OVER HET WEZEN VAN DEN BACTERIOPHAAG.

REDE, UITGESPROKEN OP DEN 9EN MAART 1929, TER GELEGENHEID VAN DEN ELFDEN VERJAARDAG DER LANDBOUWHOOGESCHOOL DOOR DEN RECTOR-MAGNIFICUS

DR. IR. N. L. SÖHNGEN.

Mijne heeren curatoren, professoren, lectoren, dames en heeren assistenten en studenten, en verder Gij allen, die U hebt opgemaakt om den elfden diës natalis der Landbouwhoogeschool mede te vieren, zeer welkome toehoorderessen en toehoorders.

Het is slechts twaalf jaar geleden sinds van de hand van D'HÉRELLE een serie publicaties verscheen over de bacteriophagie, welke in 1921 met mededeelingen van verscheidene onderzoekers zijn samengevat in zijn werk: Le bacteriophage, son rôle dans l'immunité. In 1926 volgde reeds: Le bacteriophage et son comportement, waar tevens de ontwikkeling gedurende de laatste vijf jaren in beschreven wordt. Het is meer dan twee keer zoo groot als het werk van 1921. De boeiende beschrijving der onderzoekingen en de scherpzinnige interpretatie van de feiten hebben de algemeene belangstelling voor het vraagstuk gewekt. D'HÉRELLE is het hierdoor gelukt de reeds in 1915 door TWORT nauwkeurig beschreven ontdekking van de verschijnselen der bacteriophagie, die toen niet de aandacht mocht trekken, in eere te herstellen en daarvoor geheel nieuwe perspectieven te openen.

Het is met deze ontdekking gegaan als met zoovele andere in de laatste decenniën; een keer behoorlijk geformuleerd, trekt zij de algemeene belangstelling en wordt in korten tijd in de vele uitstekend geoutilleerde laboratoria bestudeerd, zoodat de oplossing der theoretische problemen in enkele jaren belangrijk gevorderd is en aanleiding geeft ook tot nuttige toepassingen.

De practische toepassingen van de bacteriophagie zijn in het verband van het eigenlijke onderwerp van deze rede van weinig belang,

maar ik meen daarvan de voornaamste nu even te mogen vermelden, waarna dan de organisme-hypothese behandeld wordt.

Het nuttige van de bacteriophagie blijkt uit het succes van de immunisatie tegen vogeltyphus, Kleinsche ziekte bij kippen, barbone (een buffelziekte in Cochinchina) en dysenterie, tevens uit de therapie van streptococcen infecties, builenpest, colibacillose, typheuse koortsen en darmstoornissen. Voor de bestrijding van tal van ziekten is de bacteriophaag doeltreffend gebleken.

De theorie van het wezen van den bacteriophaag, zooals zij door D'HÉRELLE wordt voorgestaan, heeft van het begin af tegenstand ondervonden. D'HÉRELLE heeft zich steeds den phaag als een être vivant gedacht en deze opvatting met kracht verdedigd tegen verschillende door onderzoekers geponeerde meeningen.

Zoo vat b.v. SEIFFERT het oplossen van bacteriën door den phaag op als een zuiver bacterieel proces, een soort autolyse door de tryptische enzymen van de bacterie zelf. De eiwitten zouden worden aangetast na een overmatige activeering der normale processen in het bacterielichaam. Worden nu activeerende stoffen aan een bacteriecultuur toegevoegd, dan kan de lysis eveneens aanvangen.

DÖRR daarentegen meent, dat het agens, waarvan de natuur buiten beschouwing gelaten wordt, de stofwisseling van de bacterie beinvloedt, zoodat deze tenslotte geheel wordt opgelost.

Weer geheel anders is de bacteriesplitter hypothese van BAIL. Deze Splitter, bacteriedeeltjes, die onverglaasde porceleinen buizen z.g. chamberlandkaarsen passeeren, zijn een bijzondere vorm van de bacterie en zijn zeer infectieus, zoodat een contact tusschen deze en de bacterie tot algemeene Zersplitterung leidt. Deze hypothese komt al zeer dicht bij de enzym-hypothese, waarmee de meeste verschijnselen van de bacteriophagie, al is het hier en daar ook wat gewrongen, plausibel zijn te maken.

Alvorens over te gaan tot een beschouwing van de hypothese, volgens welke de phaag als een organisme wordt opgevat, is het allereerst noodig de bacteriophagie te bespreken, teneinde een denkbeeld van den bacteriophaag te geven. Eveneens dienen we ons rekenschap te geven van het begrip „levende wezens".

Het verschijnsel der bacteriophagie is het oplossen van bacteriën door een overentbaar agens. De bacteriën in een cultuur, voorzien van het juiste agens, verdwijnen; de eerst troebele vloeistof wordt volkomen helder, waarbij het agens vermeerdert. Enkele druppels van deze cultuurvloeistof (lysaat) lossen weer een massa bacteriën in een volgende cultuur op enz. Bij deze lysis heeft de vermeerdering van het agens, de bacteriophaag, ten koste van de levende bacteriën plaats, want het was niet mogelijk gebleken een toename van den phaag te verkrijgen in cultuurmedia, waarin deze ontbraken. De bacterio-

phaag is dus te vergelijken met een obligate parasiet. Quantitatief is deze vermeerdering te bepalen door een bekende verdunning van het lysaat te brengen op een vasten voedingsbodem, welke met de betreffende bacterie bestreken is. Op deze agaragar bodem met bacteriënlaag ontstaan heldere, cirkelronde plekjes zgn. plages, waar de bacteriën zijn opgelost en die geheel vergelijkbaar zijn met de koloniën van bacteriën en evenals deze kunnen worden opgevat als te zijn ontstaan uit één organisme. Het aantal plages is omgekeerd evenredig met de verdunning van het lysaat. Zóó blijkt met één druppel lysaat een nieuw lysaat te ontstaan, dat per cm^3 eenige milliarden phagen bevat. Dat met dezen „groei" het leven van den bacteriophaag niet is bewezen, is duidelijk. Dezelfde feiten kunnen ook zoo beschouwd worden met de opvatting van SEIFFERT, DÖRR, BAIL enz. Juist het obligaat parasitaire karakter van den phaag laat het nemen van deze conclusie niet toe. Filtreeren we een lysaat door een chamberland filter, dat bacteriën tegenhoudt, dan passeert de phaag en wordt dus zoo gescheiden van nog mogelijk in de cultuurvloeistof aanwezige bacteriën.

In niet gefiltreerde culturen verdwijnt de helderheid somtijds na eenige uren weer door groei van bacteriën, die blijkbaar immuun zijn tegen de aantasting van den bacteriophaag. Aanvankelijk is hun aantal zeer gering, maar na eenigen tijd is dit zoozeer toegenomen, dat de vloeistof weer troebel wordt. Deze zgn. secondaire culturen hebben hunne resistentie te danken òf aan eene toevallige groote virulentie òf aan een contact met den phaag. In het laatste geval zijn volgens D'HÉRELLE waarschijnlijk in de bacterie phagen gediffundeerd, die door de bacterie overwonnen, hare virulentie hebben verhoogd. Met deze grootere virulentie correspondeert vermindering van agglutinatie met antiserum, vermeerdering van kleurstofvorming b.v. bij B. violateus, verhoogde lichtproductie bij lichtbacteriën, verhoogde gistkracht bij coli's.De grootere resistentie en de correspondeerende eigenschappen verdwijnen echter weer door voortgezet overenten van de bacterie zonder contact met den phaag. Door filtratie door een chamberlandkaars is de phaag in de secondaire culturen te scheiden van de bacteriën.

Onder den microscoop ziet men bij de lysis van Bac. Danicus den bacterie-omtrek minder scherp worden door oplossen van den wand. Dikwijls is dit aanvankelijk plaatselijk, totdat de bacterie als 't ware geen wand meer bezit; dan verdwijnt plotseling het organisme door verdeeling in de vloeistof. Het heeft er allen schijn van, dat de bacterie van buitenaf wordt aangetast.

Het aanvankelijk typische opzwellen en daarna uit elkaar spatten van de bacteriën, zooals D'HÉRELLE dit voor B. dysenteriae heeft beschreven, is bij de lysis van Bac. Danicus niet waargenomen.

Bij het bestudeeren van de ontwikkeling van den phaag met de

bacterie in verschillende milieus en de afsterving door schadelijke invloeden, is de verandering van het aantal phagen in de vloeistof de eenige maatstaf van de processen. Deze verandering is door tellen van het aantal plages vast te stellen. De vele mededeelingen over de resistentie van den phaag zeggen weinig, wanneer het verloop van de vermindering van het aantal niet is bepaald en niet zoo mogelijk door een kromme is weergegeven. Een lysaat b.v. blijft werkzaam gedurende jaren; eveneens is dit het geval in een 50 %-ige glycerine oplossing. Tegen phenolen, alcoholen, koper- en kwikzouten enz. is de phaag resistenter dan bacteriën en de resistentie nadert misschien die van bacteriesporen, maar wanneer de snelheid van vernietiging niet wordt bepaald, zijn vergelijkingen moeilijk te treffen en valt er van de resistentie weinig te zeggen.

Evenzoo is dit het geval met de inactiveering van den phaag in antiphaagserum. Dit antiphaagserum wordt verkregen uit het bloed van konijnen, die met een lysaat zijn ingespoten. Nu wordt volgens PRAUSNITZ de bacteriophaag in zulk een serum langzaam geinactiveerd, maar niet vernietigd. Deze inactiveering verdwijnt weer door den phaag langdurig in contact te laten met de bacterie. Blijkbaar worden in het antiserum stoffen gevormd, die door den bacteriophaag geadsorbeerd kunnen worden en eene aantasting van de bacterie tijdelijk belemmeren. Uit de langzame en *schijnbaar* ongelijke inactiveering van den phaag in het serum, zooals volgens D'HÉRELLE uit de cijfers van PRAUSNITZ zou volgen, mag men zeker niet de conclusie trekken, dat de phagen individueele verschillen bezitten en daarom tot de levende wezens behooren. De resultaten immers van tal van onderzoekingen over afsterving van bacteriën, sporen, gisten en enzymen door antiseptica en door temperatuursinvloeden geven zeer verschillende krommen. Uit de onvolledige cijfers van PRAUSNITZ zijn in 't geheel geen curven te construeeren, zoodat zij zeker geen aanleiding geven tot het trekken van conclusies omtrent den aard van den phaag.

De afstervingskrommen van A. GRIJNS, welke met die van monomoleculaire reactie krommen in zooverre overeenkomen, dat de reactieconstante bij de proeven in de neutrale media vertraagt en die bij proeven in zure media en in ultra-violetlicht versnelt, geven geen directe aanleiding den phaag als een levend wezen te beschouwen, maar uit het vloeiend verloop van de lijnen mag men wel concludeeren tot de groote overeenkomst in resistentie der phagen van Bac. Danicus tegen deze invloeden en daarom mogen we ze beschouwen als uniforme deeltjes, een gevolgtrekking, die voor de beoordeeling van het wezen van den phaag, voor de organisme-hypothese, belangrijk is, waarop nader wordt teruggekomen. Voor deze hypothese pleiten tevens de aanpassing van den phaag aan schadelijke invloeden b.v. aan

stijgende concentraties van antiseptica, aan het antiphaagserum, eveneens de regeneratie na verwarming, zooals uit tal van waarnemingen van D'HÉRELLE, FLU, SCHUURMAN, GRIJNS, PRAUSNITZ en anderen volgt.

Hoe subtiel het proces der bacteriophagie is, blijkt nog eens duidelijk uit den invloed van de voeding op de lysis. Cultiveeren we Bac. Danicus, B. coli of B. prodigiosum in eiwitvrije media b.v. met amm. sulfaat, glucose en zouten, en hier is dus geen sprake van een schadelijken invloed, dan worden na eenige overentingen de in deze cultuurvloeistoffen uitstekend groeiende bacteriën door den phaag niet meer opgelost. Blijkbaar hebben de bacteriën eene samenstelling gekregen, die geen lysis meer mogelijk maakt, want toevoeging van bouillon of gistwater heeft daarop binnen den gewonen tijd van de lysis geen merkbaren invloed. De aanwezigheid van eiwitten in het milieu brengt de lysis niet meer tot stand.

In verband met het onderwerp van dezen middag wil ik over de specificiteit van den phaag nog het volgende mededeelen. Deze is beperkt tot één of tot hoogstens enkele bacteriesoorten, hetgeen het parasitair karakter typisch kenmerkt, ja, zij kan zich zelfs tot enkele bacteriestammen bepalen, zooals voor eenige coli en typhusstammen door WOLFF is vastgesteld. Daarentegen worden b.v. van B. Shiga Kruse en B. pestis alle stammen opgelost al is dan wel verschil in virulentie waargenomen. Eene multipele virulentie vertoont weer de bacteriophaag van de dysenteriebacterie van HISS, die naast eenige colistammen ook de dysenteriebacterie Shiga Kruse en paratyphus B. oplost.

Van eenige grond- en zee-bacteriophagen is de specificiteit zeker niet geringer dan die der pathogene bacteriën. Zoo worden verschillende stammen van B. Danicus door den phaag van één der stammen opgelost, maar deze vertoont geen lysis van B. radicicola, B. prodigiosum, B. violateus of de lichtbacterie B. phosphorescens en hetzelfde kan van de phagen en deze bacteriën over en weer gezegd worden. Van een universeelen, alle bacteriën aantastenden phaag is dus geen sprake meer.

Men zou van meening kunnen zijn, dat elke bacterie wel een phaag zal hebben. Dit is ook wel mogelijk, maar het is van verscheiden soorten niet gelukt deze aan te toonen, zooals b.v. van Azotobacter chroöcoccum, Bac. polymyxa, van de autotrophe bacteriën. Of we de cultuurcondities, waaronder de phaag zich manifesteert, niet kennen of dat deze inderdaad niet bestaat, zullen nadere experimenten beslissen.

Mogen we nu den phaag beschouwen als een zeer kleine bacterie of protozo; zijn kenmerken van een organisme in 't algemeen vastgesteld, zooals b.v. stofwisseling, gekenmerkt door assimilatie en dissimilatie, erfelijke eigenschappen, gestalte?

We stuiten hier op zeer groote moeilijkheden. Assimilatie en dissimilatie toch zijn niet te vervolgen zooals bij de ontwikkeling van saprophieten. Bij de lysis van bacteriën immers ontstaan tal van producten waarvan we niet weten of ze van den phaag afkomstig zijn als afscheidingsproduct dan wel van de bacterie door verdere eigen ontleding na aantasting van den phaag. Eene scheiding is niet mogelijk. Door GRIJNS is in elk geval eene sterke vermeerdering van de hoeveelheid aminozuurstikstof en eiwitstikstof in het lysaat vastgesteld, wijzende op een ingrijpend proces bij de vermeerdering van den phaag van Bac. Danicus. Maar het eigenlijke door den phaag zelf veroorzaakte dissimilatieproces is nog volkomen duister.

Van de assimilatie valt echter dit te zeggen, dat daarbij de bacteriophaag en zeer waarschijnlijk een specifiek eiwit worden gevormd, dat niet in de bacterie aanwezig is. De proeven van PRAUSNITZ met het antiphaagserum hebben dit waarschijnlijk gemaakt. Over de erfelijkheid van de eigenschappen geven de lysis-verschijnselen de eenige waarnemingen. Deze weinig positieve gegevens steunen de organisme-hypothese maar in geringe mate. Andere argumenten zijn daarvoor echter wel aan te voeren.

Beschouwen we nu eerst eens de uiterst kleine afmetingen van den phaag, die o.a. zulk een scherpe kritiek tegen D'HÉRELLE's onzichtbaar être vivant veroorzaakten zonder dat deze toch gegrond is.

We kunnen ons een beeld van het onzichtbare agens op de volgende wijze vormen.

In een lysaat van een aanvankelijk zwak troebele cultuur van Bac. Danicus tellen we normaal een 20000 millioen bacteriophagen per cubieke centimeter. Toch zijn zulke vloeistoffen volkomen helder en het wonderlijke verschijnsel wordt verklaarbaar, wanneer we de hoeveelheid materiaal van dit enorme aantal bepalen. Hiervoor is de middellijn van één phaag noodig, in de veronderstelling, dat de phaag een bol is. Deze is met behulp van een reeks collodiumfilters met stijgende poriengrootte door PRAUSNITZ bepaald op 20 millioenste millimeter of op 20$\mu\mu$, door ANGERER op 30$\mu\mu$ en door LEVADITE en NICOLAU is de overeenkomst der afmetingen van ultravirus als hondsdolheid, pokstof, encephalitus en van den bacteriophaag vastgesteld; voor den diameter is eveneens ongeveer 20$\mu\mu$ gevonden. Al deze bepalingen zijn op dezelfde wijze verricht met behulp van collodiumfilters. Het volume van 20.000 millioen bacteriophagen is dan ongeveer 1/2000 mm^3. Zulk een geringe hoeveelheid eiwit maakt een vloeistof zeker niet troebel. Veel belangrijker hoeveelheden eiwitten en stikstofverbindingen in 't algemeen zijn in het lysaat afkomstig van de opgeloste bacterielichamen, zooals GRIJNS aantoonde en daar dient men bij de onderzoekingen met den phaag wel op te letten. Nu is op de nauwkeurigheid van afmetingen, verkregen met de membraan-

filtratie, nog wel wat af te dingen. Bij de filtratie zal door het persen door de poriën de vorm van den phaag tijdelijk kunnen veranderen en de deeltjes zullen kleiner gemeten worden dan ze werkelijk zijn. Tengevolge van adsorptie worden ze misschien weer grooter gemeten dan ze zijn.

Denken we in dit verband slechts aan de uiterst dunne lange spirochaeten, die de chamberlandkaarsen ook kunnen passeeren.

Proeven over diffusie van bacteriophagen door agar-agar bewijzen in elk geval de buitengewoon geringe dimensies. Zoo diffundeert zonder druk b.v. de phaag van Bac. Danicus en ook die van eenige gewone bodembacteriën door 1½ procentige agar-agar met een snelheid van ± 1 mm per 12 uur en door 3 procentige agar-agar is de snelheid ± 1 mm in 32 uur. Deze waarnemingen wijken geheel af van die van PRAUSNITZ en FIRLI en van FLU, die geen diffusie van den phaag van B. Shiga Kruse door agar-agar vonden. Zoodra over nauwkeuriger cijfers beschikt wordt, kan uit de diffusie-constante de afmeting van den bacteriophaag bepaald worden.

Uit verdere diffusieproeven is in elk geval gebleken, dat de phaag belangrijk grooter is dan het trypsine- en het takadiastase-molecuul. Maar microscopisch noch ultramicroscopisch is de phaag waarneembaar, daarvoor zijn de afmetingen en de lichtreflectie te gering. Onzichtbaar, manifesteert hij zich aan ons slechts door de lysis. Ook kleuringen, verzilveringen, enz. geven geen betrouwbare gegevens over de grootte en den vorm, vooral niet, omdat in het milieu naast den phaag tal van bacterieproducten voorkomen, die tot vergissingen aanleiding kunnen geven. Men moet bij deze experimenten uiterst voorzichtig zijn met het trekken van conclusies, aangezien er totaal geen contrôle mogelijk is met het ongekleurde object.

Nu zijn de geringe afmetingen van deze deeltjes voor velen een bezwaar geweest tot het aanvaarden van de organisme-hypothese. Er zouden dan immers levende wezens zijn van de grootte van ongeveer één serumglobuline-molecuul, met een diameter van een tiende deel van die van de kleinste bacterie of een duizendste van den inhoud òf om een volkomen concreet beeld te gebruiken, levende wezens, die een grootte hebben van een stukje van een cilie, een zweepdraad, van een bacterie.

D'HÉRELLE heeft, om aan dit bezwaar tegemoet te komen, zich laten verleiden tot het opstellen van een micellair-hypothese. Tot de z.g. micellaire wezens rekent D'HÉRELLE die, welke ultrafilters passeeren, zooals de verwekkers van mozaïkziekten bij planten, dierenpest, vaccine, hondsdolheid, de bacteriophaag enz. Ze bezitten het elementaire leven, zegt D'HÉRELLE, zijn slechts uit weinig moleculen opgebouwd en geen organismen. Ze vormen één groep, de z.g. Protobes. De bacteriophaag heet dan Protobios bacteriophagus. Veel

helderder wordt het begrip van het wezen van den bacteriophaag hierdoor niet. Of we van een mycel of van een phaag spreken, komt op hetzelfde neer, vooral wanneer we noch de samenstelling, noch de grootte noch het aantal moleculen kennen, waaruit deze bestaat.

En bedenken we slechts hoe verschillend de samenstelling van het protoplasma van organismen moet zijn. Thermophiele bacteriën b.v. groeien uitstekend bij een temparatuur van 60° C., terwijl psychrophiele bij 37° en lager reeds door te hooge temparatuur te gronde gaan en daarentegen kunnen sporen van sommige bacteriën ongehinderd uren koken doorstaan. De samenstelling van het protoplasma van den bacteriophaag kan een zeer bijzondere zijn.

Is de bacteriophaag een organisme en is de levende materie aan het organisme gebonden?

Bij eene beschouwing hierover kan de gestaltegroei, als primair levenskenmerk, in de eerste plaats besproken worden.

We hebben een typisch inzicht in het gestalteprobleem vooral aan DRIESCH te danken door de wijze, waarop het Ganzheitsprincipe op den voorgrond is geplaatst. Hiermede neemt DRIESCH stelling tegen algemeen bekende physisch-chemische en mechanistische theorieën.

Dit Ganzheitsprincipe beduidt de vastgestelde groei van het organisme van kiem tot uitgegroeide gestalte b.v. de groei van de kiem in een eikel tot een eik met zijn bepaalde bladeren, takken, kroonvorm enz., de kiem van een fasant in het ei tot een fasant met alle typische kenmerken als afmetingen, kleur, teekening enz. De kiem groeit tot de eindgestalte, heeft deze en de geheele ontwikkeling daartoe in zich. Men kan het zich ook zoo voorstellen, dat de kiem tot de als 't ware reeds denkbeeldig aanwezige totale gestalte ontwikkelt. Deze ontwikkeling van kiem tot geheel wordt geleid en wel volgens DRIESCH door de entelechie, een buiten het organisme aanwezige onmeetbare grootheid, die naar het doel, de Ganzheit, streeft, deze in zich heeft. De entelechie is in staat op een geschikt oogenblik processen in het organisme te stoppen en weder te laten aanvangen zonder dat daarvoor arbeid noodig is; zij treedt dus regelend op en werkt teleologisch. De beschrijving is de suspensionstheorie.

Door DRIESCH is tevens zeer belangrijk experimenteel werk geleverd, waarmee de Ganzheit-idee en ook de door DRIESCH geinterpreteerde entelechie-hypothese gesteund worden o.a. door proeven met zee-egeleieren in het beginstadium van de ontwikkeling. Aangetoond wordt dan hoe vóór de differentiatie, willekeurig genomen gedeelten van het organisme toch tot volkomen zee-egels kunnen uitgroeien en tevens, dat eene samensmelting van meerdere kiemen eveneens een normaal organisme kan geven. Eene regulatie zou onder den invloed van de entelechie plaats hebben en het ontstaan van de Ganzheit mogelijk maken.

Na de differentiatie echter leidt een ingrijpen tot storingen in de ontwikkeling. Deze proeven en vele andere van DRIESCH pleiten z.i. tegen de mechanistische theorieën. Een gedeelte van het mechanisme kan niet normaal afloopen en hetzelfde resultaat opleveren als het geheele mechanisme. Het is echter geenszins noodig, deze regulatie als bewijs van den invloed van het geheel op de ontwikkeling aan te halen; deze toch ligt reeds evengoed in den normalen groei, de merkwaardige ontwikkeling, den ontzettend ingewikkelden, onbegrijpelijken loop der gebeurtenissen van kiem tot totaal organisme.

De entelechie-hypothese is vitalistisch, metaphysisch, niet natuurwetenschappelijk. De metaphysische gestaltevorming werd daarom terecht krachtig bestreden, vooral door SCHAXEL, SPEMANN, BOVERI, MORGAN, GURWITSCH en anderen. Een metaphysisch begrip wordt misschien tijdelijk geaccepteerd, doch het streven is er steeds op gericht, dit te vervangen door een natuurwetenschappelijk. De metaphysica verrijkt de natuurwetenschap zonder te verkleinen.

Het is nu in de eerste plaats SPEMANN, die met GEINITZ en BOVERI en anderen de Ganzheitsfactor *in* het organisme aanneemt, waartoe uitvoerige onderzoekingen over embryonale transplantaties hem voeren. Embryonale gedeelten toch van kiemen, gebracht in indifferente deelen van dezelfde of van een andere kiem, induceeren daar weder een embryonalen aanleg en zijn aanleiding tot den groei van weefsels, die slechts gedeeltelijk uit het geimplanteerde materiaal kunnen ontstaan en hoofdzakelijk van den gastheer afkomstig moeten zijn, waarbij beide elkaar beinvloeden. Van het getransplanteerde deel gaat blijkbaar een organiseerenden invloed uit en daarom noemt SPEMANN zulk een kiemdeel een organisator.

Zijne experimenten leiden tot de volgende conclusie: De kiemdeelen ontwikkelen zich in direct verband met de zgn. Ganzheit en vervolgen onafhankelijk van de omgeving de eens begonnen ontwikkeling, die niet teleologisch is. Het entelechiebegrip is vervangen door een Ganzheitprincipe in en door het organisme.

Over het determinatievraagstuk laat SPEMANN zich uiterst voorzichtig uit en geeft, ook naar aanleiding van proefnemingen over regenëratie van geamputeerde deelen van amphybieën en lagere dieren als zijne meening te kennen, dat men zich de determinatie trapsgewijs moet denken, waarbij dus elk weefsel onder bepaalde omstandigheden tot een volgend overgaat echter in verband met de Ganzheit. Die Bildung des Typischen ist also nicht das Werk Zielstrebender Regulationen sondern das Notwendige Ergebnis aus der ursprünglichen Konstitution.

Bij de planten gaat de potentie der cellen, ook na differentiatie verder. Reeds KLEBS deelt mede experimenteel vastgesteld te hebben, dat uit elk plantenweefsel onder bepaalde omstandigheden de vor-

ming van alle weefsels mogelijk is. Eveneens komt KÜSTER tot de totipotentie van plantenweefsels.

Maar ook bij de lagere organismen zien we hetzelfde. Zoo heeft JENNINGS in 1927 bij de deeling van protozoen eene geheel analoge vormingswijze waargenomen van de organen als bij de veelcelligen. Het Ganzheitprincipe geldt evengoed voor de eencellige.

Ook van de bacteriën en de protozoen moeten dan de bewegingsorganen, de sporen, de cystevorming onder den invloed van de Ganzheit ontstaan.

Eene poging, het raadselachtige determinatie-proces te benaderen, waagt GURWITSCH met zijne geniale Feldtheorie, welke o.a. door eene plausibele beschouwing van de ontwikkeling der bloeiwijze van de kamille en b.v. het ontstaan van den hoed van een paddenstoel, een marasmiussoort, wordt gedemonstreerd.

GURWITSCH neemt in een zich ontwikkelend organisme een krachtveld, een prikkelveld aan, dat eigen is aan de kiem, misschien door chemische energie gewordt en afkomstig is van het organisme. De aangrijpingspunten van de krachten kunnen zoowel binnen als buiten het organisme liggen. Het krachtveld is tijdelijk constant, verandert met den groei en oefent vooral op de celdeeling en celgroei invloed uit.

Met GURWITSCH's theorie van de Feldwirkung wordt het ontstaan van *bepaalde vormen* plausibel en is ook de regeneratie te beschouwen in verband met de Ganzheit, de präformierte Morphe, zooals GURWITSCH het zoo karakteristiek uitdrukt.

Hoe phantastisch deze Feldhypothese van GURWITSCH bij eerste kennismaking ook aandoet, toch geeft zij eene plausibele beschouwing over verschijnselen, waar deze tot heden niet mogelijk was. Bovendien wordt zij gesteund door de zoo belangrijke ontdekking van de mitogenetische stralen van GURWITSCH, stralen door plantenweefsels uitgezonden, die de celdeeling in andere planten op korten afstand gunstig beinvloeden. De zeer recente, uitgebreide onderzoekingen van REITER en GABOR moeten den twijfel weggenomen hebben over het bestaan van deze stralen, waarvan verscheidene eigenschappen zijn vastgesteld. Laten we, hoewel nog eenigszins sceptisch gestemd, op de juistheid van deze onderzoekingen vertrouwend, de hoop uitspreken, dat een nieuw gebied geopend is met wijde perspectieven.

De genoemde onderzoekingen geven aanleiding tot het trekken van de volgende conclusies.

De levende stof wordt beheerscht door de gestalte en is gebonden aan het organisme; zij heeft eene bijzondere chemische samenstelling en onderscheidt zich daardoor van de levenlooze stof. De dood is het gevolg van eene verandering in deze chemische samenstelling.

De soortspecifieke gestalte is in de kiem gepreformeerd. De ontwikkeling, de groei, geschiedt onder den invloed van in het organisme aanwezige factoren, die noch vitalistisch, noch mechanistisch, maar organistisch zijn volgens een voor de levende stof specifiek systeem, met eigen wetten, de physico-chemische reacties in de veelphasige systemen beheerschend.

De belangrijke vraag rijst nu of de onzichtbare bacteriophaag een gestalte heeft, het primaire levenskenmerk.

Een antwoord hierop is af te leiden uit de neutrale, zure en ultraviolette afstervingskrommen van den phaag van Bac. Danicus, die de gelijke resistentie van de phagen aantoonen tegen schadelijke invloeden. Verschillen toch in afmetingen, in aantal moleculen, in rangschikking der moleculen van de phagen, zouden in de krommen tot uiting komen, hetgeen geenszins het geval is. Den bacteriophaag moeten we eene gestalte toekennen en de gestalte van den phaag pleit zeker voor de organisme-hypothese.

Nu is er echter nog een argument voor deze hypothese aan te voeren, namelijk de overeenkomst van de lysis door den phaag en van die door sommige bacteriën, actinomyces en schimmels. Hierdoor blijkt de bacteriophagie niet beperkt te zijn tot den bacteriophaag.

Zulke bacteriolyse verwekkende micro-organismen, bacteriovoren genaamd, kan men uit tuingrond en grachtwater isoleeren, b.v. door direct uitzaaien van deze materialen op een cultuurbodem, waarop de op te lossen bacterie is uitgestreken en goed groeit. Voor de isolatie der bacteriovoren van Bac. Danicus werden tuingrond of grachtwater uitgezaaid op een bouillon agar-agar met $\frac{1}{4}\%$ glucose, waarvan het geheele oppervlak met deze bacterie was geënt. De bacteriovoren kenmerken zich door den groei tot koloniën, die een heldere hof bezitten, waarin geen Bac. Danicus meer voorkomt. Deze zijn opgelost, de producten van de opgeloste bacteriën diffundeeren door de agar-agar en worden door de bacteriovoren geassimileerd. Soms treft men op deze voedingsbodems heldere velden aan, die schijnbaar geheel overeenkomen met die van de bacteriovoren, maar die zich daarvan onderscheiden, doordat er geen kolonie in het midden van het veld aanwezig is. Dit zijn plages van bacteriophagen, die dus in grond of grachtwater vrij voorkomen en daaruit direct geïsoleerd kunnen worden. Voor de gewone isolatiemethode van een phaag hoopt men deze eerst op in een cultuur van de bacterie met het materiaal, waarin de phaag voorkomt. Met het vrij voorkomen van den phaag in den grond stemmen de resultaten van de proeven van GRIJNS over de infectie van den phaag van B. radicicola in klaverplanten overeen. De klaverplanten produceeren geen phaag tegen B. radicicola, maar deze komen van uit den grond in de knolletjes.

Het verkrijgen van reinculturen der bacteriovoren levert in 't al-

gemeen geen moeilijkheden op. Eenige soorten zijn geïsoleerd en onder deze kwam een merkwaardige sporevormer voor, die zich van de andere onderscheidde door geen groei te vertoonen op kunstmatige voedingsbodems, maar zich slechts kon ontwikkelen ten koste van levende of doode Bac. Danicus. Deze bacterie is dus blijkbaar op een specifiek eiwit aangewezen en staat hierdoor physiologisch dicht bij den bacteriophaag. De geïsoleerde bacteriovoren scheiden alle proteolytische enzymen af. Door middel van dit enzym wordt de lysis niet alleen veroorzaakt, hetgeen reeds direct volgt uit de ongunstige verhouding van de aantallen bacteriovoren en proteolytische bacteriën in gracht-water en tuingrond, welke zeker kleiner dan $^1/_{10000}$ is. Bovendien blijken verscheidene zeer krachtig proteolytische bacteriën, zooals Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bac. megatherium, B. prodigiosum in het geheel geen lysis van Bac. Danicus te veroorzaken. Noodig voor de lysis is een toxine, dat door de kolonie wordt afgescheiden, naar de bacteriën diffundeert en deze doodt, waarna ze door eigen proteolytische enzymen of door die van de bacteriovoren of door beide worden verteerd. De oplossingsvelden breiden zich steeds uit en kunnen in enkele dagen een diameter van eenige centimeters verkrijgen. Er is hier geen sprake van een remmenden invloed op den groei, maar van een krachtige lysis, die zich over verscheidene centimeters in een dichte bacteriënlaag uitstrekt.

Geheel in overeenstemming hiermee is vastgesteld, dat bij de lysis door den phaag een toxine een belangrijk aandeel heeft.

De lysis door bacteriovoren, de heterobacteriolyse, is specifiek evenals de bacteriophagie. Dit blijkt wel uit de volgende voorbeelden. Sarcina luteae b.v. geeft lysis met de bacteriovoren Bac. polimyxa en Bac. bacteriovorus, maar niet met Serratia laterica, terwijl B. violateus door geen der genoemde bacteriovoren wordt opgelost, maar wel door een actinomyces. Ook Azotobacter chroöcoccum, B. radicicola, B. coli, B. Stutzeri, Bac. megatherium gaven geen lysis met de reeds genoemde bacteriovoren.

Er is nu nog een typische overeenkomst tusschen de aantasting van bacteriën door den phaag en die door de bacteriovoren. Bestaat n.l. van een bacterie een phaag, dan zijn er ook bijna zeker bacteriovoren voor deze bacterie te vinden. Ja, de overeenkomst is zoo frappant, dat de afscheiding van een phaag door de bacteriovoren niet uitgesloten leek, dat dus de bacteriovoren den phaag zouden produceeren. Buiten twijfel is echter de afwezigheid van den phaag bij de heterobacteriolyse vastgesteld.

Het is nu eenige jaren geleden, dat door FLEMING eene merkwaardige ontdekking is gedaan over het voorkomen van een bacterietoxine, lysozym genaamd, in vele levende weefsels. FLEMING ontdekte dit lysozym bij een studie over bacteriën in de neusholte tijdens ver-

koudheden. Werd het neussecreet op vaste voedingsbodems uitgestreken en deze aan luchtinfectie blootgesteld, dan bleven de plaatsen, waar het secreet was gestreken, vrijwel steriel, terwijl daaromheen allerlei bacteriën uit de lucht tot koloniën groeiden. Het verdere onderzoek openbaarde, dat de bacteriëele werking voornamelijk wordt veroorzaakt door het traanvocht, dat door het traankanaal in de neusholte vloeit. Verschillende bacteriën nu reageeren hierop ongelijk; ze worden meer of minder snel opgelost, terwijl sommige in 't geheel geen lysis vertoonen. Een bacteriophaag was in het traanvocht niet aanwezig; blijkbaar wordt het lysozym door het organisme in het traanvocht afgescheiden. Zooals uit een nadere studie volgde, komt het in bijna alle lichaamsvochten en weefsels voor en ook in geringe hoeveelheden in plantenextracten; daarentegen is het in uiterst geringe hoeveelheid in de hersenen aanwezig. Ook eieren van kippen en eenden b.v. bevatten veel lysozym en volgens FLEMING alleen in het eiwit en niet in den dooier; tevens treft men het in vischkuit aan. Lysozym kan als een verdedigingsmiddel tegen bacterie-infecties worden aangenomen.

L. K. WOLFF bestudeerde de stof nader, toonde lysozym ook in den dooier aan en werkte eene zuiveringsmethode uit met behulp van kolloïdaal ijzerhydroxyde, waardoor een scheiding van de eiwitten mogelijk is, gevolgd door concentratie door indampen in vacuum en daarna precipitatie met aceton. Op deze wijze is een lichtgeel poeder verkregen, dat ongeveer 10.000 keer zoo krachtig werkt als het kippeneiwit, waarvan werd uitgegaan.

Het lysozym, door hoogere organismen gevormd, heeft eigenschappen, die met de door den bacteriophaag en de bacteriovoren afgescheiden toxinen overeenstemmen. Het reageert ongelijk op verschillende algemeen in de natuur voorkomende bacteriënsoorten uit grond, grachtwater en uit de lucht geïsoleerd. Zoo worden op vaste voedingsbodems met ± 20 % kippen-eiwit Sarcina luteae, Bac. Danicus, B. radicicola van Hubam-klaver snel opgelost, daarentegen B. coli, B. prodigiosum, Azotobacter chroöcoccum, Bac. megatherium slecht. Het heeft er allen schijn van, dat de bacteriën, waarvan gemakkelijk èn bacteriophaag èn bacteriovoren te kweeken zijn, ook door lysozym snel worden opgelost. Of er nu inderdaad verband bestaat tusschen de bacterietoxinen van hoogere organismen en die van micro-organismen zullen nadere onderzoekingen uitwijzen. Door het onderzoek van FLEMING en WOLFF is echter vastgesteld, dat het verschijnsel van de bacteriolysis niet tot de micro-organismen beperkt is, maar meer algemeen in de natuur voorkomt.

We kunnen nu nog een paar voor de beoordeeling van den phaag belangrijke punten behandelen en wel in de eerste plaats den bouw van den bacteriophaag, namelijk of deze een eigen samenstelling

heeft, vreemd aan die van de bacterie. De specificiteit van Bac. bacteriovorus maakt het mogelijk, met zekerheid vast te stellen, dat het inderdaad het geval is, zooals met het volgende experiment bewezen wordt.

Aan een afgekoelde maar nog vloeibare agar-agar, voorzien van een flinke hoeveelheid gekookte of levende Bac. Danicus, worden eenige cm^3 van een bacteriophaag-suspensie toegevoegd en daarna de agar-agra in een glasdoos uitgegoten. Na stolling worden op dezen vasten voedingsbodem strepen getrokken van Bac. bacteriovorus. Deze bacterie groeit hier uitstekend èn van de stoffen van het lysaat èn van de doode Bac. Danicus. Deze laatste worden opgelost en de lysis geeft een beeld van de diffusie van de door de Bac. bacteriovorus afgescheiden stoffen. Zijn nu alle bacteriën opgelost, dan zijn de afgescheiden stoffen door de geheele agar-agar gediffundeerd. Maar gaan we onderzoeken of de toegevoegde millioenen bacteriophagen nog in deze agar-agar aanwezig zijn, dan zien we, dat dit inderdaad het geval is, zelfs na 6 weken krijgt men den indruk, dat het aantal niet sterk vermindert. Hetzelfde resultaat levert een onderzoek naar de verandering van het aantal bacteriophagen in een lysaat, waarin Bac. bacteriovorus is geënt en van het aantal in een deel van hetzelfde lysaat zonder Bac. bacteriovorus. De aantallen verschilden gedurende de 5 weken, die de proef duurde, niet meer dan 12 %. De bacteriophaag blijft onaangetast achter, de bacteriën verdwijnen geheel. De bacteriophaag is dus geen deel van de bacterie, maar heeft een eigen samenstelling.

Geheel anders reageert Actinomyces albus, eveneens een bacteriovoor van Bac. Danicus, op den bacteriophaag. Voeren we overeenkomende proeven als juist besproken met dit micro-organisme uit, dan treffen we in de agar-agar geen enkelen bacteriophaag meer aan. Actinomyces albus lost dus ook den bacteriophaag op. Door de grootere specificiteit van Bac. bacteriovorus is het mogelijk het verschil in samenstelling tusschen bacterie en phaag uit te maken.

Als laatste punt kunnen we het bewijs van den groei van den bacteriophaag ten koste van doode bacteriën behandelen.

Het obligaat parasitisme van den phaag geeft den tegenstanders van de organisme-hypothese nog een wapen, zij het ook een zwak wapen, in de hand. Het laat nog de mogelijkheid open van de vorming van den phaag door de levende bacterie zelf. Het is eene gewrongen redeneering na al de verkregen argumenten, maar het is niet uitgesloten.

Eene vermeerdering ten koste van doode bacteriën mag als een bewijs van de organisme-theorie gelden.

Op verscheidene wijzen is getracht de bacterie zóó voorzichtig te dooden, dat de phaag deze nog kan oplossen en zich vermenig-

vuldigen. Uiterst voorzichtig is Bac. Danicus gedood met alcohol, verdunde zuren, verdunde alkaliën, met tuluol en met aceton, maar steeds had met den dood der laatste bacterie ook de mogelijkheid van aantasting door den phaag opgehouden. De structuur van de bacterie is dan blijkbaar te veel gewijzigd en de ontwikkeling van den phaag daardoor uitgesloten. Evenmin is dit het geval in een vloeistof van door bacteriovoren opgeloste Bac. Danicus, en zelfs niet in een milieu van fijngemalen en gefiltreerde Bac. Danicus. Men zou toch verwachten, dat dit materiaal door fijnmalen van de bacteriën onder steriele omstandigheden verkregen, juist een medium was, waarin groei van den bacteriophaag met succes zou slagen. Dit fijnmalen geschiedde in steriele kolfjes met agaten bolletjes. Deze kolfjes draaien om een eigen as en tevens om een tweede as, zoodat de bolletjes tegen den glaswand gecentrifugeerd worden, daarlangs en over elkaar slijpen en zoo de bacteriën fijnmalen. Onvermijdelijk is echter bij dit procédé het ontstaan van uiterst fijn kolloïdaal slijpsel van glaswand en bolletjes en dit slijpsel absorbeert den later toegevoegden phaag en belemmert de lysis. Wel kan met zeer verdund alkali de phaag gedeeltelijk vrijgemaakt worden, maar tellingen zijn toch te onnauwkeurig om daaruit conclusies te trekken.

Zekerheid van den groei van den phaag ten koste van doode bacteriën gaf echter eene nadere bestudeering van de plages.

Een plage ontstaat, zooals reeds is meegedeeld, door een bacteriophaag in een aaneengesloten bacterielaag als een cirkelvormig volkomen helder veld, waarin alle bacteriën zijn opgelost en slechts de phaag voorkomt. Om dit heldere, doorzichtige veld is een zône, meer doorschijnend dan het omringende bacteriemateriaal en eenigszins ingezonken. De zône heeft een geringere dikte dan de omringende bacterielaag. Het heldere veld heeft na twee dagen bij 28° C. een diameter van één à twee millimeter, de zône een breedte van drie à vier millimeter. In deze zône is de toestand de volgende: Vlak bij het heldere veld treft men bacteriophagen aan en geen *levende* bacteriën. Dit is vast te stellen door het materiaal uit te strijken op een agar-agar met bacterielaag van Bac. Danicus en op een bouillonagar-agar. Op de eerste wordt de phaag door plagevorming, op de tweede de levende bacterie door kolonievorming waarneembaar. In het midden van de zône ongeveer vinden we noch den phaag, noch levende bacteriën. Het hier genomen materiaal kan weken op de bouillon agar-agar verblijven zonder één kolonie van Bac. Danicus te geven en eveneens komen op de Danicuslaag op agar-agar uit het materiaal geen plages. Het microscopisch beeld bevat eenigszins korte en verschrompelde bacteriën met sterk gekorrelden inhoud, terwijl de wand minder duidelijk uitkomt als bij de normale Bac. Danicus. Aan den buitenkant van de zône zijn levende Bac. Danicus en geen bacteriophaag

aanwezig. De phaag komt dus slechts aan den binnenkant van de zône voor, de levende bacterie aan den buitenkant. Het middengedeelte bevat geen phaag en geen levende bacteriën ,maar door een toxine gedoode bacteriën. In deze bacteriën is de phaag zooals we zagen niet aanwezig en ook de toepassing van de methode van FLU, fijn wrijven der bacteriën met gegloeid natriumsulfaat, waardoor mogelijke vergissing uitgesloten wordt, levert geen phaag. Beschouwen we een dag later deze plage weer, dan heeft het heldere veld het gebied der doode bacteriën in de zône met eenige millimeters overschreden en is de zône aanmerkelijk uitgebreid. Hetzelfde onderzoek is daarna met overeenkomstig resultaat met den phaag van B. radicicola van Hubam klaver en met de B. radicicola, die geen proteolytische enzymen afscheidt, door WIERINGA uitgevoerd. Hierdoor is de groei van den phaag van doode bacteriën en daarmede de organisme-theorie aangetoond.

Door de volgende feiten is het beschouwen van den bacteriophaag als een organisme gerechtvaardigd: De aanpassing aan schadelijke invloeden; het ontstaan van een antiphaag-serum; de gestalte van den phaag; het vrij voorkomen in de natuur; de overeenkomst van de lysis van bacteriën door den phaag en bacteriovoren; de eigen samenstelling, vreemd aan die van de bacterie; de groei van den phaag ten koste van doode bacteriën.