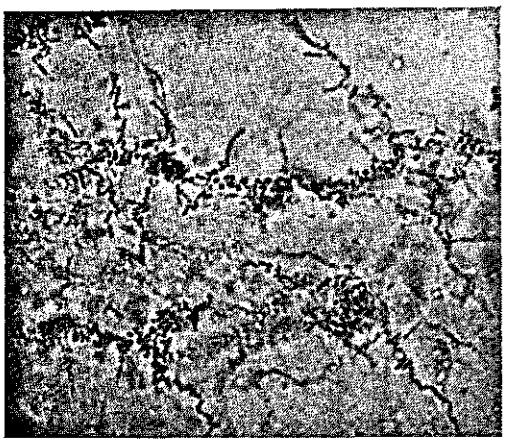

Fig. 97.

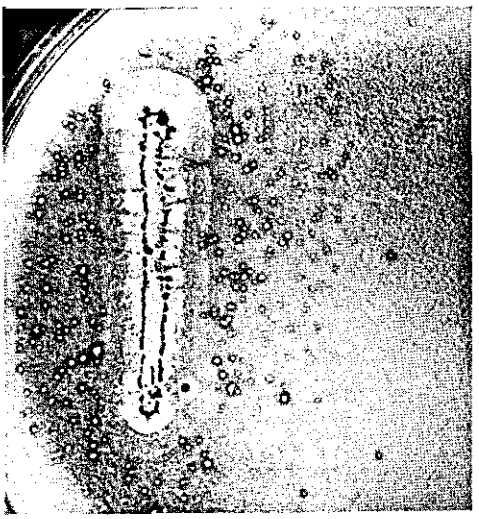

Fig. 101.

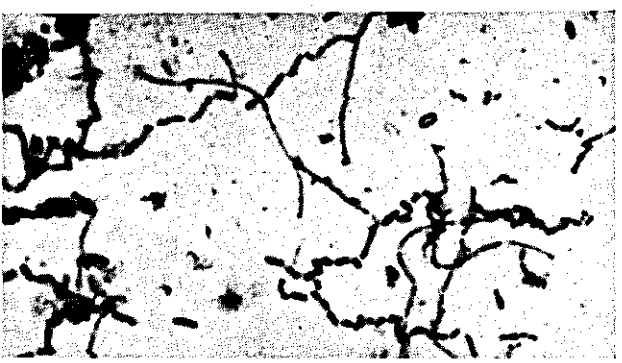

Fig. 98.

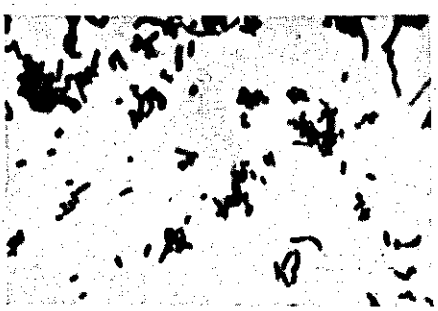

Fig. 99.

Fig. 100.

Fig. 97. Als fig. 96, doch een oudere kolonie van stam T. m. 4, methyleenblauw, 1000 ×.
Fig. 98. Als fig. 97, detail van enkele duidelijk uiteenvallende takken, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 99. Uitstrijk-preparaat van een 4 dagen oude cultuur van den proactinomyceet, stam T. M. 4, op celluloseagar, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 100. Het jonge en reeds wederom uiteenvallende mycelium van een mycobacteriënstam, op celluloseagar met compostdecoct, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 101. Zwerm van satelliet-koloniën van den actinomyceet, stam V_{35}, rondom een entstreep van den groei-bevorderenden actinomyceet, stam V_{43}, op celluloseagar, nat. gr..

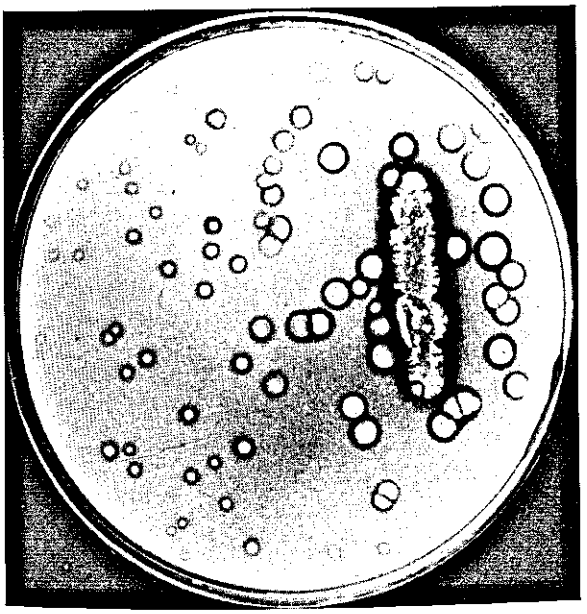

Fig. 102.

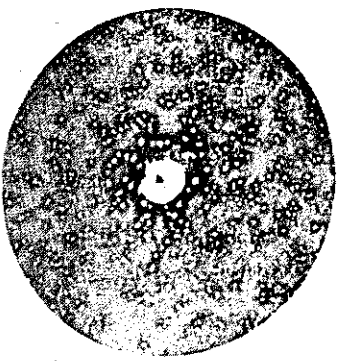

Fig. 105.

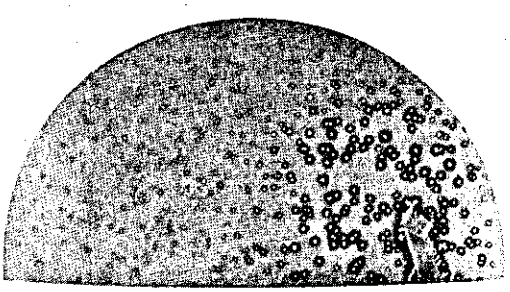

Fig. 103.

Fig. 104

Fig. 102. Groeibevordering van een polyangide, stam Sor.II, rondom een entstreep van den bevorderenden actinomyceet, stam V_{42}, op celluloseagar, $^2/_3$ nat. gr..
Fig. 103. Zwerm van satelliet-koloniën van den proactinomyceet stam T. m. 3 rondom een entstreep van een bevorderenden actinomyceet, stam V_{37}, op celluloseagar, $^2/_3$ nat. gr..
Fig. 104. Bevordering van de mycobacterie, stam T. m. 6, rondom een entstreep van een niet gedetermineerden bacil, op celluloseagar met compost-decoct, ca 3 ×.
Fig. 105. Spontane bevordering van een *Cellvibrio*-stam (IV_9) door een kolonie van een bacil van het type van *Bac. megatherium* (II_6) uit grondsuspensie, op celluloseagar, nat. gr..

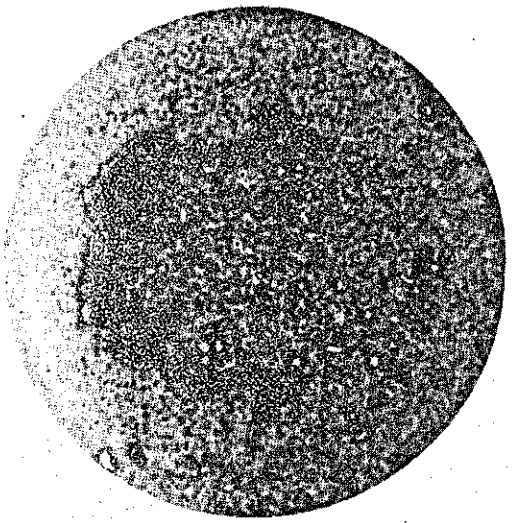

Fig. 106.

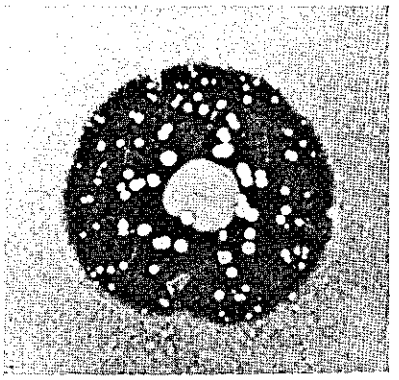

Fig. 108.

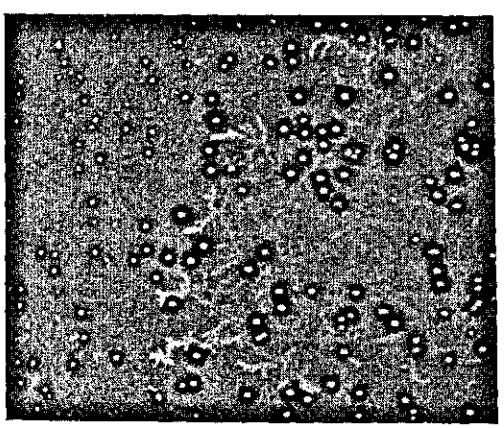

Fig. 107.

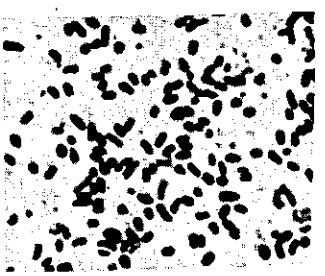

Fig. 109.

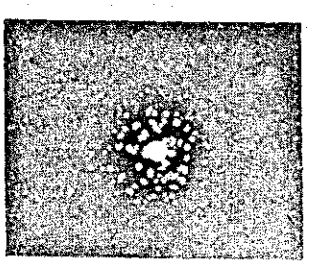

Fig. 110*b*.

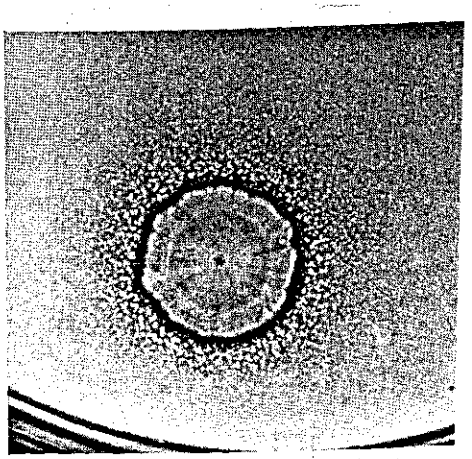

Fig. 110*a*.

Fig. 106. Spontane bevordering van de mycobacterie T. m. 6 door een toevallige infectie door een bacil, die zich kruipend tusschen agar en glas uitbreidt, op celluloseagar, ca $^2/_3$ nat. gr..
Fig. 107. Als fig. 106, doch bevordering door een andere toevallige infectie met een bacil, die vertakt over het agar-oppervlak kruipt.
Fig. 108. Een zwerm satelliet-koloniën van een de cellulose niet splitsenden actinomyceet, stam $V_{13}b$, rondom een kolonie van een cellulose splitsenden bacil op celluloseagar, 4 ×.
Fig. 109. De op symbiose aangewezen *Cellvibrio* $I_{\alpha 5}$, op celluloseagar, carbolgentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 110. Een zwerm van koloniën van den *Cellvibrio* $I_{\alpha 5}$ rondom een kolonie van een bevorderaar *a*) den actinomyceet IIe_3; *b*) een bacil; op celluloseagar; 2 × resp. 3 ×.

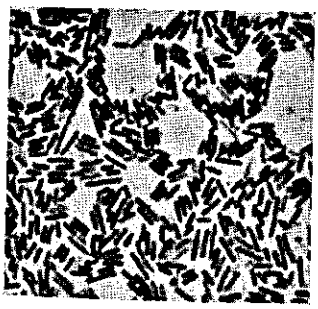

Fig. 111.

Fig. 112.

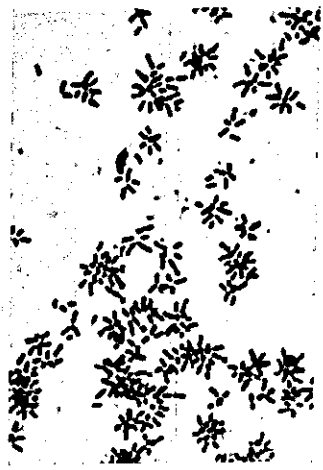

Fig. 113.

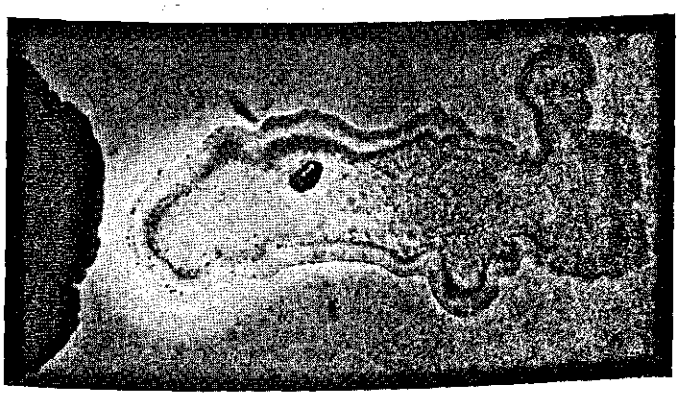

Fig. 114.

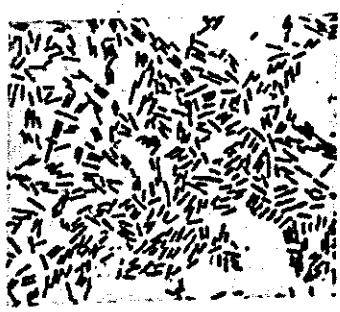

Fig. 115.

Fig. 111. Jonge cultuur van den sporenvormer I_{b_1}, op celluloseagar, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 112. Sporuleerende oudere cultuur van den sporenvormer I_{b_1}, op celluloseagar, gentianaviolet, 1000 ×.
Fig. 113. B. herbicola, II_{a_1}, op glucoseagar, gentianaviolet, 1000 ×. Duidelijk is de stervormige ligging der cellen te zien.
Fig. 114. Een entstreepje van den bevorderden sporenvormer I_{b_1} (rechts) naast een kolonie van B.herbicola (II_a) (links), op celluloseagar, 4 ×, gefotografeerd bij doorvallend licht, tegen een witten achtergrond. De celluloseoplossing alleen aan den kant van B. herbicola zichtbaar.
Fig. 115. Sporenvormer II_{b_3}, jonge sporenlooze cultuur op celluloseagar, gentianaviolet, 1500 ×.

Fig. 116

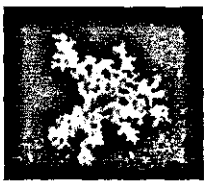

Fig. 117.

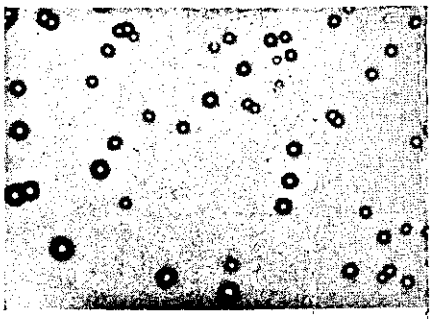

Fig. 118.

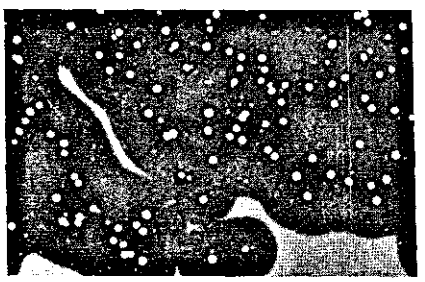

Fig. 119.

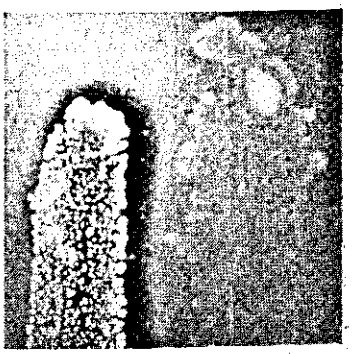

Fig. 120.

Fig. 116. Als fig. 115, oudere sporenvormende cultuur op celluloseagar met compostdecoct, gentianaviolet, 1500 ×.
Fig. 117. Als fig. 115, kolonie in celluloseagar met compostdecoct, 6 ×.
Fig. 118. Kleine koloniën met kleine oplossingsvelden van den actinomyceet I_{f13} op celluloseagar zonder groeibevordering, nat. gr..
Fig. 119. Als fig. 118, doch mét groeibevordering door voorbereiding van den voedingsbodem door II_{e7}, nat. gr.. Grootere koloniën en veel grootere oplossingsvelden.
Fig. 120. Evenwijdige entstrepen van I_{f13} en II_{e7} op celluloseagar. De groei van en de cellulosesplitsing door I_{f13} versterkt aan den kant van II_{e7}; 2 ×.