De voordrachten uitgesproken tijdens het symposium 'De Microbiologie drie eeuwen na Antoni van Leeuwenhoek', leverden het materiaal voor deze uitgave.

Het symposium vond plaats op 26 en 27 maart 1975 in Amsterdam, en werd georganiseerd door de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie in samenwerking met de Biologische Raad van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.

In de redactiecommissie voor deze uitgave hadden zitting: prof. dr. F. Wensinck (voorzitter), mej. dr. A. Kaars Sypesteijn, dr. ir. G. Vogels, dr. W. P. M. Hoekstra, dr. D. van der Mei (Biologische Raad) en mevr. ir. T. W. Brascamp-van der Lee (Pudoc).

de microbiologie drie eeuwen na Antoni van Leeuwenhoek

Voorzitter redactiecommissie: prof. dr. F. Wensinck

Centrum voor Phytopathologie en Entomologie
BIBLIOTHEEK
WAGENINGEN

pudoc

Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie
Wageningen - 1976

Isn - 105563-03

ISBN 90 220 0582 8
Copyright: Pudoc, Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen.
Op de omslag: Scanning-elektronenmicroscopische opname van *Escherichia coli*. Foto: C. Bakker & N. Nanninga.
Druk: Boek- en Offsetdrukkerij Verweij Wageningen B.V.

Inhoud

Inleiding
Dr. D. van der Mei *Biologische Raad van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 7

Antoni van Leeuwenhoek, zijn 'kleijne diertgens' en zijn opvattingen over het ontstaan van het leven
Dr. P. Smit *Afdeling Geschiedenis der Biologie van de Katholieke Universiteit te Nijmegen* 9

Het zichtbaar maken van micro-organismen
Dr. N. Nanninga *Laboratorium voor Elektronenmicroscopie van de Universiteit van Amsterdam* 24

De identificatie van bacteriën: van fenotype naar genotype
Prof. dr. J. De Ley *Laboratorium voor Microbiologie en microbiële Genetica van de Rijksuniversiteit te Gent* 46

Prebiotische evolutie
Prof. dr. A. W. Schwartz *Laboratorium voor Exobiologie van de Katholieke Universiteit te Nijmegen* 59

De rol van microben in het evolutieproces
Dr. Lynn Margulis *Department of Biology, Boston University, Massachusetts, U.S.A.* 72

De betekenis van de microben voor het leven op aarde
Prof. dr. J. W. M. la Rivière *International Courses in Hydraulic and Sanitary Engineering van de Technische Hogeschool te Delft* 97

Microbiologische afbraak van synthetische verbindingen
Drs. G. J. E. Thijsse *Woodstock Laboratorium van Shell Research Limited, Kent, Engeland* 119

Residenten en passanten
Prof. dr. F. Wensinck *Afdeling Medische Microbiologie van de Erasmus Universiteit te Rotterdam* 139

Aan het grensvlak mens-microbe
Prof. dr. K. C. Winkler *Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit der Geneeskunde van de Rijksuniversiteit te Utrecht* . . 149

De bereiding van penicilline; een voorbeeld van het gebruik van micro-organismen in de procesindustrie
Ir. W. F. van der Waard *Afdeling Research and Development, Gist-Brocades NV te Delft* 162

Plasmiden in bacteriën: enige fundamentele aspecten
Dr. W. P. M. Hoekstra *Vakgroep Microbiologie, Subfaculteit der Biologie van de Rijksuniversiteit te Utrecht* 180

Praktische betekenis van resistentie- en virulentieplasmiden bij Enterobacteriaceæ
Dr. P. Guinée *Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven* 196

Microbiologie in de toekomst
Prof. dr. ir. A. Rörsch *Laboratorium voor Moleculaire Genetica van de Rijksuniversiteit te Leiden* 206

Literatuur 220

Register 235

Inleiding

D. VAN DER MEI

Zuiver wetenschappelijk onderzoek heeft de basis gelegd voor alle ontwikkelingen in de microbiologie. Onbegrensde nieuwsgierigheid is immer de drijfveer geweest voor het doen van ontdekkingen die een geheel nieuwe periode in de wetenschap, en daarmee onverbrekelijk verbonden ook in de maatschappij, inluidden.

Het is terecht dat Antoni van Leeuwenhoek in het boek centraal staat. Hoewel er slechts één bijdrage aan hem gewijd is, blijkt juist uit deze bijdrage dat Van Leeuwenhoek veel meer was dan waarnemer en ontdekker van de microscoop. De microscoop was het hulpmiddel dat hem toegang verschafte tot een wereld die voordien ontoegankelijk was. Zijn nauwkeurige registratie van hetgeen hij waarnam bracht hem tot interpretaties en standpunten die deels onjuist bleken te zijn, maar die voor een deel ook getuigen van een vooruitziende blik.

De microscoop werd ontwikkeld tot een steeds verfijnder instrument, enkele vragen oplossend, steeds meer vragen oproepend. De elektronenmiscroscoop laat thans toe door te dringen tot de fijnste structuren, waardoor een diepgaand inzicht verkregen wordt in de structuur en een aantal functies van de micro-organismen. Moderne analysetechnieken geven nieuwe inzichten in de natuurlijke verwantschappen tussen de micro-organismen.

Niet alleen in de beschouwingen over de oorsprong van het leven nemen de microben een centrale plaats in; steeds meer lijkt het aannemelijk dat de eukaryote cel, en daarmee alle hogere levensvormen, min of meer direct afstammen van de prokaryote microben. Ook nu nog vormen de microben de belangrijkste component van de levende natuur. De kringlopen van koolstof, stikstof en zwavel worden door hen beheerst. Eerst sedert vrij korte tijd realiseren wij ons dat we door het ongelimiteerd inbrengen van vervuilende en toxische stoffen in de natuur vooral ook het microbiële leven beïnvloeden. Hoe sterk en op welke wijze, is vaak nog niet precies vast te stellen. Al is het arsenaal

aan mogelijkheden dat micro-organismen bezitten om bepaalde stoffen af te breken, vaak toereikend om de meest vreemdsoortige produkten van het menselijk vernuft onschadelijk te maken en uit het milieu te verwijderen, onbegrensd is dit vermogen niet. Ook bacteriële infecties, de meest op de voorgrond tredende vijandfunctie van de microben, hebben hun positieve kanten. Een bacterie-vrij organisme blijkt bepaald slecht toegerust voor het leven te zijn. De grens tussen vriend en vijand blijkt vaak moeilijk te trekken.

De mens gebruikt de micro-organismen op zeer vele manieren. Reeds in de verre oudheid hielpen ze hem voedingsmiddelen te conserveren en ontstonden microbiologisch vervaardigde produkten als wijn, bier en kaas. Een meer recente toepassing vinden we bij de produktie van antibiotica. Het industrieel gebruik van micro-organismen brengt geheel aparte problemen met zich mee. Het gebruik van antibiotica eveneens. De te bestrijden microben wapenen zich als het ware tegen deze unieke bestrijdingsmiddelen door een resistentie te ontwikkelen. Ook hier heeft niet direct op toepassing gericht, fundamenteel wetenschappelijk onderzoek ertoe geleid dat men zich vroegtijdig realiseerde welke gevaren er schuilen in, onder meer, het ongelimiteerd gebruik van antibiotica.

De toenemende kennis van het microbiële leven zal zeker uitmonden in een groot aantal voor de mens 'vriendelijke' toepassingen. Doordat de wetenschap thans in een stadium komt waarin het mogelijk is in te grijpen in het genetisch systeem van micro-organismen, ligt een groot terrein voor nieuwe doorbraken in de wetenschap open. Het besef dat deze mogelijkheden ook hun schaduwkanten hebben, wordt steeds sterker. Door het vroegtijdig signaleren van de gevaren en door zich ertegen te wapenen, wordt voorkomen dat de wetenschap zich gaat gedragen als de toverkunst in handen van de tovenaarsleerling.

De verschillende schrijvers belichten elk één van de genoemde facetten. Deze wandeling door het gebied van de microbiologie geeft een karakterisering van haar plaats en richting op dit moment. Zij voert vrijwel niet over de terreinen der virologie en immunologie, die na zorgvuldig overleg buiten de route zijn gehouden: twee dagen kon, een zesdaagse werd teveel!

Antoni van Leeuwenhoek, zijn 'kleijne diertgens' en zijn opvattingen over het ontstaan van het leven

P. Smit

De ontdekking van de 'kleijne diertgens'

De eerste maal dat Van Leeuwenhoek melding maakte van 'kleijne diertgens' was in zijn brief van 7 september 1674, toen hij, varende op het Berkelse Meer een flesje met water vulde, hetwelk hij de andere dag door zijn microscoopje observeerde. Hij beschreef daarbij "eenige groene ranckjens, in geschickte ordre slanghs gewijse omgekrult, op gelijcke manier als de copere off tinne slangen sijn, die de destillateurs gebruijcken, omme haer over gehaelde wateren te verkoelen, ende de gantsche circumferentie, van jeder van dese ranckjens, hadt omtrent de dickte van een haer van ons hooft . . . ende daer beneffens, seer veel kleijne diertgens".

In feite gaf Van Leeuwenhoek hier de eerste beschrijving van een tot het algemeen voorkomende geslacht *Spirogyra* behorende groenwier en tegelijkertijd maakte hij in één adem de ontdekking bekend van de microscopische diertjes, de Protozoa en daarmee gaf hij in wezen de stoot tot de geboorte van de microbiologie.

Op het eerste gezicht lijkt deze ontdekking op een toevalligheid te berusten. In feite, evenwel, pasten deze waarnemingen in een langs wetenschappelijke lijnen opgezet onderzoeksprogramma. In de periode 1674–1676 was Van Leeuwenhoek namelijk vóór alles geïnteresseerd in de structuur van de materie, de levende en de levenloze, en in dit verband bekeek hij de meest uiteenlopende substraten, zoals allerlei plantaardige en dierlijke weefsels en door het lichaam afgescheiden sappen. In al deze substanties meende Van Leeuwenhoek één enkele grondsubstantie te zien, de globulen, ronde bolletjes. In het kader van dit onderzoek is het volkomen logisch, dat hij enig drabbig water uit het Berkelse meertje onderzocht en ook, dat hij niet verbaasd was ook daarin zijn globulen terug te vinden, zij het in de vorm van 'kleijne diertgens'.

Bovendien was Van Leeuwenhoek er zich van bewust, dat hij verschillende vormen van microscopische diertjes waarnam: sommige waren rondachtig, andere eivormig; enkele hadden vinnetjes of bewogen zich zeer traag voort en weer andere beschrijft hij als in het midden groen en van voren en achteren wit, hetgeen aangeeft, dat hij *Euglena viridis* gezien moet hebben.

Van Leeuwenhoeks waarnemingen werden door zijn tijdgenoten zeer kritisch ontvangen. We moeten daarbij niet vergeten, dat Van Leeuwenhoek een amateur was, die bovendien slechts de Nederlandse taal beheerste. Daarbij komt, dat hij de eerste was, die microscopen construeerde die van voldoende sterkte waren om deze 'kleijne diertgens' te kunnen zien en dat hij bovendien ook nog de juiste woorden moest vinden om zijn waarnemingen te beschrijven, want een goed begripsapparaat had hij niet tot zijn beschikking.

Verdere experimenten

Het was een min of meer toevallige gebeurtenis die ertoe leidde, dat Van Leeuwenhoek zijn waarnemingen aan de 'kleijne diertgens' ging vervolgen. In september 1675 ontdekte hij namelijk levende schepsels in regenwater, waaronder een diertje met een staart die ongeveer vier maal zo lang was als het gehele lichaam, waarmee het aan het substraat was vastgehecht, en waarvan het los te maken was door het water flink te schudden. Het zwom dan langzaam rond, zonder zijn staart te bewegen; de staart kwam evenwel direct in actie zodra het zich weer op het substraat vast ging zetten. Het lijdt geen twijfel of Van Leeuwenhoek heeft hier een *Vorticella* beschreven.

Naar aanleiding van zijn ontdekkingen in regenwater, zette Antoni van Leeuwenhoek in september 1675 een serie experimenten op. Hij onderzocht daarbij regenwater opgevangen in de goot, of op verschillende hoogten in een schone schaal; hij onderzocht grachtwater, putwater en zeewater. Twee tot drie maal per dag deed hij zijn waarnemingen en hij hield nauwkeurig boek van alles wat hij deed en zag. Bovendien bracht hij zijn monsters onder verschillende omstandigheden van licht en donker en vergeleek hij de ontwikkeling van monsters binnenshuis met die van buitenshuis. Zo ontdekte hij onder meer, dat het altoos heldere water uit de put in zijn tuin in de zomer tal van kleine wezens bevatte, terwijl hij er in de winter geen organismen in kon waarnemen, en hij was de eerste die een aantal organismen uit

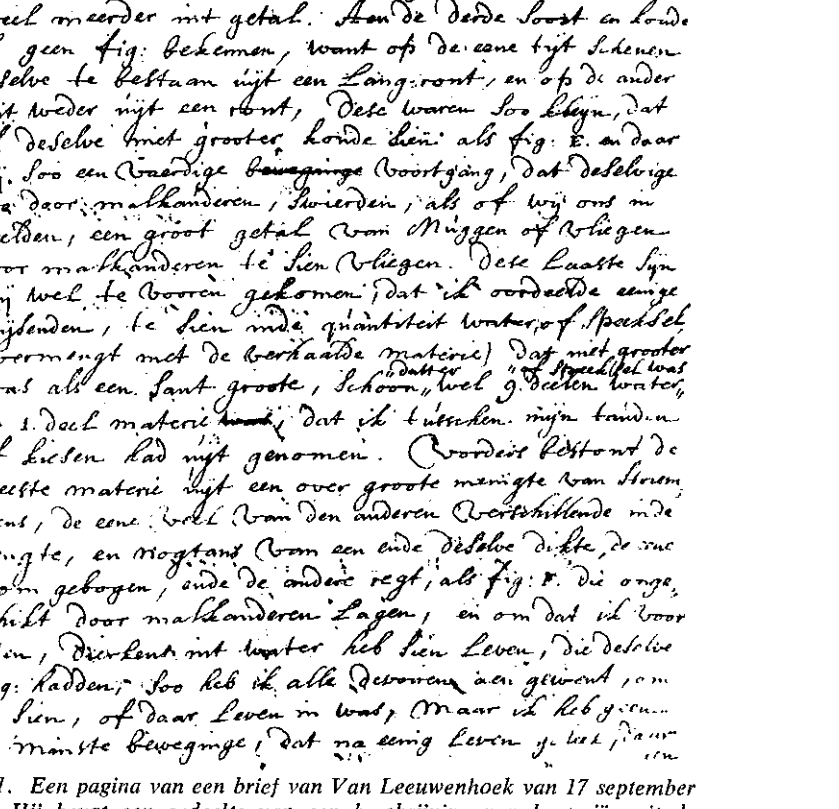


Fig. 1. Een pagina van een brief van Van Leeuwenhoek van 17 september 1683. Hij bevat een gedeelte van een beschrijving van bacteriën uit de mond.

het zeewaterplankton heeft beschreven. Al doende beschreef hij een aantal nieuwe micro-organismen, en van een aantal ervan laat de geslachts-, en soms zelfs de soortsnaam, zich vaststellen aan de hand van Van Leeuwenhoeks nauwkeurige beschrijvingen.

Bij zijn onderzoek naar de oorzaak van de scherpe smaak van tal

van stoffen, ontdekte Van Leeuwenhoek, dat er in het water waarin peperkorrels te weken lagen, eveneens 'kleijne diertgens' voorkwamen. Dit gaf hem aanleiding tot het opzetten van een tweede reeks van experimenten in het voorjaar van 1676. Hij maakte daartoe een reeks van combinaties, zoals peper in gewoon water, in sneeuwwater, in regenwater en in putwater; gemberwortel in sneeuwwater; kruidnagelen in regen- en putwater; nootmuskaat in put- en sneeuwwater. In al zijn experimenten ontdekte hij zijn kleijne diertgens en wederom werden zijn handelingen en bevindingen van dag tot dag opgeschreven in zijn aantekeningenboekje.

Het resultaat van deze beide series van experimenten werd neergelegd in een van Van Leeuwenhoeks meest beroemde brieven, namelijk die van 9 oktober 1676, een toonbeeld van exactheid van waarneming en van formulering van de resultaten ervan. Zo kunnen we aan de hand van deze brief vaststellen, dat Van Leeuwenhoek op 24 april 1676 voor het eerst de waarneming van bacteriën heeft beschreven en zo zouden we kunnen stellen dat deze dag tevens de geboortedag is van de bacteriologie. Ik wil hier niet verder ingaan op de ontdekking van de bacteria, dat heb ik, met de heer Heniger, gedaan in een bijdrage in het tijdschrift Antonie van Leeuwenhoek. Hier moge slechts Van Leeuwenhoeks ontdekking van spirillen in zijn eigen bewoordingen worden beschreven: in één van zijn infusies beschreef hij hen als "aaltgens of wormtgens, leggende overhoop door malcanderen en beweegden, alsof wij met ons blote oog aanschouwden een gansche tobbe, met seer kleijne aeltgens . . . en scheen het gantsche water, door de menigvuldige diertgens als te leven, dit was voor mijn onder alle de wonderheden die ik in de natuer heb ontdekt, het alderverwonderendste, en ik moet seggen, datter voor mij, tot nog toe geen grooter vermaek in mijn oog is geweest, als dese gesichten".

Ten einde een indruk te geven van Van Leeuwenhoeks wijze van werken bij de opzet van deze series experimenten, moge er een reeks kort worden beschreven. Op 26 april 1676 nam Van Leeuwenhoek sneeuwwater van wel drie jaar oud, dat hij bewaard had in zijn kelder in een goed gesloten glazen fles. In dit water had hij geen levende wezens kunnen ontdekken. Hij goot wat van dit sneeuwwater in een schoon porceleinen kopje met peperkorrels en deed tot 3 mei dagelijks waarnemingen, zonder evenwel levende wezens te kunnen ontdekken. Op 3 mei werd nieuw sneeuwwater toegevoegd, omdat het water verdampt was en op 6 mei werden de eerste levende wezens waargeno-

men; zij waren heel klein. Op 10 en 18 mei werd er weer sneeuwwater bijgevoegd en op 23 mei ontdekte Van Leeuwenhoek grotere dieren 'volcomen eijront . . . de kievitseijeren gelijk' en Van Leeuwenhoek doet erg zijn best om in het lichaam van deze grotere dieren jeugdstadia te vinden, maar hij slaagde daar niet in. Op 25 mei vond hij de eironde diertjes – vermoedelijk *Holophrya ovum* – in grote hoeveelheden, maar 'daarnevens eenige uijtstekende seer dunne pijpjes'; vermoedelijk heeft hij hier draadbacteriën gezien. Op 26 mei schatte Van Leeuwenhoek het aantal eironde diertjes op wel 6 à 8000 in een druppel water. Bovendien vermeldt hij, dat de grotere eironde dieren vooral in de onderste waterlaag zwommen, terwijl de kleine dieren vooral in de hogere waterlagen voorkwamen. Vervolgéns nam het aantal kleine diertjes af en dat van de grote toe.

Op 30 mei tenslotte waren er nog maar weinig diertjes over. Het water was intussen vrijwel verdampt. Nadat er op die dag nieuw water was toegevoegd, verschenen er de volgende dag weer talrijke eironde diertjes, die blijkbaar onder invloed van de slechte omstandigheden de cyste-vorm hadden aangenomen.

Reactie van de wetenschappelijke wereld

Van Leeuwenhoeks brief van 9 oktober 1676 werd in het voorjaar van 1677 besproken in een drietal vergaderingen van de Royal Society. Een deel van de brief werd in het Engels vertaald en gepubliceerd in de Philosophical Transactions. De moeilijkheden van de Fellows laten zich evenwel raden, als we ons realiseren, dat alles wat Van Leeuwenhoek in zijn brief beschreven heeft, zo nieuw was, dat het buiten de ervaring viel van de leden der Royal Society. Het is dan ook niet verwonderlijk, dat er van verschillende kanten twijfel werd uitgesproken of Van Leeuwenhoek inderdaad wel kleijne diertgens gezien kon hebben, onder andere ook door onze landgenoot Christiaan Huygens. Hierbij moet men bedenken, dat vrijwel niemand microscopen bezat van voldoende sterkte om daarmee de door Van Leeuwenhoek beschreven kleijne diertgens waar te nemen. Daar komt nog bij, dat het in die tijd ontzettend moeilijk was om aan te geven hoe klein de waargenomen diertjes nu wel waren. Daartoe nam Van Leeuwenhoek zijn toevlucht tot vergelijkingen met beter bekende zaken. Zo schrijft hij bij zijn ontdekking van de hierboven genoemde *Vorticella*, dat zijn staart door de microscoop gezien net zo dik is als spinrag met het

blote oog gezien. Bij zijn beschrijving van de diertjes in het regenwater zegt hij, dat de grootte van zo'n diertje zich tot die van de kaasmijt verhoudt als de afmetingen van de honingbij tot een paard. In een andere brief schreef hij, dat de kleinste diertjes die hij waarnam meer dan 85 maal kleiner zijn dan een globule bloed en dat 30 miljoen van deze diertjes nog niet zo veel ruimte innemen als een grove zandkorrel. Deze opgaven geven aan, dat Van Leeuwenhoek in deze beide laatstgenoemde gevallen bacteriën voor ogen moet hebben gehad.

Van Leeuwenhoek probeerde dit kwantitatieve aspect ook nog van een andere zijde te benaderen. In zijn brief van 23 maart 1677 trachtte hij het aantal infusiediertjes te tellen, door een hoeveelheid vloeistof met een volume ter grootte van een gerstekorrel op te zuigen in een dunne glazen buis, die in 25 of meer delen verdeeld was. Op deze wijze werd door hem het principe der telkamer dus reeds toegepast. Van Leeuwenhoek kon op deze wijze berekenen, dat één druppel van dit infusiewater minstens 2 730 000 van deze kleijne diertgens moest bevatten en hij voegt er aan toe, dat hij zijn berekeningen aan de lage kant heeft gehouden.

Van Leeuwenhoek was zich blijkbaar ervan bewust, dat deze berekeningen de twijfel aan zijn waarnemingen mogelijk nog zou doen toenemen en hij besloot verschillende personen van naam te vragen zijn waarnemingen te controleren en hun bevindingen schriftelijk vast te leggen. In zijn brief van 5 oktober 1677 aan de Royal Society komt hij tot een aantal van ruim vier miljoen kleijne diertgens in één druppel infusiewater en hij voegt aan zijn brief de attesten toe van acht gerenommeerde personen, die zijn waarnemingen bevestigen.

De Fellows besloten toen, om Robert Hooke, een van de secretarissen van de Society, te verzoeken Van Leeuwenhoeks experimenten zo zorgvuldig mogelijk na te doen en na enig experimenteren slaagde Hooke er inderdaad in Van Leeuwenhoeks waarnemingen te bevestigen. Toen vonden Van Leeuwenhoeks ontdekkingen algemeen erkenning en in een brief van Hooke aan Van Leeuwenhoek lezen we, dat zelfs Koning Karel II de kleijne diertgens wenste te zien en zich zeer verheugd had getoond bij de aanschouwing dezer diertgens.

Het ontstaan van het leven - de voortplanting

Naast de vraag naar de *structuur* der levende materie, was Van Leeuwenhoek ook hevig geïnteresseerd in het probleem van het *ontstaan*

van de levende materie, een ander centraal thema in zijn werk. Hij toonde zich hierbij een fervent tegenstander van de leer der spontane generatie, een opvatting die in zijn tijd algemeen aanvaard werd.

In zijn functie als wijnroeier (iemand die de inhoud van wijnvaten meet) kwam Van Leeuwenhoek regelmatig in aanraking met het azijnaaltje, dat soms ook voorkwam in vaten met wijn. Hij hield deze diertjes wel een week lang in leven in zijn werkkamer en ontdekte, dat het aantal aaltjes per druppel water in twee à drie weken tijd toenam van ongeveer 10 tot wel 200 individuen, waarbij hij tevens waarnam dat er dan zeer veel kleine aaltjes tussen waren. Dit bracht Van Leeuwenhoek ertoe naar de oorsprong te gaan zoeken van die zeer kleine exemplaren. Hij nam daartoe een aantal grotere individuen en trachtte hun lichaam uit elkaar te trekken. Op een goede dag nam hij waar dat uit één zo'n aaltje 'vier distincte aeltgens ijder seer net en aerdig in een gevlogten' tevoorschijn kwamen en dat deze jonge aaltjes zich vrij begonnen te bewegen en niet te onderscheiden waren van de kleinste aaltjes die hij in zijn experiment had waargenomen. Ten slotte gelukte het hem zelfs om bij geïsoleerde, volwassen aaltjes de jonge dieren te zien bewegen in het moederlichaam.

Hiermede had Van Leeuwenhoek als eerste vastgesteld, dat de aaltjes levendbarend zijn en in analogie hiermee veronderstelde hij, dat zoiets ook wel eens het geval zou kunnen zijn bij de door hem ontdekte 'kleijne diertgens'. We moeten ons daarbij realiseren, dat voor Van Leeuwenhoek alle microscopische wezens 'animalcules' waren en dat hij zich er helemaal niet van bewust was, dat zij tot geheel verschillende systematische categorieën behoorden. Een organisme zonder skelet of duidelijke huid was iets volkomen nieuws in die tijd.

In het zoëven beschreven experiment met sneeuwwater en peper hebben we reeds opgemerkt, dat Van Leeuwenhoek veronderstelde, dat hij met twee soorten van kleijne diertgens te maken had, een zeer kleine soort en een grote, eivormige, soort, waarbij de kleine diertjes steeds in de hogere waterlagen voorkwamen en de grotere in de diepere lagen, terwijl bovendien het aantal kleine diertjes in de loop van de tijd afnam, het aantal der grote daarentegen juist toenam. In feite beschouwde hij die organismen die wij thans bacteriën noemen, als jeugdstadia van wat wij thans protozoën noemen en in een latere brief zegt hij expliciet, dat de grotere dieren volwassen zijn en de kleintjes hun jongen. Blijkbaar denkend aan zijn waarnemingen bij het azijnaaltje, meende hij toen tevens de jongen of de eieren in het lichaam

van het ouderdier ontdekt te hebben. Voor de moderne bioloog is het duidelijk dat Van Leeuwenhoek in werkelijkheid voedselvacuolen en vet-globulen gezien heeft, liggende in het protoplasma.

De combinatie van het probleem van het ontstaan van nieuw leven en 'kleijne diertgens' kwam ook nog langs andere weg onder Van Leeuwenhoeks aandacht, namelijk toen de Leidse student Johan Ham hem een flesje bracht, waarin zich sperma bevond, afgescheiden door een man die aan een geslachtsziekte leed. Ham meende daarin levende diertjes te hebben waargenomen en Van Leeuwenhoek kon deze waarneming slechts bevestigen.

Van Leeuwenhoek besloot nu gezond sperma te onderzoeken, terstond nadat het afgescheiden was, en hij vond, dat soms meer dan 1000 van die diertjes bewogen in een volume ter grootte van één zandkorrel. Bovendien onderscheidde hij duidelijk een voorste gedeelte dat stomp was, en een achterste gedeelte, dat spits toeliep, hetwelk overging in de staart, die 5 à 6 maal zo lang was als het lichaam en een dikte had van 1/25 van dat lichaam. Ook nam hij waar dat de diertjes zich door middel van hun staart voortbewogen als een aal die in het water zwemt.

Van Leeuwenhoek besefte terdege, dat hij zich met een voor zijn tijd zeer delicaat probleem bezighield en in zijn brief aan de secretaris der Royal Society van november 1677, waarin hij zijn bevindingen openbaar maakte, schreef hij dan ook "Wat ik ook nu nog observeer, is alleen datgene wat zonder eenige zondige bezoedeling van mijzelf, de natuur na den echtelijken coitus achterlaat' en hij vervolgde, dat, indien zijn waarnemingen 'onder de geleerde Heeren walging of opspraak kunnen veroorzaken, dan verzoek ik Uw Hoog Edele dringend, dat hij ze onder zich houdt en ze, wanneer hij het geraden acht òf uitgeeft òf vernietigt".

Nadat Van Leeuwenhoek de spermatozoën bij de mens gevonden had, onderzocht hij velerlei soorten van andere dieren en hij slaagde erin de zaaddiertjes te vinden bij zoogdieren, vogels, vissen en insekten. Weliswaar zag hij duidelijke verschillen tussen de zaaddiertjes van deze verschillende groepen van organismen, maar hij bevond dat die bij lange na niet zo groot waren als de verschillen tussen de dieren die hen hadden voortgebracht, en ook bevond hij, dat er geen enkele correlatie bestaat tussen de grootte van het dier en de afmetingen van de door dat dier geproduceerde zaaddiertjes.

Van Leeuwenhoek was ervan overtuigd, dat zijn waarnemingen op

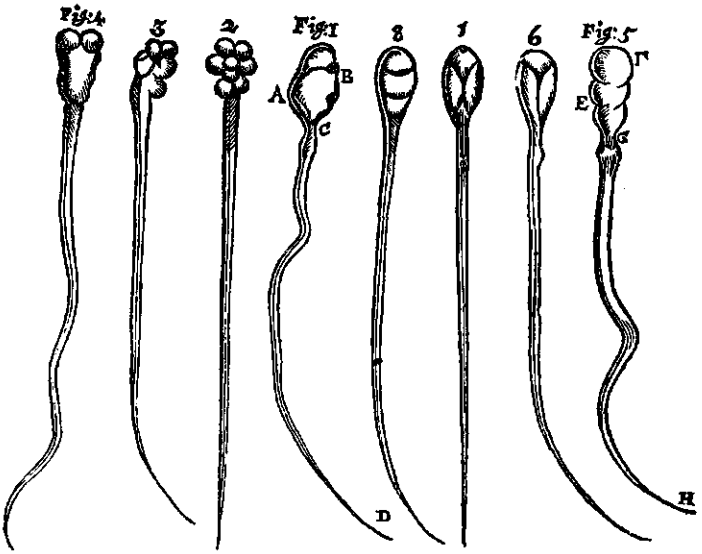


Fig. 2. 1–4: spermatozoën van de mens; 5–8: spermatozoën van de hond. Naar tekeningen van Van Leeuwenhoek.

veel ongeloof bij zijn tijdgenoten zouden stuiten en, zo schreef hij in zijn brief van 25 april 1679, hij zal hen dat niet kwalijk nemen. Wel wees hij er op, dat zijn waarneming van de kleijne diertgens in het regenwater en de infusies ook eerst op ongeloof stuitten, totdat zij door anderen geverifieerd konden worden.

Dit ongeloof in Van Leeuwenhoeks waarnemingen zal zeker zijn aangewakkerd door de gigantische aantallen zaaddiertjes die volgens zijn berekeningen in de zaadvloeistof aanwezig moesten zijn.

In zijn brief van 24 augustus 1688 schreef hij, dat "het getal van de levende dieren, die uijt een Hom van een Kabbeljauw voort komen, meer dan dertig maal meerder is, alsser menschen op den Aerdbodem leven". In het algemeen kunnen we stellen, dat het aantal spermatozoën bij vissen per 1 mm^3 ongeveer 9 miljoen is en als we aannemen dat er in Van Leeuwenhoeks tijd ongeveer 400 miljoen mensen op aarde leefden, dan zijn zijn schattingen beslist aan de zeer bescheiden kant.

Van Leeuwenhoek besloot nu een nader onderzoek in te stellen naar het ontstaan van deze 'kleijne diertgens' in het zaad. Hij nam

daartoe een éénjarige haan, die vier dagen niet bij de kippen geweest was, liet het dier doodbloeden door het de kop af te snijden teneinde niet door bloeduitstortingen gehinderd te worden en sneed daarna de testis met zijn afvoerende vaten eruit. Vervolgens onderzocht hij het vas deferens, te beginnen bij de penis, en hij vond overal talloze zaaddiertjes, tot in de testis zelf toe. Hij stelde vast, dat de testis dient om de zaaddiertjes voort te brengen en hij verklaarde met nadruk, dat deze diertjes niet uit rotting konden zijn ontstaan, zoals men algemeen aannam voor het ontstaan van kleine organismen. Maar hoe waren ze dan wel ontstaan?

Bij zijn onderzoek bij de rat zag Van Leeuwenhoek de 'draatachtige deelen' van de testis, zoals de zaadkanaaltjes door hem werden genoemd, en hij vermoedde terecht, dat de zaaddiertjes in deze kanaaltjes zouden ontstaan.

Hierna kwamen de vragen bij hem op: *hoe* deze zaaddiertjes *gevormd* werden en wat hun *functie* dan wel zou zijn. Vanzelfsprekend was Van Leeuwenhoek niet in staat deze beide vragen volledig te beantwoorden, maar toch kwam hij een heel eind.

Wat de vorming van de spermatozoën betreft, was hij wel erg dicht bij de oplossing in zijn brief van 5 april 1680, waar hij bij zijn onderzoek aan de testis van de rat een grote menigte in een kluwen ineengerolde spermatozoën meende te zien, waarvan hij zich "imagineerde, dat veel van de selvige onvolwassen waren, ende dat die noch geen leven en hadden ontfangen", dat wil zeggen dat zij zich nog niet bewogen, want de begrippen beweging en leven werden door Van Leeuwenhoek, evenals trouwens door zijn tijdgenoten, als synoniem beschouwd. Hoewel Van Leeuwenhoeks beschrijving op zich onjuist is, want spermatozoën liggen nooit ineengerold, is het niettemin waarschijnlijk, dat hij hier onrijpe voorstadia van spermatozoën heeft gezien, want in het stadium van de spermatocyten hebben zij de gedaante van een ronde cel, waaruit allengs een dunne staart groeit.

Van Leeuwenhoek was zich evenwel niet ten volle van de inhoud van deze waarneming bewust en hij veronderstelde aanvankelijk, dat zaaddiertjes uit eieren zouden ontstaan. Dat bracht hem evenwel tot de vraag, waar deze eieren dan wel vandaan kwamen en hij vroeg zich af, of die eieren dan misschien van de eerste aanleg af in het dier aanwezig waren. Later verwierp hij deze preformistische veronderstelling, omdat hij niet aan kon nemen, dat de eieren of kiemen waaruit de zaaddiertjes zouden voortkomen na 16 jaar van inactiviteit nog

in leven konden zijn. Eerder was hij geneigd te geloven, dat zodra de levende zaaddiertjes bij mens of dier aanwezig zijn, tevens de lust tot paring zou ontstaan.

De functie van zaaddiertje en ei

Ook met betrekking tot de functie van de zaaddiertjes dacht Van Leeuwenhoek aanvankelijk sterk in preformistische richting. In zijn brief van november 1677 meende hij in de zaadvloeistof duidelijk aderen, vaten en zenuwen waar te nemen. Ruim 20 jaar later zal hij elke opvatting dat in het mannelijk zaad structuren waargenomen kunnen worden die wijzen op het toekomstige organisme, verwerpen, en hij verwierp daarmee tegelijkertijd de preformatieleer. Hij vatte zijn verandering van mening samen in de volgende zin: 'Ik geloofde vast, dat in geen enkel menselijk lichaam dat volgroeid is, vaten bestaan, die ook niet reeds aangetroffen worden in gezond mannelijk teelzaad'.

Het feit dat Van Leeuwenhoek bij zoveel verschillende mannelijke dieren de zaaddiertjes gevonden had, bracht hem tot de overtuiging, dat deze diertjes de oorsprong moesten zijn van het nieuwe individu. Hiermee plaatste Van Leeuwenhoek zich op het zogenaamde animalculistische standpunt en tegenover de ovisten, die aannamen dat het ei de oorsprong was van de nieuwe generatie. De ovisten waren tot deze overtuiging gekomen, doordat zij er nooit in geslaagd waren na de paring zaad in de baarmoeder aan te tonen.

Het was in die tijd een groot raadsel, hoe het beginsel der beweging en dus van het leven, op het ei werd overgebracht en men nam daarom vaak een 'saadlugt' aan, die dit 'contactum vitalum' zou bewerkstelligen. Na de ontdekking der spermatozoën lag het in deze lijn van denken voor de hand, het zaaddiertje te beschouwen als een soort vervoermiddel van deze 'saadlugt'.

Van Leeuwenhoek ging tegen deze mening in en ter ondersteuning van zijn standpunt besloot hij in 1678, en weer in 1683 een eigen onderzoek in te stellen. Hij wendde zich daarbij in eerste instantie tot een onderzoek van de eierstokken. Wij moeten daarbij erop verdacht zijn, dat wat men in die tijd eieren noemde, thans Graafse follikels genoemd worden. De werkelijke eicel werd eerst in de 19e eeuw door von Baer ontdekt. Bij zijn onderzoek, vooral bij schapen en koeien, kwam Van Leeuwenhoek tot de conclusie, dat het ene ei veel groter

was dan het andere, dat sommige geel waren en andere rood en dat de grootste eieren, die naar hij aannam tevens de rijpste moesten zijn, uit klierachtige delen bestonden, doorlopen met bloedvaten en vast in vliezen besloten en hij kon zich niet voorstellen, dat men aan deze eieren zo veel eigenschappen heeft kunnen toeschrijven.

Op grond van deze waarnemingen keerde Van Leeuwenhoek zich in zijn brief van 30 maart 1685 nogmaals met kracht van argumenten tegen de ovisten en wel op grond van enkele grandiose experimenten, waarmee hij aantoonde, dat het mannelijk zaad wel degelijk in de baarmoeder wordt gestort. Hij nam daartoe een loopse teef, liet het dier enkele malen dekken en daarna afmaken. Nader onderzoek van de geslachtsorganen bracht aan het licht, dat zich in de schede slechts wat slijm bevond, doch dat de tuba en baarmoeder geweldige hoeveelheden zaaddiertjes bevatten. Vervolgens haalde Van Leeuwenhoek er een vooraanstaand anatoom bij, vermoedelijk Cornelis 's-Gravenzande, de man die de anatomische demonstraties verzorgde die Van Leeuwenhoek regelmatig volgde, om hem te laten zien wat hij gevonden had en die was het, volgens Van Leeuwenhoek, geheel met hem eens. Uit het feit dat er in de schede geen, of nagenoeg geen, zaaddiertjes gevonden werden (er blijven er altijd wel enkele achter bij het terugtrekken van de penis), concludeerde Van Leeuwenhoek, dat de baarmoeder geschapen is, niet alleen om het zaad te ontvangen en te voeden, maar dat zij het zaad bovendien vasthoudt, doordat zij zich na de copulatie sluit. Vervolgens wees Van Leeuwenhoek erop, dat het mannelijk lid bij de verschillende dieren zodanig gebouwd is, dat het resultaat van de copulatie is, dat het zaad in de baarmoeder terecht komt.

Van Leeuwenhoek vervolgde zijn onderzoekingen over de betekenis der zaaddiertjes bij het konijn als proefdier, waarvan hij in dezelfde brief van 30 maart 1685 verslag uitbracht. Bij een eerste konijn onderzocht hij de baarmoeder ongeveer een kwartier nadat het dier gedekt was en hij vond vooral bij de ingang van de baarmoeder vele zaaddiertjes. Naar Van Leeuwenhoek veronderstelde, was er nog niet genoeg tijd verlopen voor de zaaddiertjes om de gehele baarmoeder te doorkruisen. Hij nam toen de baarmoeder eruit, verpakte haar in een doosje en stak dat in zijn zak, teneinde al te grote afkoeling te voorkomen. Zes uur later zette hij zijn waarnemingen voort en vond toen, dat de zaaddiertjes verder waren opgerukt in de hoorns van de baarmoeder, terwijl er in de vagina nog steeds geen spermatozoën te ont-

dekken waren.

Een tweede konijn werd door Van Leeuwenhoek onderzocht 6 uur nadat de copulatie had plaats gevonden en hierbij vond hij inderdaad de zaaddiertjes door de gehele baarmoeder verspreid. Een derde konijn, tenslotte, werd door hem onderzocht 48 uur na de copulatie. Bij dit dier vond Van Leeuwenhoek nog slechts enkele zaaddiertjes in leven in de hoorns der baarmoeder. Uit modern onderzoek weten we, dat de spermatozoën inderdaad slechts ongeveer twee dagen in leven blijven in het genitale apparaat van het wijfjeskonijn.

Essentieel voor Van Leeuwenhoek was evenwel, dat hij noch in een der konijnen, noch in de teef ook maar een spoor van een ei kon ontdekken. Dit was een nieuw en in zijn ogen een sterk argument tegen de ovisten. Van Leeuwenhoek was geenszins verwonderd over dit resultaat want, aangenomen dat de grootste 'eieren' tevens de rijpste zijn, kon hij zich niet voorstellen, dat zulke eieren door zo'n nauw kanaaltje als de tuba fallopia zouden afdalen via een kronkelig buisje, temeer daar bij een hond of konijn er meerdere eieren tegelijk door moeten, want als regel brengen zij meerdere jongen tegelijk voort. Bij dit alles moet men er steeds op bedacht zijn, dat Van Leeuwenhoek, zoals trouwens al zijn tijdgenoten, de Graafse follikels voor eieren aanzag. Tenslotte vermeldde Van Leeuwenhoek nog als extra argument, dat, hoewel de door hem onderzochte hond zeer tot paring bereid was, hij geen grote 'eieren' in de eierstokken had kunnen vinden, evenmin als bij een tweede teef die hij had onderzocht.

Enkele volgende problemen waar Van Leeuwenhoek zich voor gesteld zag waren: waarom en hoe neemt het zaaddiertje een eivorm aan als het in de baarmoeder is? Zijn opvattingen hierover zijn gebaseerd op een tweetal analogieën: De eerste is, dat zaaddiertjes hun staart zouden verliezen, net als dat bij kikkerlarven gebeurt bij de metamorfose. Van Leeuwenhoek dacht dat de staart daarbij gewoon afviel; wij weten dat hij door fagocytose verwijderd wordt. De tweede analogie is, dat het zaaddiertje als geheel zou vervellen, zoals bijvoorbeeld een vliegenlarve die tot vlieg wordt. Maar aangezien geen dier van huid verwisselt zonder dat er reeds van te voren een nieuwe huid ontstaan is, vergeleek hij zo ongeveer de nageboorte met het tonnetje dat insekten met een volledige metamorfose achterlaten.

Een ander probleem was: waarom zijn er zo veel zaaddiertjes en zo weinig embryo's. Ook hier neemt Van Leeuwenhoek zijn toevlucht tot een analogie. Een appelboom, zegt hij, kan wel 100 jaar lang

appels hebben voortgebracht, zonder dat er één appelboom onder de oude boom opgroeit. Dit komt onder meer door de veelheid schaduw van de oude boom en door de dichtheid van de vegetatie die eronder groeit. Hetzelfde, stelde Van Leeuwenhoek zich voor, zou de situatie zijn in de baarmoeder: het zaaddiertje komt in een voor hem ondoordringbare wereld, waar maar weinig plekjes zijn om te groeien: het moet nu juist op een voedend adertje vallen, zoals het appelzaadje op een vruchtbaar, open stukje grond. En dat er ten slotte meestal maar één of weinig zaadjes ontkiemen is ook vergelijkbaar met de appelboom: ook al vallen er op één plekje meerdere zaadjes, er zal als regel toch maar één appelboom ontstaan.

Wat was dan wel precies de functie van het ei? Hierover is Van Leeuwenhoek expliciet in zijn brief van 30 maart 1685, waar hij zegt dat het ei slechts dient om "het dierken uijt den Haan, dat met een Levende siel besielt is, te onderhouden ende groot te maken"; met andere woorden het voedsel zou naar het diertje gaan en niet de levende ziel naar het voedsel. De baarmoeder zou in die zienswijze dan ook alleen maar dienen om "een of meer schepsels van de geene die in haar gestort zijn, te koesteren, te onderhouden, ende groot te maken".

Van Leeuwenhoek is enkele malen heel dicht bij de ontdekking der bevruchting geweest. De eerste maal in een brief van maart 1678, waarin hij veronderstelde, dat elk deeltje van de kuit zich zou verenigen met een deeltje van de hom van de vis, en wanneer zulks niet geschiedde, dat dan de eieren onvruchtbaar zouden blijven. De tweede maal was in zijn brief van 22 januari 1683, waar hij zich onder meer bezig hield met de voortplanting der kikkers. Hij nam hierbij scherp en juist waar, dat bij de paring het mannetje weliswaar op het wijfje zit, maar dat het mannetje geen penis heeft en dat wanneer het vrouwtje haar eieren gaat afzetten, het mannetje tegelijkertijd zaad schiet, net als bij de vissen. Voorts voegde Van Leeuwenhoek hieraan toe, dat de bevruchting slechts plaats kan hebben, wanneer het kiemvlekje 'het plaatsje of stiptie van het doir van het eij' door een zaaddiertje wordt bereikt, een opvatting die volkomen juist gebleken is, evenals zijn veronderstelling, dat de kikkers en de vissen enorme hoeveelheden zaaddiertjes voortbrengen ten einde de waarschijnlijkheid te vergroten dat zo'n diertje het kiemvlekje inderdaad bereikt. Van Leeuwenhoek berekende, dat er bij de kikker ca. 10 000 zaaddiertjes zijn op één ei. De derde maal dat Van Leeuwenhoek heel dicht bij de oplossing van het bevruchtingsvraagstuk was, was in deze zelfde brief,

waarin bij beschreef, dat hij verscheidene malen gepoogd heeft het zaad van de haan terug te vinden in de dooier van de kip. Dat is hem evenwel niet gelukt als gevolg van het grote aantal 'globulen' waaruit de dooier bestaat. Ook trachtte hij het zaaddiertje terug te vinden in het ei van de vlo en de luis, maar ook dat is hem niet gelukt. De eerste die erin slaagde de weg van het zaaddiertje in het kikkerei te volgen was O. Hertwig in 1875, maar dat gebeurde met bepaalde kleuringstechnieken.

Deze beschouwingen mogen U een beeld geven van Antoni van Leeuwenhoek als waarnemer, als experimentator en ook als wetenschappelijk denker. Slechts weinig moderne biologen zullen zich ooit gerealiseerd hebben, welk een wonderlijk en erudiet man zo'n 300 jaar geleden leefde en welke moderne opvattingen hij er eigenlijk reeds op na hield.

Het zichtbaar maken van micro-organismen

N. NANNINGA

Inleiding

Wanneer men zegt dat het zien van bacteriën door Antoni van Leeuwenhoek in 1683 mogelijk is gemaakt door een uitstekende microscoop (bestaande uit één lens), dan is dit maar ten dele waar. Belangrijker lijkt mij de onbevooroordeelde houding van een onderzoeker die in staat is het nieuwe, zoal niet volledig te verklaren, dan toch te onderkennen. Terugziende in de tijd mogen we aannemen dat de wetenschappelijke houding tegenover het biologische voorwerp in wezen niet is veranderd, maar wel de methode van waarnemen. Bij eerste benadering zal men de oorzaak van de veranderde werkwijze

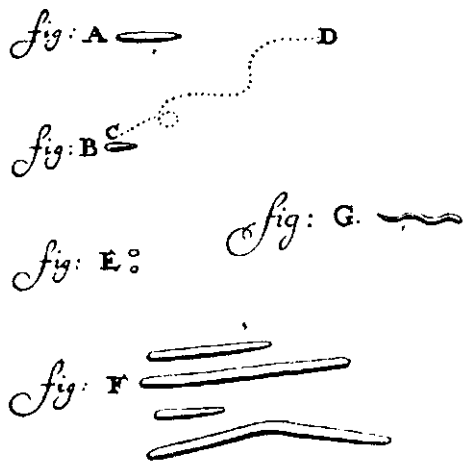


Fig. 1. Eerste tekeningen van bacteriën van Antoni van Leeuwenhoek; Brief no. 76, 17 september 1683. Voor een interpretatie zij verwezen naar Dobell (1932).

willen zoeken in de ontwikkeling van het optische apparaat. Minstens even ingrijpend was echter het ontwikkelen van prepareertechnieken om het gebruik van de moderne apparatuur mogelijk te maken.

Een hoogtepunt in het werk van Antoni van Leeuwenhoek is ongetwijfeld het zien van micro-organismen (fig. 1). In het nu volgende zal ik daarom vooral aandacht besteden aan het zichtbaar maken van bacteriën, en wel in historisch perspectief. Hierbij heeft de elektronenmicroscoop de belangrijkste rol gespeeld, terwijl de stand van kennis van de prepareertechniek, zoals reeds opgemerkt, de beperkende factor was. Een historische benadering zal tevens het resultaat kunnen hebben dat de toegang tot de technische achtergronden van een elektronenmicroscopische opname gemakkelijker wordt gemaakt.

Voorwaarden waaraan een elektronenmicroscopisch preparaat moet voldoen

Daar de achtergronden van elektronenmicroscopische prepareermethoden minder bekend zijn dan die van lichtmicroscopische, wil ik mij beperken tot de eerste. Allereerst een beknopte beschrijving van de situatie in een elektronenmicroscoop. Zoals bekend bewegen de van een elektronenkanon afkomstige elektronen zich door een vacuüm naar het voorwerp. De door de elektromagnetische lenzen bepaalde baan van de elektronen wordt verstoord zodra ze in het voorwerp terecht komen. De verstoring wordt met behulp van andere elektromagnetische lenzen in sterk vergrote vorm op een voor elektronen gevoelig fluorescerend scherm geprojecteerd. Twee extreme gevallen komen voor: de elektronen gaan ongestoord door, met als gevolg het oplichten van het scherm; of de elektronen worden afgebogen en bereiken het scherm niet: het scherm licht dan niet op. De bedoeling is dat verdeling van licht en donker op het scherm zodanig is dat een betrouwbaar (en vergroot) beeld van het voorwerp wordt verkregen. Ook is het duidelijk dat het voorwerp niet te dik mag zijn, daar anders te weinig elektronen het scherm bereiken.

Deze overwegingen leiden ons naar drie voorwaarden waaraan het preparaat moet voldoen: (1) het moet stabiel zijn in het vacuüm, (2) het moet de elektronen differentieel verstrooien (contrast), (3) het moet voldoende klein zijn. Hiermede zijn meteen ook de technische complicaties aangegeven.

Punt 1 houdt in dat het object watervrij moet zijn: een zeer on-

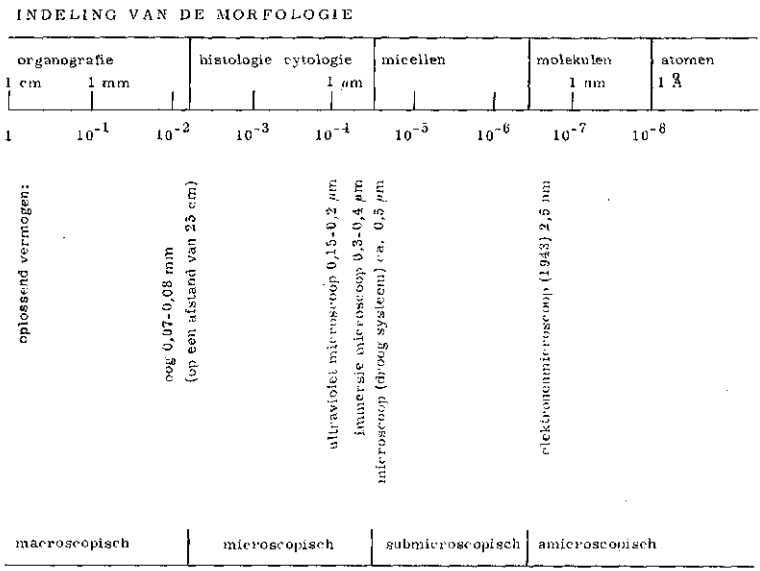


Fig. 2. Indeling van de morfologie volgens Frey-Wyssling (1953). De term micel zouden we nu willen vervangen door celorganel en macromolekuul.

natuurlijke toestand voor een biologisch voorwerp. Punt 2 vereist het selectief toevoegen van zware elementen zoals osmium, uranium of platina, daar in biologische voorwerpen (vooral bestaande uit C, H, O en N) te weinig verstrooiing optreedt. Punt 3 houdt in dat men het voorwerp letterlijk klein moet zien te krijgen wanneer het dit van nature nog niet is, zoals wel het geval is met virussen. In dit verband is het zinvol ons te realiseren met welke dimensies we in de elektronenmicroscopie te maken hebben. In fig. 2 is een klassiek schema gereproduceerd van Frey-Wyssling (1953), dat enerzijds de dimensies aangeeft van structuren die met de lichtmicroscoop en de elektronenmicroscoop bestudeerd kunnen worden, en anderzijds de submicroscopische morfologie als eèn zelfstandig onderzoeksgebied vastlegt. Voor het verloop van het verdere betoog is het nodig in het kort in te gaan op de ultrastructuur (submicroscopische morfologie) van de bacterie.

Ultrastructuur van de bacterie

Het beeld dat hier van de bacterie ontworpen wordt is voornamelijk

gebaseerd op de coupe-techniek, dat wil zeggen op het beeld zoals zich dat in de zestiger jaren heeft ontwikkeld en zoals het ook nu nog aanvaard wordt. Voor een afgrenzing van de bacterie als prokaryoot tegenover de eukaryoot zij verwezen naar Van Iterson (1970) en naar James (1974).

Het is goed ons te realiseren dat de bacterie geen verkleinde eukaryote cel is (Van Iterson, 1966). De (macro-)molekulen die beide celtypen samenstellen zijn echter even groot en bijvoorbeeld de membranen zijn dan ook vrijwel even dik. De afmetingen van de bacterie kunnen we ons het gemakkelijkst voorstellen door vergelijking met het mitochondrion.

De beschrijving van de ultrastructuur zal ik toespitsen op een grampositieve (*Bacillus subtilis*) en een gram-negatieve bacterie (*Escherichia coli*). Beide organismen behoren tot de meest 'gebruikte' in de biologie. Wel is de fysiologische en structurele verscheidenheid in de bacteriën zeer groot. Verder kunnen binnen één en dezelfde soort ingrijpende veranderingen optreden wanneer de groeiomstandigheden worden gewijzigd. Het wetenschappelijk onderzoek hieromtrent is nog betrekkelijk jong. Een geschematiseerd beeld van de ultrastructuur van de bacterie is weergegeven in fig. 3.

Bacillus subtilis

Het nucleoied (kernequivalent), dat de erfelijke informatie bevat, ligt in het centrum van de cel. Het is niet omgeven door een membraan, noch bevat het histonen zoals de eukaryote kern. Het nucleoied omvat in zijn eenvoudigste vorm, dat wil zeggen wanneer het zich niet verdubbelt, een DNA-draad van ongeveer 1 mm lengte. Het is ons niet bekend hoe een dergelijke lange draad in een nucleoied met een diameter van ongeveer 0,5 μm bijeengehouden wordt. Het nucleoied (DNA) is direct omgeven door groepen ribosomen (polysomen) die de erfelijke informatie uit het DNA ontvangen en in eiwitten vertalen. Het geheel van nucleoied en cytoplasma (voornamelijk polysomen) is omgeven door een celmembraan. De laatste is op zijn beurt bedekt met een celwand die star is en een nog niet opgehelderde rol speelt bij de handhaving van de bacteriële celvorm. Uitwendig vindt men onder meer flagellen die een taak hebben bij de voortbeweging. Onder sommige preparatieve omstandigheden kan de celmembraan zich instulpen, waarbij een membraneus lichaam (mesosoom) ontstaat. Functie

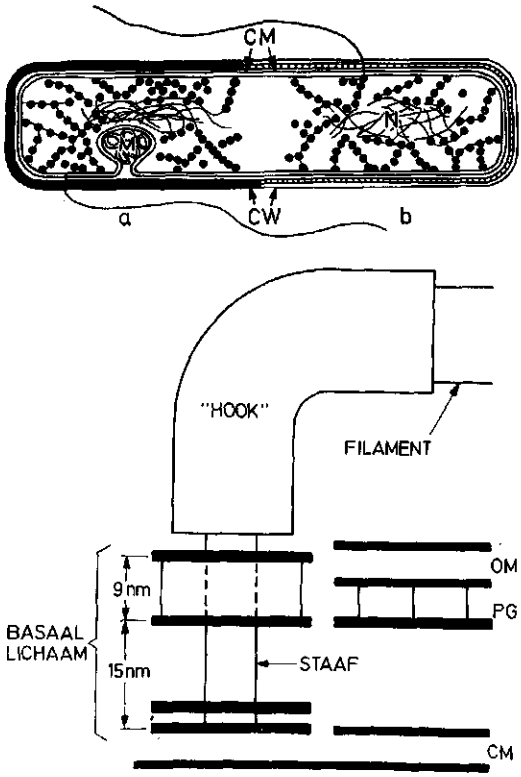


Fig. 3. Boven: schematische weergave van de bacteriestructuur gebaseerd op de coupetechniek. a. Een gram-positieve bacterie (Bacillus subtilis). *In het midden van de cel bevindt zich het nucleoied (fibrillaire structuur), bestaande uit het opgevouwen DNA. Het nucleoied staat in direct contact met het cytoplasma, dat voornamelijk bestaat uit aan elkaar geregen ribosomen (zwarte bolletjes), polysomen genaamd. Het geheel van nucleoied en cytoplasma wordt omgeven door de celmembraan (CM), die in gram-positieve bacteriën ingestulpt kan zijn (M, mesosoom). De celmembraan wordt bedekt door de celwand (CW). b. Een gram-negatieve bacterie* (Escherichia coli). *In* E. coli *heeft de celwand een gecompliceerde structuur (zie ook fig. 3, onder en fig. 10c). Aan de celmembraan en de celwand zijn de flagellen vastgehecht (vergelijk met fig. 3, onder). N: nucleoied.*
Fig. 3. Onder: structurele relatie van de flagel met de cel-envelop. Het voorbeeld slaat op E. coli. *CM, celmembraan: PG, peptidoglycaan; OM, buitenste membraan ('outer membrane').*

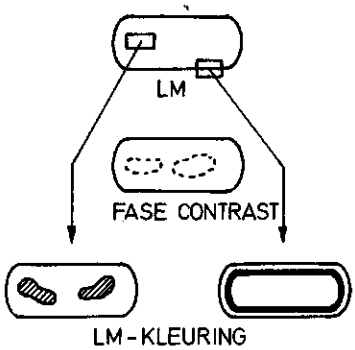


Fig. 4. Schematische weergave van cel-envelop en nucleoied zoals zichtbaar in de lichtmicroscoop (vergelijk met fig. 6, resp. fig. 12).

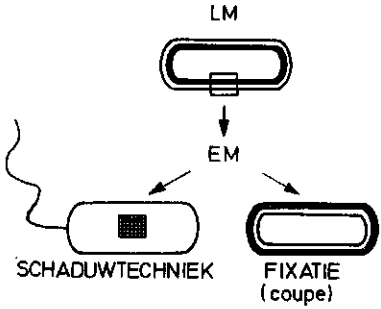


Fig. 5. Vergelijking van de lichtmicroscopie (LM) met de elektronenmicroscopie (EM). Aanvankelijk konden kleine uitwendige structuren zichtbaar gemaakt worden met behulp van de schaduwtechniek. Voorbeelden zijn een flagel (zie fig. 5, links onder en fig. 7) en een regelmatige structuur in de celwand (zie fig. 5, links onder en fig. 8). Met behulp van de coupetechniek kan binnen in *de bacterie worden gekeken, zodat de gelaagde structuur van de cel-envelop zichtbaar wordt (zie fig. 5 rechts onder en fig. 3 boven).*

en cytologische status van het mesosoom zijn twijfelachtig (Nanninga, 1973).

Escherichia coli

Hoewel de ultrastructuur van *Escherichia coli* lijkt op die van *B. subtilis*, zijn er niettemin een paar verschillen. In de eerste plaats is de

celwand gecompliceerder van bouw, en in de tweede plaats ontbreken mesosomen. Het verschil in celwandsamenstelling wordt weerspiegeld in het verschillend gedrag van *B. subtilis* en *E. coli* met betrekking tot de gram-kleuring.

Historische benadering

Twee aspecten van de bacteriële structuur heb ik uitgekozen voor een schetsmatige beschrijving van de ontwikkelingen der techniek, te weten de cel-envelop en het nucleoied. Telkens zal hierbij de lichtmicroscopie als punt van uitgang worden genomen (fig. 4 en 5).

Cel-envelop

De cel-envelop bestaat uit celwand en celmembraan. Van de laatste weten we uit de elektronenmicroscopie dat de dikte ongeveer 7 nm bedraagt; als zodanig is hij in de lichtmicroscoop onzichtbaar. Na toepassing van een kunstgreep, namelijk het in ether brengen van de cel, laat de celmembraan los van de celwand en is dan als grensvlak te kleuren (fig. 6). De celwand kan (althans bij gram-positieve bacteriën) enige tientallen nm dik zijn en is daarom direct zichtbaar te maken. Toch is de voortgang vergeleken met tekeningen van Antoni van Leeuwenhoek niet indrukwekkend.

Wenden we ons nu tot de elektronenmicroscopie, waarbij we, zoals reeds is opgemerkt, ons rekenschap moeten geven van de preparatieve eisen. Aanvankelijk ontbraken methoden om biologische voorwerpen klein te maken. Men was daarom aangewezen op reeds van nature kleine structuren, zoals virussen en bacteriën, en het is dan ook niet toevallig dat aanvankelijk vele publikaties juist op dit gebied zijn verschenen.

Het contrastprobleem werd in de veertiger jaren opgelost door de ontwikkeling van de schaduwtechniek. Hierbij wordt een zwaar metaal zoals platina in een vacuümklok verdampt. Het metaal hoopt zich op aan de zijde waar het zware metaal verdampt, terwijl achter het object nauwelijks iets terechtkomt. Dit veroorzaakt een schaduweffect waardoor het ontstane beeld (na fotografische omkering) een zeer plastische indruk geeft. Het morfologisch onderzoek moest zich evenwel beperken tot uitwendige structuren, daar de coupe-techniek, zoals toegepast in de lichtmicroscopie voor bacteriën, veel te grof was. Uit-

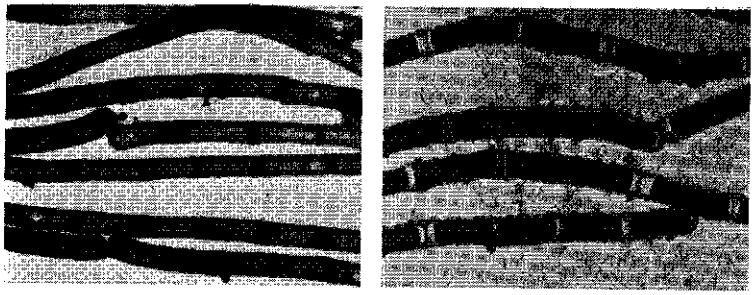


Fig. 6. Lichtmicroscopische opname van de cel-envelop van Bacillus *M gefixeerd met Bouins fixatief, dan behandeld met $HgCl_2$ en daarna gekleurd met Victoria blauw B. De celmembraan is selectief gekleurd. Dit is het beste te zien in de rechter figuur, waar de protoplast gekrompen is als gevolg van behandeling met ether. Robinow & Murray, 1953; Murray, 1960.*

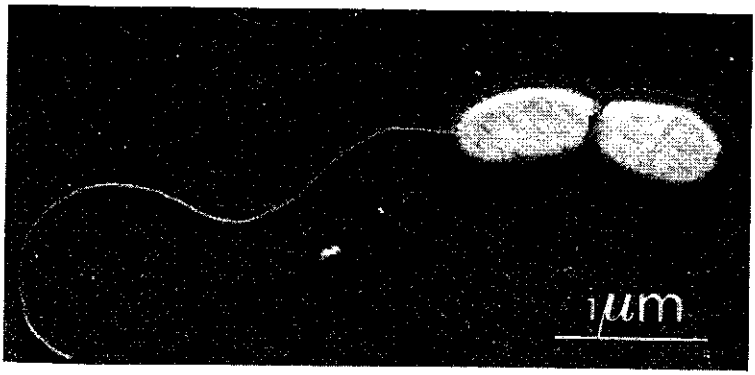


Fig. 7. Opname van Vibrio metchnikovii *na toepassing van de schaduwtechniek. Van Iterson, 1951; de opname dateert van 1947.*

wendige structuren die zichtbaar gemaakt konden worden, waren dus noodzakelijkerwijs celwanden en flagellen (fig. 7). In het eerste geval was alleen iets waar te nemen indien een regelmatige structuur aanwezig was, zoals bij *Spirillum serpens* (fig. 8). Bij *B. subtilis* en *E. coli* was door het ontbreken van dergelijke structuren niets te zien. Pas in het begin van de zestiger jaren leerde men als routine ultradunne coupes te snijden, die het mogelijk maakten structuren te onderscheiden zoals beschreven in de sectie Ultrastructuur van de bacteriecel.

Uitgangspunt bij de coupe-techniek is biologisch materiaal dat in-

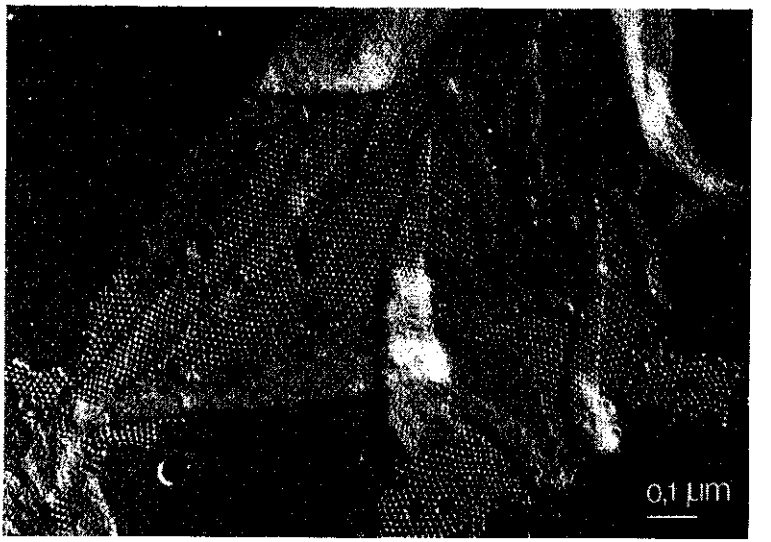


Fig. 8. Fragment van een geschaduwde celwand van Spirillum *sp. Houwink, 1953.*

gebed is in hard plastic, waarvan ultradunne plakjes (in de orde van 60 nm) worden gesneden. Dan is aan de eis voldaan dat het object klein is. Hoe zit het nu met het watervrij maken (vacuüm in de elektronenmicroscoop) en het contrast? Voordat het object in de aanvankelijk vloeibare plastic wordt opgenomen, is het watervrij gemaakt met een organisch oplosmiddel, zoals aceton. Een vereiste is dat het organische oplosmiddel mengbaar is met de vloeibare plastic. Anderzijds moet het object door fixatie beschermd worden tegen de desastreuze inwerking van aceton. Het is mogelijk dat het object zodanig gefixeerd wordt dat bescherming tegen het inbedden in plastic gepaard gaat met toevoegen van zware elementen (contrast). Het bekendste fixatiemiddel is een oplossing van osmiumtetroxide.

De informatie die met behulp van de coupe-techniek van de celenvelop wordt verkregen, is beperkt; zoals blijkt uit fig. 3 krijgen we parallel verlopende lijnen te zien. Celmembranen zien er in het algemeen gelijk uit: achtereenvolgens een donkere lijn (elektronenverstrooiend), een lichte lijn (elektronendoorlatend), en tenslotte nog een donkere lijn. De dikte is in de orde van 7 nm, en de opvatting heeft post gevat dat membranen van verschillende herkomst op gelijke wijze

zijn opgebouwd. Een dergelijke eenheidsstructuur bestaat niet voor de celwand. De wanden van gram-positieve en gram-negatieve bacteriën verschillen aanzienlijk in structuur; de wand van een plantecel is echter nog weer ingewikkelder.

Het enigszins saaie beeld dat wij met behulp van de coupe-techniek van de celmembraan krijgen is recentelijk aanzienlijk verlevendigd door de invoering van de vriesbreektechniek (Moor et al., 1961; fig. 9). Met deze techniek is het mogelijk een driedimensionale afbeelding van het membraan te maken zonder dat het watervrij gemaakt behoeft te worden met een organisch oplosmiddel. De werkwijze is als volgt. Het biologische object wordt in fracties van een seconde ingevroren. Het invriezen moet snel gebeuren om de grootte van de ijskristallen

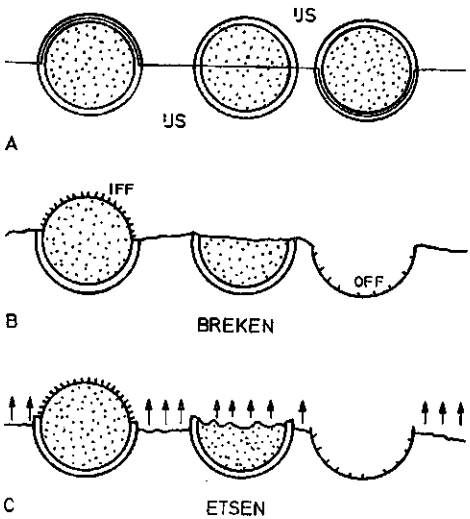


Fig. 9. Vriesbreektechniek. A. Drie biologische structuren, omgeven door een membraan, zijn ingevroren bij ongeveer –150°C. De getrokken zwarte lijn geeft het mogelijke verloop van het breukvlak aan. B. Het preparaat is gebroken (–100°C). Afhankelijk van de plaats van breken worden bepaalde celstructuren blootgelegd. Membranen worden gespleten: we kijken nu in het membraan. Van het oppervlak wordt onmiddellijk na het breken een metaal/koolstof afdruk gemaakt bij –100°C. C. Aanvullende informatie verkrijgt men als men ijs direct in dampvorm doet overgaan (sublimatie, etsen). Hiertoe wordt het opdampen van het metaal enige minuten uitgesteld. Breken en opdampen vinden plaats in een vacuümklok. IFF, 'inner fracture face'; OFF, 'outer fracture face'.

in de hand te houden. Zijn ze te groot, dan worden de biologische structuren tijdens het invriezen vervormd. In het geval van bacteriën wordt meestal een geconcentreerde suspensie, een druppeltje ter grootte van een speldeknop, ingevroren. Het druppeltje wordt in bevroren toestand doormidden gebroken (vriesbreken). Het ontstane breukvlak levert gebroken bacteriën op die liggen temidden van gebroken ijskristallen. Met behulp van de besproken schaduwtechniek (zie boven) wordt van het reliëf van het breukvlak een zeer dunne afdruk gemaakt. De afdruk bestaat uit metaal en koolstof, en voldoet aan de reeds eerder vermelde voorwaarden: watervrij (alleen metaal en koolstof), contrastrijk (het opgedampte metaal), en klein (de afdruk is zeer dun).

Van belang is nu de wijze waarop de breuk door het biologische object loopt (fig. 9). Deze blijkt niet willekeurig te zijn. Er zijn twee mogelijkheden: (1) de breuk loopt dwars door het object heen; in dit geval vertoont het beeld gelijkenis met dat van de coupe, en de celcomponenten zijn op vergelijkbare wijze in de cel gerangschikt; (2) membranen worden gespleten. Deze voorkeursrichting van de breuk heeft tot gevolg dat we *in* het membraan kunnen kijken.

Daar celmembranen sterk gebogen zijn, krijgen we zowel een hol als een bol oppervlak, die bij benadering elkaars complement zijn. Hebben we met een natuurlijk membraan te maken, dat wil zeggen een membraan dat eiwitten bevat, dan zien we partikels op de membraanoppervlakken. Een nog niet verklaard verschijnsel is dat de bolle oppervlakken meestal meer partikels bezitten dan de holle.

Een aanvullend aspect is dat we het ijs kunnen laten sublimeren (etsen), zodat het reliëf wat duidelijker wordt. Het etsen is niet mogelijk met de membraanoppervlakken omdat in het inwendige van het membraan geen ijs voorkomt. De vriesbreek-techniek is dus een unieke methode om experimentele veranderingen *in* membranen te bestuderen.

Ten aanzien van de celwand ligt de situatie anders. In het algemeen komen alleen dwarsbreuken voor, tenzij de celwand een structuur bevat die vergelijkbaar is met een membraan, dat wil zeggen in een dubbellaag gerangschikte lipiden. Dit laatste treedt op bij de celwand van *E. coli*, namelijk in de zogenaamde buitenste membraan (fig. 3, onder).

Als voorbeeld is opgenomen de cel-envelop van *E. coli* (fig. 10). Hier komen twee breukvlakken voor: één in de celmembraan (CM)

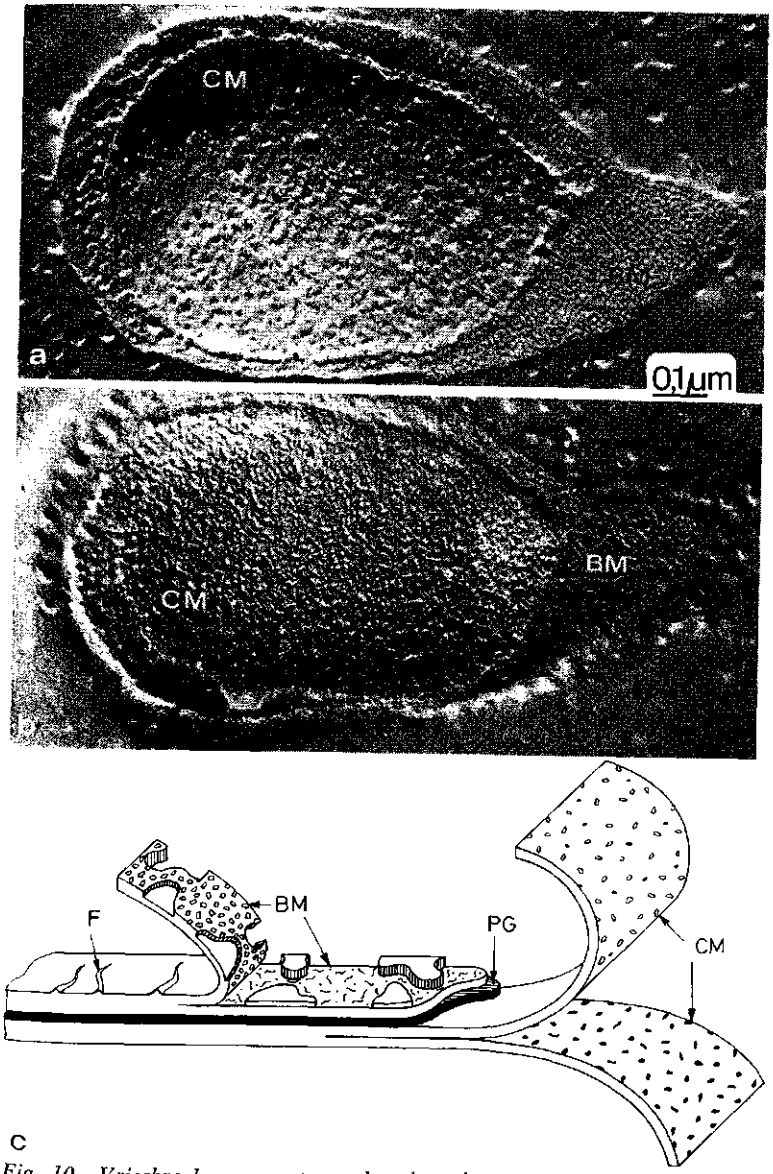


Fig. 10. Vriesbreek-preparaat van de celwand van E. coli. *CM = celmembraan; BM = buitenste membraan; F = flagel; PG = peptidoglycaan-laag.*

en één in de buitenste membraan van de celwand (BM). *B. subtilis* heeft geen breukvlak in de celwand. Figuur 10 toont de twee aspecten (hol en bol) van de breukvlakken aan een en dezelfde cel. Fig. 10a is complementair aan fig. 10b, dat wil zeggen na het breken is niet, zoals gebruikelijk, het bovenste deel weggegooid, maar is het opgevangen. Van beide 'brokstukken' zijn tegelijk afdrukken gemaakt (complementaire-replicatietechniek). Fig. 10a toont het buitenste holle deel van de cel-envelop; fig. 10b het naar binnen gelegen complementaire bolle deel; fig. 10c de schematische weergave van de cel-envelop van *E. coli*. Eén breukvlak verloopt in de celmembraan (CM); het andere in de buitenste membraan (BM) van de celwand. Wat uiterlijke en chemische samenstelling betreft vertoont de buitenste membraan enige gelijkenis met de celmembraan. Het is echter de vraag of de term membraan (BM) wel goed gekozen is. De peptidoglycaan-laag (PG) wordt niet gespleten en is alleen als profiel zichtbaar. De buitenste membraan is soms gefragmenteerd (zie Van Gool & Nanninga, 1971).

Een bijzondere mogelijkheid is de combinatie van coupe-techniek en vriesbreek-techniek: coupes kunnen worden gemaakt van bacteriën die eerst met de vriesbreek-techniek gebroken zijn. Dit biedt een directe mogelijkheid om de uitkomsten van beide technieken met elkaar te vergelijken teneinde tot een zo betrouwbaar mogelijke interpretatie te komen (Nanninga, 1973).

Richten wij thans onze aandacht op het nucleoied.

Nucleoied

Verscheidene termen worden gebruikt om de structuur van het bacteriële genetische materiaal aan te duiden. Het valt buiten het kader van dit hoofdstuk om deze verwarrende situatie te bespreken, en we zullen ons beperken tot het gebruik van de term nucleoied.

Wanneer we weer met de lichtmicroscopie beginnen, blijkt dat er een moeizame weg is afgelegd bij het op betrouwbare wijze zichtbaar maken van het nucleoied (fig. 11) (zie Murray, 1960). Variaties in technieken en in de fysiologische toestand van de bacteriën leverden geen ondubbelzinnig te interpreteren resultaten op. Een belangrijke technische vooruitgang was de aanpak waarbij het cytoplasmatische materiaal eerst afgebroken wordt, zodat daarna het gekleurde nucleoied duidelijk te onderscheiden is (fig. 12; zie ook Robinow, 1956). In dit kader dienen ook genoemd te worden de indrukwekkende fase-

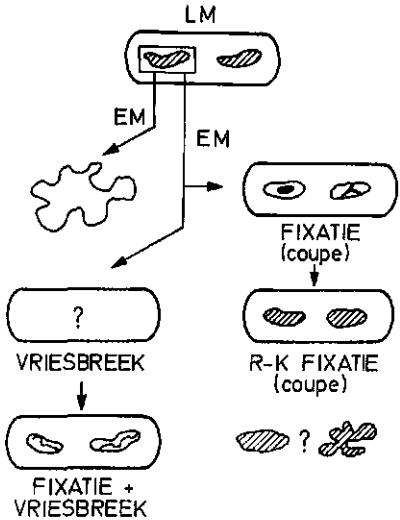


Fig. 11. Het zichtbaar maken van het nucleoied. De lichtmicroscopie is als uitgangspunt genomen (vergelijk met fig. 12). Rechts is weergegeven de structuur van het nucleoied in coupes. In het begin is het DNA samengeklonterd, terwijl met de invoering van de RK-fixatie het DNA een fijn fibrillair uiterlijk heeft (fig. 13). De uitwendige vorm van het nucleoied kan echter variëren, dat wil zeggen deze kan compact zijn of meer gelobd (zie fig. 14). Links is zichtbaar het DNA in geïsoleerde en gespreide vorm (zie fig. 15 en fig. 16). Daaronder het vriesbreekresultaat: het nucleoied is niet duidelijk waarneembaar, tenzij men eerst fixeert met osmiumtetroxide vóór het vriesbreken. Nanninga, 1973.

contrast opnamen van Mason & Powelson (1956). Toen men in het midden van de vijftiger jaren redelijke coupes van bacteriën voor elektronenmicroscopische doeleinden kon maken, waren gemakkelijk een of meer centrale gebieden in de bacterie waar te nemen. Deze werden in direct verband gebracht met de vroegere (en gelijktijdige) lichtmicroscopische waarnemingen. Een probleem vormde evenwel de ultrastructuur van deze gebieden. Het DNA was aanvankelijk zichtbaar als donkere eilandjes in een lichte omgeving, of ook wel in meer verspreide vorm (fig. 13). Toename in de voorkennis omtrent de DNA-structuur en een zorgvuldig afwegen van de onderdelen van de fixatieprocedure hebben geleid tot het accepteren van de zogenaamde Ryter-Kellenberger(RK)-procedure als de meest geschikte voor de weergave van het nucleoied. Deze techniek is toegespitst op de conservering

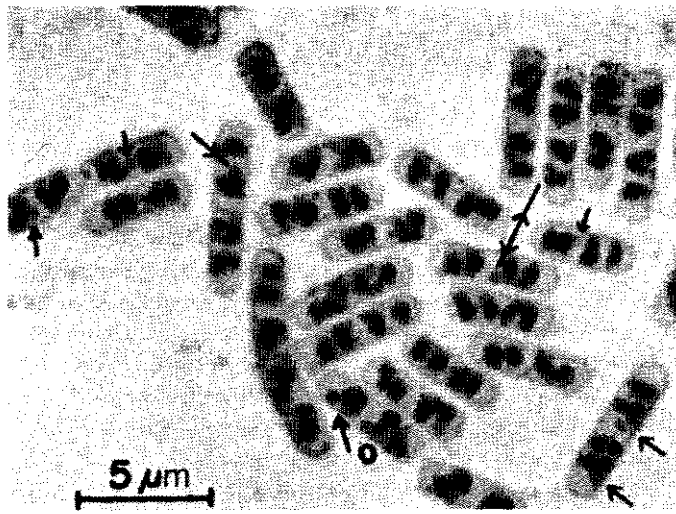


Fig. 12. HCl-Giemsakleuring van Bacillus cereus. *Het nucleoied is goed zichtbaar doordat het cytoplasma (RNA) eerst afgebroken is. De pijlen wijzen naar chromatinekorrels die tegen het nucleoied aanliggen. Het is onduidelijk wat deze korrels voorstellen op elektronenmicroscopisch niveau. Robinow, 1960.*

van het DNA, en andere cellulaire structuren zoals membranen zijn buiten beschouwing gelaten (Nanninga, 1973). Na toepassing van de RK-procedure blijkt het nucleoied te bestaan uit één fibrillaire massa.

In 1963 (Sabatini et al.) werd ingevoerd de glutaaraldehyde-voorfixatie, die in combinatie met osmiumtetroxidefixatie een 'voller' beeld geeft. Glutaaraldehyde zorgt vooral voor een betere conservering van de eiwitten. Toepassing hiervan op het nucleoied van *E. coli* geeft een ander resultaat dan osmiumtetroxide alleen. Alhoewel het DNA fibrillair van uiterlijk is, is de uitwendige vorm van het nucleoied meer gelobd (fig. 14). De vraag doet zich voor welke techniek (osmiumtetroxide, of glutaaraldehydefixatie gevolgd door osmiumtetroxide) het best de vorm van het nucleoied weergeeft (zie Woldringh, 1974). Dit is geen eenvoudig probleem. Punten van overweging zijn onder meer permeabiliteitsverandering van de celmembraan en selectiviteit van het fixatief. Dit kan als volgt worden toegelicht. Tijdens de fixatie met glutaaraldehyde wordt het cytoplasma gefixeerd, maar het is niet aan te nemen dat dit gebeurt met het nucleoied. Ook mogen wij ver-

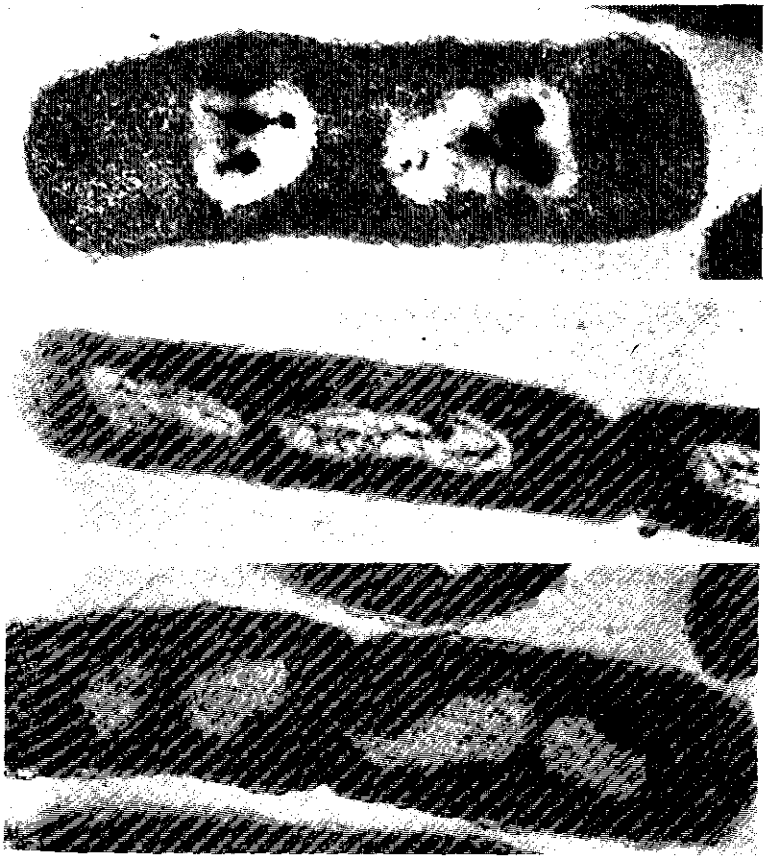


Fig. 13. Inwendige structuur van het nucleoied in Escherichia coli. *Zichtbaar zijn verschillende aggregatietoestanden van het DNA. Dit hangt af van de fixatiecondities. De onderste bacterie is behandeld volgens de Ryter-Kellenberger standaard fixatietechniek en geeft het optimale beeld weer na osmiumtetroxide-fixatie. Bron: Murray, 1960; de originele opnamen zijn van Ryter & Kellenberger, 1953. Bovenste figuur: 22 mm = 0,5 μm; onderste 2 figuren: 17 mm = 0,5 μm.*

onderstellen dat het medium waarin het DNA zich bevindt, verandert (tengevolge van de toename van de doorlaatbaarheid van de celmembraan); het DNA als polyanion is hier zeer gevoelig voor. Heeft deze situatie tot gevolg dat de uitwendige vorm van het nucleoied gaat ver-

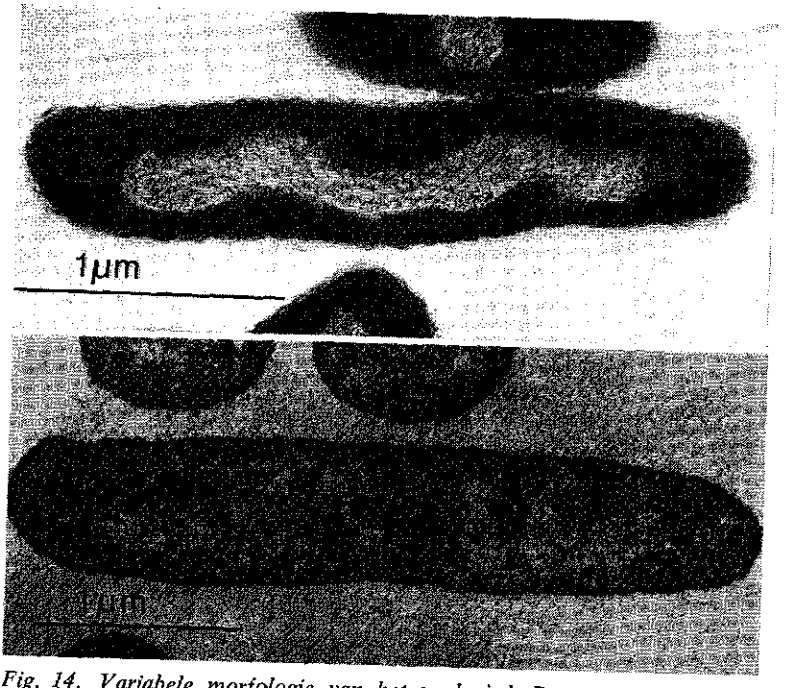


Fig. 14. Variabele morfologie van het nucleoied. Boven: een compacte vorm na de standaard Ryter-Kellenberger-fixatie. Onder: een verspreide vorm, verkregen wanneer de fixatie voorafgegaan wordt door een glutaaraldehyde-voorfixatie. Woldringh, 1974.

anderen? Blijft anderzijds de glutaaraldehydefixatie achterwege en wordt er direct met osmiumtetroxide gefixeerd, dan kan geargumenteerd worden dat onder andere door minder goede fixatie van het cytoplasma het nucleoied zich gaat samenballen.

Men zal zich afvragen of de vriesbreek-techniek (fig. 11) geen oplossing kan bieden. Dit blijkt tegen te vallen (Nanninga, 1973), want de textuur van het gebroken cytoplasma verschilt niet duidelijk waarneembaar van die van het waterrijke nucleoied. Het zou te ver voeren op dit actuele probleem dieper in te gaan. Naast de bepaling van de uitwendige vorm van het nucleoied hebben we ook te maken met de pakking van het DNA (een gesloten cirkel). Het heeft geen zin de draden in de coupes te vervolgen, niet omdat we ze niet goed kunnen zien, maar omdat ze tijdens de voorbehandeling veranderd zijn.

Een andere manier om het nucleoied te bekijken is het te isoleren. Normaal komt, wanneer men de bacterie openbreekt, het DNA als een stroperige massa naar buiten. Doet men de isolatie zeer voorzichtig en in aanwezigheid van 1 M NaCl, dan blijft het DNA bij elkaar en de viscositeit neemt nauwelijks toe. Het zo geïsoleerde nucleoied is zichtbaar te maken door het te laten diffunderen in een eiwitfilm. De eiwitfilm met daarin het gespreide DNA wordt opgevangen en al ronddraaiend geschaduwd met platina. Het ronddraaien zorgt ervoor dat de lange DNA draad vanuit alle richtingen wordt geschaduwd. Het sterke contrast en het feit dat de draad door eiwit omgeven is, maken dat het oorspronkelijk 20 nm dikke dubbelstrengs DNA gemakkelijk in de elektronenmicroscoop te zien is (fig. 15 en fig. 16). Een probleem is echter dat het molekuul zo groot is, dat het zeer moeilijk is er de weg in te vinden. Tot op heden is het nog een groot raadsel hoe dit grote macromolekuul in het nucleoied opgevouwen zit,

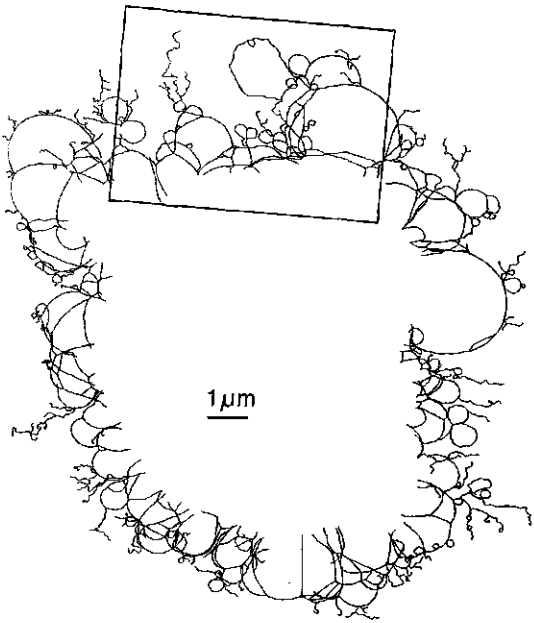


Fig. 15. Omtrek van het geïsoleerde en gespreide nucleoied van Escherichia coli. *Het netwerk zoals zichtbaar aan de rand zet zich op vergelijkbare manier voort tot in het midden. Een detail (rechthoek) is te zien in fig. 16.*

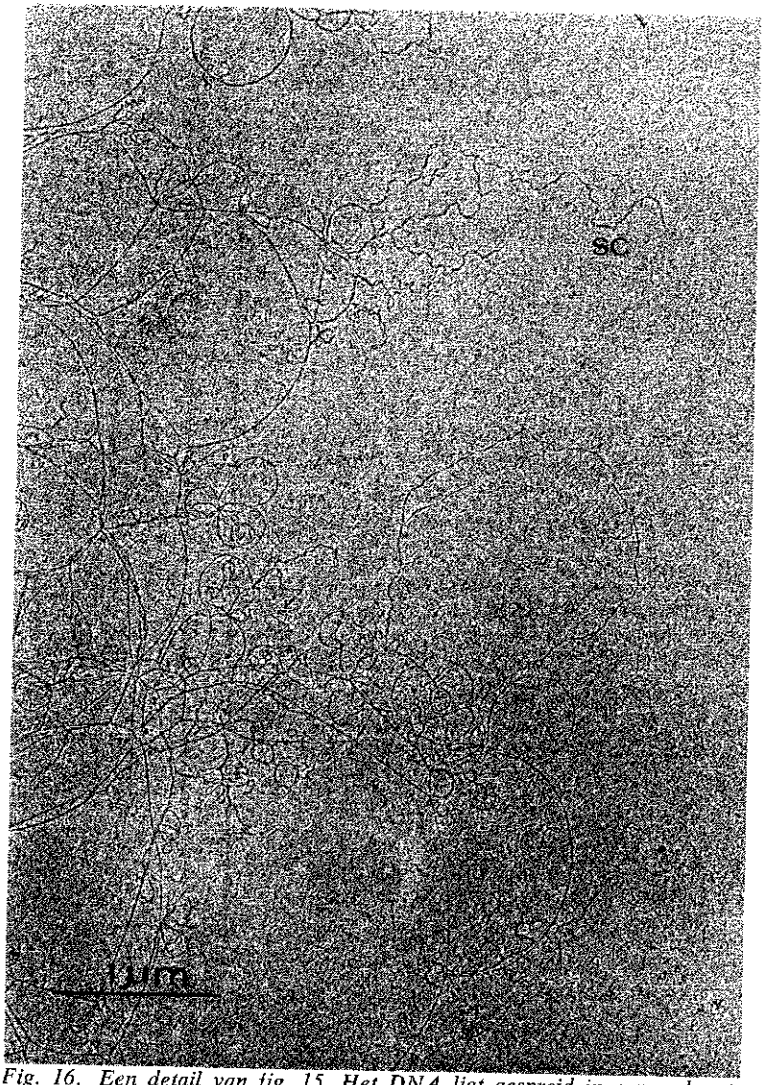


Fig. 16. Een detail van fig. 15. Het DNA ligt gespreid in een gedenatureerde eiwitfilm van cytochroom c (Kleinschmidt-techniek). Het DNA is dubbelstrengs. Plaatselijk zijn de dubbelstrengslussen in elkaar gedraaid ('super coil', SC). In het complex zijn geen vrije uiteinden te zien. Het complex wordt vermoedelijk bij elkaar gehouden door eiwit, RNA, en mogelijk membraanstukjes. Foto: M. Meyer & N. Nanninga.

en hoe het zich in de compacte ruimte kan verdubbelen (zie ook Worcel & Burgi, 1972).

Nabeschouwing

In het voorgaande is enigszins eenzijdig de nadruk gelegd op het aspect van het prepareren. Naar volledigheid heb ik hierbij niet gestreefd; zo is bijvoorbeeld de methode van de negatieve kleuring niet aan de orde gesteld. Natuurlijk moeten we ook niet voorbijgaan aan de toename van de kwaliteit van de elektronenmicroscoop. In de vijftiger jaren lag het oplossend vermogen in de orde van 4 nm, nu bedraagt het ongeveer 0,4 nm (fig. 17). Deze ontwikkeling heeft de verwachting gewekt dat steeds fijnere structuren zichtbaar gemaakt zouden kunnen worden. Deze verwachting is niet uitgekomen ten aanzien van biologische structuren, en het is de vraag of dit in de toekomst veel beter zal worden. Om te beginnen treden veranderingen in het preparaat op tijdens de voorbewerking. Vaak is niet bekend welke deze veranderingen zijn, alhoewel uit de aard van de voorbehandeling afgeleid kan worden dat ze zullen optreden. In de microscoop zelf kunnen ook verschillende dingen gebeuren: onderdelen van het object kunnen van plaats gaan veranderen, de massa kan verdwijnen of zelfs toenemen (verontreiniging).

Overigens hoeft het bovenstaande niet tot somberheid te leiden. Er is nog veel fundamenteel onderzoek te doen waarvoor het huidige technische niveau een ruimschoots voldoende basis is. In dit kader

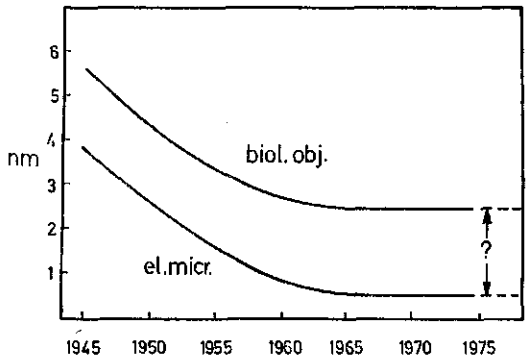


Fig. 17. Het oplossend vermogen van de elektronenmicroscoop en de afmetingen van het zinvol te interpreteren detail in het biologisch object.

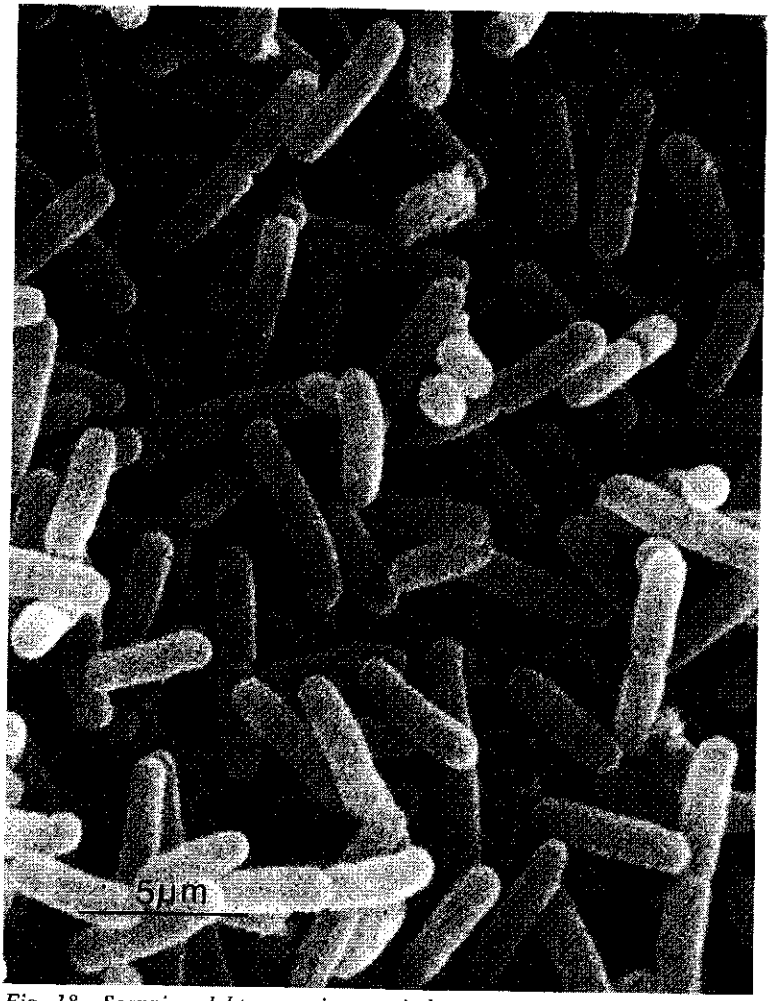


Fig. 18. Scanning-elektronenmicroscopische opname van Escherichia coli. *De cellen zijn geprepareerd met behulp van de kritische-puntmethode teneinde deformatie tijdens het drogen te voorkomen. Foto: C. Bakker & N. Nanninga.*

dient ook nog genoemd te worden de praktische ontwikkeling van de 'scanning'-elektronenmicroscoop, waarvan het concept nagenoeg even oud is als dat van de elektronenmicroscoop. Bij het laatste gaat het

om de wijze waarop de elektronen door het object gaan. Bij de scanning gaan de elektronen niet door het object heen, maar hebben we te maken met de secundaire elektronen, die door de opvallende elektronen losgemaakt worden wanneer ze het object aftasten. Men is daardoor gebonden aan het uitwendige van het object. Ten aanzien van bacteriën is de informatie die verkregen wordt nog beperkt (fig. 18). Een beter oplossend vermogen is inmiddels voor de toekomst wel te verwachten.

Wanneer we tenslotte weer terugkeren naar Antoni van Leeuwenhoek, dan kunnen we vaststellen dat er sedert 1683 enorm veel is veranderd. Wat echter gebleven is, is de met name in de 17e eeuw ontkiemde drang om het leven wetenschappelijk te begrijpen. Hiervoor is Antoni van Leeuwenhoek een uitzonderlijk inspirerend voorbeeld.

De identificatie van bacteriën: van fenotype naar genotype

J. De Ley

Wat is identificatie? Volgens het woordenboek betekent het: bepaling van de identiteit. Identificatie in de biologie is de vereenzelviging van een onbekend organisme met een organisme dat voordien reeds werd gezien, beschreven en geklasseerd. Identificatie is slechts mogelijk indien er reeds een beschrijving, groepering of classificatie van gelijkaardige specimina bestaat; zij is slechts zo goed als het referentiesysteem waarmee men vergelijkt. Zonder referentiesysteem en zonder heel het apparaat van classificatie of taxonomie, is identificatie niet mogelijk.

Ieder organisme vertoont een stel kenmerken die primair bepaald worden door het genoom. Kenmerken, of het nu gaat om enkelvoudige of om een combinatie, moeten uniek zijn voor het betreffende specimen of groep van specimina, willen zij voor identificatie gebruikt kunnen worden. Zij onderscheiden daardoor deze organismen van alle andere.

Veel hogere en lagere organismen ondergingen een evolutie met duidelijke morfologische wijzigingen. Een groot aantal genen regelt de vorm en het uiterlijk van deze organismen. Men neemt de fenotypische uitdrukking van deze morfologisch gerichte genen met het oog waar. Daardoor is de identificatie van de meeste hogere wezens (planten en dieren) dikwijls vrij gemakkelijk. In één oogopslag identificeert men de planten en dieren waarmee men het meest vertrouwd is; het vergt nadere waarnemingen om veel andere te bepalen. Kleine planten of dieren (invertebraten, protozoën, wieren, enz.) worden geïdentificeerd met steeds sterkere optische hulpmiddelen van het oog: vergrootglas en microscoop. Veel fungi worden ook zo geïdentificeerd.

Morfologische identificatie van bacteriën

Voor bacteriën is de toestand heel anders. Zij zijn zeer klein, dikwijls

aan de grens van het zichtbare; hun genoom is eveneens zeer klein (het haploied genoom van mensen is ca. 500 maal groter dan dat van *Escherichia coli*). Dit laat niet veel mogelijkheden voor morfologische variatie. Daarenboven hebben bacteriën hoofdzakelijk een biochemische evolutie doorgemaakt. Het gevolg daarvan is dat men met het oog – natuurlijk versterkt met de microscoop – slechts een beperkt aantal morfologisch herkenbare vormen en structuren kan waarnemen die een identificatie toelaten. De organismen waarbij dat het geval is behoren tot de zogenaamde 'hogere bacteriën'. Stammen die behoren tot de actinomyceten, de fototrofen, de glijdende, de knopvormende, de gesteelde en de buisvormende bacteriën kunnen soms op hun uiterlijk bepaald worden tot op het genus. Zo is het tamelijk gemakkelijk microscopisch *Streptomyces, Chondromyces, Gallionella* of *Sphaerotilus* te herkennen. Deze hogere bacteriën hoeft men daarom niet altijd in reinculturen te brengen om ze te herkennen. Inderdaad zijn er heel wat die nog nooit in reinculturen verkregen zijn.

Heel veel bacteriën echter vertonen weinig of geen microscopisch zichtbare merkwaardigheden. Daar zijn rechte of gekromde staafjes bij, kokken, spirillen, eivormige en onregelmatige cellen. Men noemt ze soms, ietwat ten onrechte, de 'echte' bacteriën. Deze organismen kan men slechts zelden afgaand op het uiterlijk identificeren. Een lang beweeglijk staafje met een grote lichtbrekende granule zou *Bacillus* kunnen zijn.

In ieder geval moet men pogen van ieder onbekend specimen een reincultuur aan te leggen, al lukt dit niet altijd. Van de bacteriën die men in een druppel slootwater of in een suspensie van rijke tuingrond te zien krijgt, kan men er meestal slechts enkele microscopisch herkennen, en van de overige heeft men er naar schatting minder dan een vierde in reinculturen gebracht. Wanneer men eenmaal een reincultuur van een onbekende bacterie heeft aangelegd of ontvangen, dient men de organismen op diverse media te kweken om uit te maken of men werkelijk met een bacterie te doen heeft. Soms wordt een gist of een schimmel wel eens aangezien voor een 'onbekende bacterie'. Sommige gisten blijven inderdaad erg klein op neutrale of licht alkalische media voor bacteriën.

Secundaire kenmerken

Multicellulaire kenmerken kunnen helpen om sommige bacteriën te

identificeren: bijvoorbeeld *Beijerinckia* kan men herkennen aan de kolonievorm; waar vlas geroot wordt en de ransige geur van boterzuur de lucht verpest, kan men de aanwezigheid van saccharolytische clostridia vermoeden; gram-negatieve aërobe staafjes die bij pH 4,5 nog groeien en ethanol oxideren tot azijnzuur, behoren waarschijnlijk tot *Gluconobacter* of *Acetobacter*.

In nog andere gevallen kan men pathogene bacteriën herkennen aan de ziektesymptomen die zij veroorzaken bij mensen, dieren en planten. In gele pus van een hyacintebol kan men de aanwezigheid van een *Xanthomonas* vermoeden; gezwellen op *Rosaceae* suggereren een besmetting met *Agrobacterium tumefaciens*. Het advies van een geneesheer, dierenarts of planteziektenkundige is meestal noodzakelijk. De oorzaak van talrijke secundaire infecties is meestal moeilijk te bepalen.

Niet-morfologische kenmerken

De meeste eigenschappen van bacteriën zijn niet zichtbaar. Men moet er actief naar speuren. Kijken volstaat niet. Men doet kleuringen (gram-kleuring; kleuring op flagellen en sporen); men bepaalt of de organismen zuurstof nodig hebben of niet. Zo komt men terecht bij de families. De verdere indeling is hoofdzakelijk fysiologisch. Men gaat dan na, op welke substraten de onbekende bacteriën groeien, welke groeifactoren zij nodig hebben, welke stofwisselingsprodukten gevormd worden, enz. Aan de hand van bestaande sleutels (zie later) kan men een zeker aantal onbekende organismen in een taxon onderbrengen. Men dient echter niet over-optimistisch te zijn. De ondervinding leert dat veel bacterie-specimina niet identificeerbaar zijn, ofwel omdat de referentie-taxa nog niet bekend zijn, ofwel omdat ze onvoldoende beschreven zijn. Meér dan de helft van de bacteriële reinculturen uit grond en water is niet identificeerbaar, zelfs niet door een ervaren taxonoom.

Er moet hier ook duidelijk gesteld worden dat er twee vlakken van identificatie zijn. Er is de identificatie voor de praktijk en die voor biologische doeleinden. In het eerste geval zoekt men opzettelijk naar de aanwezigheid van kiemen van medisch, veterinair, pathologisch, hygiënisch, epidemiologisch of ecologisch belang. In het tweede geval beoogt men geen praktisch doel, maar wenst men alleen de juiste aard en verwantschappen vast te leggen van een onbekende bacterie-

cultuur, los van eventuele praktische beschouwingen.

De eerste soort identificatie werd enorm in de hand gewerkt sedert het begin van deze eeuw, omdat veel medische en openbare instanties inzagen dat de gezondheid van een volk afhangt van een betere hygiënische leefwijze, van een behoorlijke drinkwatervoorziening, riolering, bestrijding van epidemieën en van ziekten in het algemeen. Deze inzichten verliepen gelijktijdig met nieuwe ontwikkelingen in serologie en faag-typering. Deze methoden steunen op de aanwezigheid van enkele wel-bepaalde produkten op het oppervlak van de bacteriële cel. Bij de serologische testen binden die stoffen (antigenen) vreemde antilichamen, waardoor de bacteriën agglutineren of door fluorescentie herkend worden. In het andere geval laten produkten de aanhechting toe van een bacteriofaag, waarna de bacteriecel lyseert. Beide technieken zijn alleen nuttig om zeer verfijnde verschillen op te sporen tussen individuele stammen, bijna altijd binnen het genus en meestal binnen de species. *Salmonella* is het voorbeeld bij uitstek waarin de individuele stammen door serotypering worden onderscheiden. Faagtypering gaat individueel nog verder dan serotypering. Faag-typering dient onder meer om stafylokokken te identificeren.

De stijgende zorg in veel landen voor een betere volksgezondheid en bestrijding van allerhande microbiële infecties, het groter aantal hospitalen, laboratoria en microbiologen leidde tot de isolatie van steeds meer bacteriestammen. Daardoor moeten identificaties sneller en efficiënter gebeuren dan vroeger. Deze tendens is tijdens de laatste kwart eeuw duidelijk naar voren gekomen. Verschillende nieuwe technieken zijn daarvoor ontworpen. Er zijn enkele snelle methoden commercieel beschikbaar voor de identificatie van Enterobacteriaceae en andere bacteriën van klinisch belang. Men streeft ook meer naar automatisering en mechanisering van de identificatie. Zeer ver is men daar nog niet in. Enkele onderdelen kunnen geautomatiseerd worden, zoals het gieten van platen en de multipele inoculatie. De volledige mechanisatie kampt nog met technische moeilijkheden. Een interessante poging is de lineaire-groeimachine van prof. Hedén (Stockholm, Zweden). In deze lineaire-groeimachine wordt eerst automatisch en steriel een agarblok in lange stroken gesneden. Daarna wordt de agar lineair geënt met één cultuur. De strook rolt verder, steeds evenwijdig aan de lengte-as, en wordt bedekt met strookjes papier of gel, beladen met substraat, inhibitor enz. Na incubatie glijdt de begroeide strook onder een registrerende fotometer door. Een ander voorbeeld

van mechanisatie is de commercieel beschikbare Auto-Bac. Deze meet de groeistijging of -remming in aanwezigheid van substraten, groeistimulatoren of -inhibitoren. Het toestel bestaat uit een groeikamer met schudapparaat en uit een meeteenheid, waar de groei wordt bepaald door lichtverstrooiingsmetingen. Nog een andere benadering is de computerhulp zoals voorgesteld door bijvoorbeeld Dr. Lapage uit Londen. Alle eigenschappen van een groep bacteriestammen, nuttig voor identificatie, worden in het geheugen opgeslagen. Na een reeks van experimentele testen laat men door de computer de meest waarschijnlijke identificatie uitwerken of de verdere testen voorschrijven.

Tot rond 1955 beseften de meeste bacteriologen niet dat de toenmalige beschrijving van een bacterie slechts een uiterst klein deel van de fenotypische uitdrukking van het genoom omvatte. Veel oude beschrijvingen zijn daarom ook onvolledig en de identificaties die daarop steunden zijn dikwijls foutief. Prof. Sneath (Leicester, U.K.) ontwikkelde daarom een methode waarin zoveel mogelijk fenotypische kenmerken worden onderzocht, in de praktijk is dat meestal 100 à 200. Tevens sluit men zoveel mogelijk specimina in. Al deze gegevens worden gegroepeerd volgens wiskundige modellen en de berekeningen worden vergemakkelijkt door een computer. Het resultaat is dat alle specimina gegroepeerd zijn naar stijgende of dalende gelijkenissen. Men noemt deze werkwijze de 'numerieke analyse' (Sneath & Sokal, 1973). Fig. 1 geeft een voorbeeld van een dergelijke indeling van een aantal specimina. Deze methode dient in de eerste plaats om bacteriën beter te klasseren. Terzelfdertijd kan men een zeker aantal van niet of minder bekende specimina in deze nieuwe 'fenon'-groepen onderbrengen: zij zijn daardoor geïdentificeerd. Nadat een aantal specimina numeriek zijn ingedeeld, kan men die kenmerken opsporen die de oorzaak zijn van de differentiatie, en die dus de identificatie zullen vergemakkelijken. Het lijdt geen twijfel dat de methode der numerieke analyse de identificatie van onbekende specimina veel heeft verbeterd. In de literatuur staan honderden gevallen beschreven van onbekende organismen die aldus hun juiste identiteit vonden.

Een andere methode voor snelle classificatie en identificatie van bacteriën werd in mijn laboratorium ontworpen (Kersters & De Ley, 1975). Zij steunt op het beginsel dat iedere bacteriestam in dezelfde omstandigheden genetisch verplicht is steeds dezelfde eiwitten te maken: de eiwitsamenstelling is een soort indirecte kopie van het genoom. De eiwitten worden geëxtraheerd en elektroforetisch gescheiden: alles

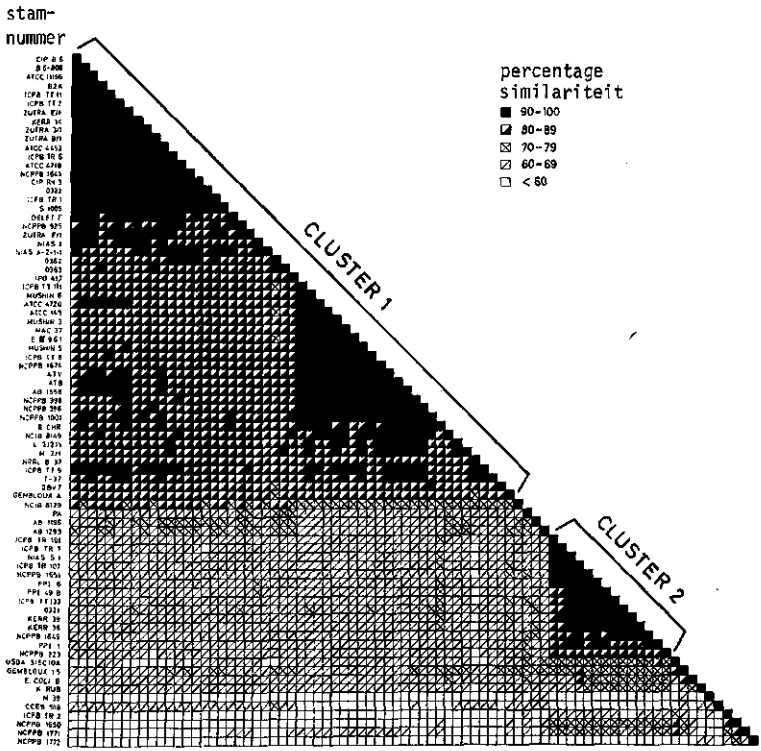


Fig. 1. Matrix waarin de mate van overeenkomst tussen Agrobacterium-*stammen (stamnummer links) is weergegeven door de mate van zwarting. De stammen vallen uiteen in twee clusters (trossen). Cluster 1 omvat de echte 'crown gall'-stammen en de niet pathogene* radiobacter-*stammen. Cluster 2 omvat de echte rhizogene stammen en de atypische 'crown gall'-stammen. Stammen van onzekere verwantschap die in een van beide trossen vallen, zijn daardoor geïdentificeerd.*

gebeurt in strikt gestandaardiseerde omstandigheden. De elektroferogrammen worden met behulp van een computer onderling vergeleken en gegroepeerd. Ook deze methode dient niet alleen om te klasseren maar tevens om te identificeren. Daarmee werden bijvoorbeeld tot dusver de genera *Agrobacterium, Zymomonas* en *Alcaligenes* helemaal opgehelderd.

Identificatie met behulp van het genotype

In 1963 begon een ware kennisomwenteling in de microbiologie. In dat jaar immers werden nieuwe experimentele technieken toegankelijk, die het rechtstreeks gevolg waren van het inzicht van Crick en Watson in de structuur van DNA. De genomen dragen natuurlijk alle genen die de meeste fenotypische kenmerken besturen. Studies en vergelijkingen van genomen omvatten veel meer dan de studie van enkele, of zelfs van enkele honderden, fenotypische kenmerken. Men hoeft de fenotypische uiting van een genoom zelfs niet te kennen. Vergelijkingen tussen genomen van een onbekend en een bekend specimen kunnen snel een definitieve identificatie mogelijk maken. Deze vergelijkingen heeft men op vier vlakken gezocht.

1. Genoom-grootte

Vrijwel alle bacteriële genomen hebben een molekulair gewicht tussen $0{,}4 \times 10^9$ en 4×10^9. Deze spreiding is veel te klein om nuttig te zijn, tenzij in enkele uitzonderlijke gevallen. Gebruik van de genoomafmeting in de identificatie is dus niet mogelijk.

2. DNA-base-verhouding

De DNA-base-verhouding is de verhouding van de hoeveelheden guanine en cytosine ten opzichte van de som van alle basen in het genoom, uitgedrukt in mol en in percent. Het gebruikelijke symbool is % GC. Omdat het aantal en de opeenvolging der basen in het genoom-DNA de grondslag zijn van de erfelijke eigenschappen, is het duidelijk dat het % GC een constante is voor ieder organisme. Op dit ogenblik zijn de %-GC-waarden bekend van ca. 6 à 7000 genoemde bacterie-specimina die behoren tot een honderdtal genera. Deze waarden vormen een deel van de beschrijving van een bacterieel taxon. Ze variëren van 23 tot 77% GC. De %-GC-grenzen van talrijke genera zijn reeds formeel in de laatste uitgave van Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) opgenomen. De %-GC-waarden zouden in de beschrijving van ieder nieuw bacterieel taxon moeten worden ingesloten. Wanneer de %-GC-waarden van twee organismen dezelfde zijn, kunnen deze organismen gelijk of verwant zijn, maar dat is niet noodzakelijkerwijze zo. Wanneer hun % GC enkele een-

heden verschilt, dan zijn zij zeker niet gelijk, maar kunnen zij nog verwant zijn. Wanneer het % GC 20% of meer verschilt, dan zijn de organismen zeker niet meer verwant.

Deze grootheid is dus zeker zeer belangrijk en noodzakelijk voor een betere classificatie. Daarenboven kan zij de identificatie aanzienlijk eenvoudiger en vlugger maken. Stel dat wij alle beschikbare %-GC-gegevens groeperen per genus, en deze dan in een tabel of een grafiek rangschikken volgens stijgend of dalend % GC. Fig. 2 geeft daar een voorbeeld van. Van een onbekend specimen overtuigt men zich eerst microscopisch dat het bacteriën zijn; daarna dat het een reincultuur is. Vervolgens isoleert men het DNA en bepaalt het % GC. Stel dat dit 55 is. Volgens de figuur zijn er een tiental genera die in aanmerking komen. In één bewerking heeft men dus alle andere

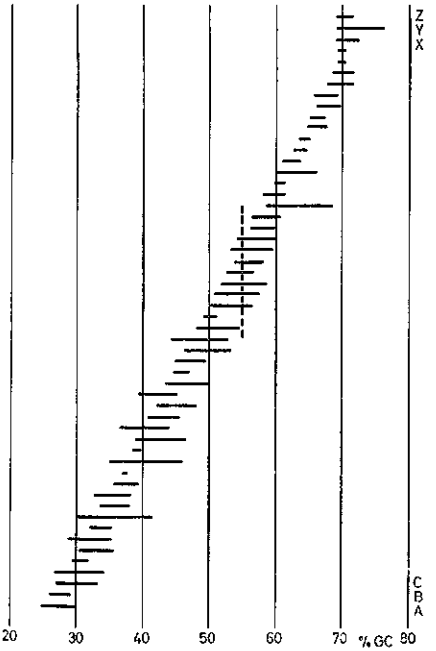


Fig. 2. Het nut van de DNA-base-verhouding in % GC in de identificatie van bacteriën. De genera A, B, C . . . X, Y, Z worden gerangschikt volgens stijgend % GC. Een onbekend organisme heeft een % GC van bijvoorbeeld 55. De genera die door de stippellijn doorsneden worden, komen in aanmerking bij de identificatie.

genera uitgesloten. Dit is een enorme besparing aan tijd en een winst aan inzicht.

Voor de juiste generische identificatie is men verder aangewezen op fenotypische verschillen. Meestal is deze identificatie niet zo moeilijk en kan men met een paar toetsen het juiste genus wel bepalen. Lukt dat niet, dan heeft men te doen ofwel met een volledig nieuw taxon, ofwel met een waarvan het % GC nog niet werd bepaald. In deze gevallen biedt fig. 2 geen hulp.

3. *DNA:DNA-hybridisaties*

Hybridisatie in de molekulaire biologie is de techniek waarbij twee strengen nucleïnezuren, door middel van de zogenaamde base-paring, gekoppeld worden. De koppeling is vollediger naarmate de betrokken strengen nucleïnezuren een nauwere verwantschap in de volgorde van de nucleotiden hebben. Het is de belangrijkste methode om verwantschap en identiteit vast te stellen, omdat men het totaal genoom van het onbekende organisme rechtstreeks vergelijkt met het genoom van een of meer bekende organismen. In veel van de voorgaande methoden vergelijkt men alleen de experimenteel bepaalde eigenschappen van de onbekende met de *informatie* over andere stammen. In de hybridisatiemethoden dient men werkelijk te beschikken over die andere organismen, en volstaat een beschrijving op papier niet. Dit is natuurlijk de enige betrouwbare manier om twee eenheden te vergelijken. Het percentage van beide genomen dat voldoende gelijk is om te hybridiseren onder optimale omstandigheden, noemt men het % homologie. De homologieniveaus zijn niet dezelfde in alle taxa. Bijvoorbeeld in de familie der Enterobacteriaceae hebben veel genera een DNA-homologie van circa 40%, maar in het genus *Agrobacterium* zijn er stammen van dezelfde species die maar 25% homologie hebben, andere die 45% of meer homologie vertonen. DNA:DNA-hybridisaties hebben alleen betekenis voor identificatie wanneer de homologie meer dan 90 à 95% bedraagt, of wanneer men over een vergelijkingsmatrix beschikt, dat wil zeggen een matrix van gegevens over hybridisatie met bekende stammen. Twee organismen die geen meetbare DNA-homologie vertonen, kunnen natuurlijk niet identiek zijn, maar kunnen toch nog altijd in hetzelfde genus thuishoren.

4. *DNA:rRNA-hybridisaties*

De hybridisatie tussen DNA en het RNA van de ribosomen (rRNA) is een nieuwe techniek in bacteriële classificatie en identificatie die nu in mijn laboratoria wordt ontwikkeld. Wij bepalen de gelijkenis van één type van cistron (gen) bij talrijke bacterie-taxa. Het gebruikte cistron-type is het 16S of 23S rRNA-cistron. Het was vroeger reeds bekend dat deze cistronen 'geconserveerd' zijn, dat wil zeggen dat zij minder gewijzigd zijn in de loop der evolutie dan het boodschapperdeel van het genoom. Wij gebruiken twee parameters: (1) de kwan-

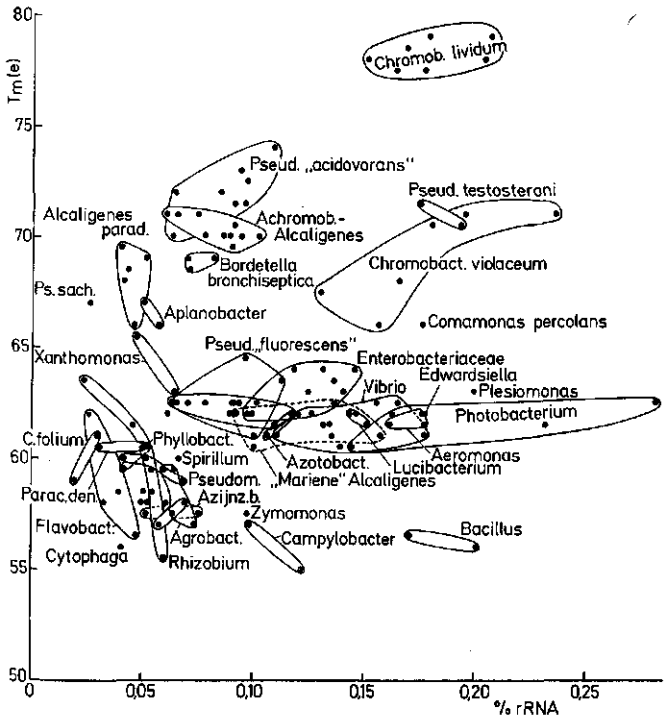


Fig. 3. Kaart van de gelijkenissen tussen de 23S rRNA-cistronen van enkele bacteriële genera. Hybridisaties van DNA-typen met radio-actief gemerkt rRNA van Chromobacterium lividum, *type-stam. De parameters zijn: x-as: de hoeveelheid rRNA gehybridiseerd met DNA, in %; y-as: de stabiliteit van deze hybriden, uitgedrukt in T_m, de temperatuur waarbij de helft van deze hybriden zijn ontkoppeld (De Ley & Segers, onuitgegeven).*

titatieve gelijkheid tussen rRNA-cistronen in percent en (2) de thermische stabiliteit van de gevormde hybriden. Heel wat taxa werden op die manier in kaart gebracht. Fig. 3 geeft daar een voorbeeld van. Deze methode laat geen fijne indeling toe, wel kan men een onbekend organisme daardoor in een genus of een supergenerisch taxon onderbrengen. Enkele voorbeelden van toepassing mogen volstaan.

In 1934 werd een bacterie geïsoleerd uit zieke *Gypsophila*-planten. Deze bacterie werd ondergebracht in het genus *Agrobacterium* als *A. gypsophilae*. Men vermoedde reeds lang dat dit een vergissing was en dat deze bacterie eigenlijk een *Erwinia* is. DNA:rRNA-hybridisaties toonden inderdaad onomstotelijk aan dat deze bacterie helemaal niet in *Agrobacterium* maar in de Enterobacteriaceae thuishoort. Een ander voorbeeld betreft een andere verkeerde identificatie van een bacterie geïsoleerd uit gezwellen van de Douglas-spar (*Pseudotsuga douglasii* Carr.). De juiste taxonomische plaats van dit organisme werd lang betwijfeld. Door DNA:rRNA-hybridisaties toonden wij aan dat het eigenlijk een coryneforme bacterie is.

Hulpmiddelen bij de identificatie

Er zijn enkele gebieden waar de identificatie tot routine is herleid: dit geldt bijvoorbeeld voor sommige genera van de Enterobacteriaceae en voor *Staphylococcus*. Voor alle andere gebieden van identificatie is minstens een algemene kennis van de microbiologie noodzakelijk. De sleutel van Skerman, vermeld in Bergey's Manual (1974), en de Manual zelf, zijn goede hulpmiddelen. Evenwel bestaan er nog heel wat waardevolle taxa die in Bergey niet zijn opgenomen, zoals bijvoorbeeld *Mycoplana* en *Phyllobacterium*. Daarom dient men de oorspronkelijke literatuur te lezen. De handleidingen van Krassilnikow (1959) en van Prévot (1961) zijn niet aan te raden. Er bestaan enkele meer uitgebreide richtlijnen voor afzonderlijke groepen (Prévot, 1966; Gibbs & Skinner, 1966; Gibbs & Shapton, 1968). Steel (1962) gaf een uitstekende inleiding tot de beginselen van de identificatie. Een voortreffelijke sleutel voor de identificatie van gisten werd uitgewerkt door Barnett & Pankhurst (1974). De meeste handboeken van microbiologie raken meestal de problemen van de identificatie niet aan.

Vergissingen in de identificatie

Een juiste identificatie van bacteriën is meestal niet gemakkelijk. Dit heeft verscheidene oorzaken. Zoals reeds gezegd, is een groot deel van de bacteriënwereld nog niet beschreven. Veel beschrijvingen van voor 1950 moeten met de nodige scepsis worden bekeken; veel hiervan is onjuist. Zo bestaan de genera *Alcaligenes* en *Achromobacter* uit een heterogene verzameling van peritriche, gram-negatieve staafjes waarvan men niet wist waar ze anders onder te brengen. Het zogenaamde genus *Pseudomonas* is eigenlijk een vorm-genus sensu Cohn. Zeer veel polaire, gram-negatieve, aërobe staafjes worden zonder meer daarin ondergebracht, heel dikwijls ten onrechte.

Een andere oorzaak van vergissingen is het gebrek aan ervaring en kennis met de taxa waarin men een onbekende denkt te moeten onderbrengen. Pogingen van niet gespecialiseerde bacteriologen om onbekende bacteriën te identificeren lopen niet zelden op een vergissing uit. Het aantal verkeerd geïdentificeerde en verkeerd genoemde bacteriën is zeer groot. Erger is het wanneer iemand een organisme niet kan thuisbrengen, en het nodig acht een nieuw taxon op te richten. Deze verkeerde en nutteloze namen hinderen de classificatie en de identificatie gedurende tientallen jaren. Het is immers uiterst gemakkelijk een nieuw taxon voor te stellen, maar het is uiterst moeilijk om het weer uit te roeien. De literatuur van de laatste jaren staat vol van verkeerd genoemde taxa die weer met de moeder-taxa verenigd worden. Wij benadrukken dat het noodzakelijk is een te identificeren stam experimenteel te vergelijken met authentieke vertegenwoordigers, liefst met een type-stam of centrotype-stam. Het beste blijft echter om totaal onbekende organismen hoogstens te identificeren tot op het genus en de uiteindelijke identificatie door een specialist te laten uitvoeren.

Besluit

De mogelijkheden en methoden om bacteriën te identificeren zijn enorm verbeterd sedert het begin van deze eeuw. De technieken voor de routine-bepalingen van onbekende kiemen van klinisch en hygiënische betekenis kunnen nog efficiënter worden door gebruik te maken van snelle methoden, en door de uitbreiding van automatisering en mechanisering. Moderne technieken zoals numerieke analyse en die

uit de molekulaire microbiologie hebben de classificatie reeds veel verbeterd en zijn ook onmisbare hulpmiddelen voor een snellere en meer betrouwbare identificatie van de talrijke onbekende bacteriën.

Prebiotische evolutie

A. W. SCHWARTZ

De geologische tijdschaal

De aarde is 4,6 miljard jaar oud, de oudste rotsen iets minder dan 4 miljard jaar en de oudste sedimenten misschien 3,5 miljard jaar. Tot voor kort reikte onze kennis van de biologische evolutie slechts terug tot de benedengrens van het Cambrium, ongeveer 0,6 miljard jaar geleden (fig. 1). Ofschoon reeds eerder enkele publikaties verschenen waren over microfossielen uit het Precambrium, kan men toch stellen dat de artikelen van Tyler en Barghoorn over de micro-organismen in de Gunflint Iron Formation de intensieve belangstelling voor de paleobiologie van Precambrische micro-organismen gewekt hebben (Tyler & Barghoorn, 1954; Barghoorn & Tyler, 1965). Deze studies van microfossielen hebben ons drie miljard jaar terug gevoerd en hebben tevens aanleiding gegeven tot een controverse over de aard van

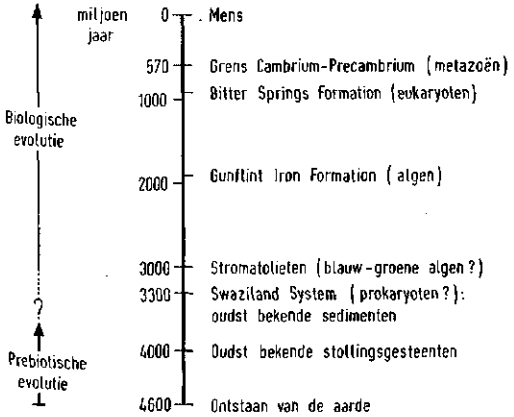


Fig. 1. De evolutionaire tijdschaal.

deze oudste zogenaamde microfossielen. Fig. 2 laat enkele typische vertegenwoordigers zien van de draadvormige en niet-draadvormige fossielen van de Guntflint. Ze vertonen een grote gelijkenis met algen. De paleontologen zijn het er min of meer over eens dat dit echte fossiele algen zijn. Dezelfde vormen zijn ook in recentere afzettingen te vinden, zelfs in afzettingen welke op dit moment gevormd worden.

Er bestaan nog andere fossiele afzettingen, die ons veel verder terug voeren in de tijd, en wel naar het vroegste Precambrium. Dit zijn de gelaagde kalksteenafzettingen, die worden aangeduid als stromatolieten. Het is bekend dat ze zijn, en worden, geproduceerd door de groei van kolonies draadvormige algen. Fig. 3 is een foto van een stromatoliet, waarin de typische golvende patronen van de lagen duidelijk te zien is. Deze afzettingen zijn tenminste 3 miljard jaar oud (Rutten, 1971).

Tenslotte werden in het Swaziland-systeem van sedimenten in Zuid-Afrika, de oudste sedimenten die op aarde bekend zijn, interessante groepen van structuren gevonden, waarvan er enige in fig. 4 worden

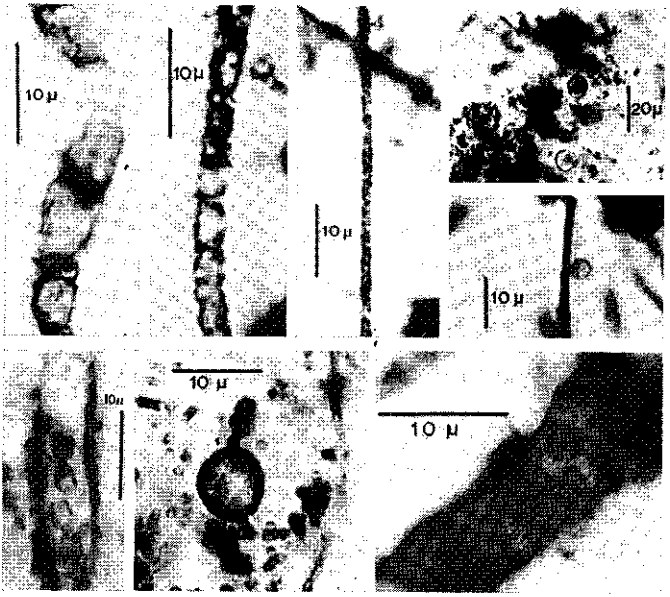


Fig. 2. Fossielen uit de Gunflint Iron Formation, Canada, ongeveer 1900 miljoen jaar oud. Foto: Elso Barghoorn.

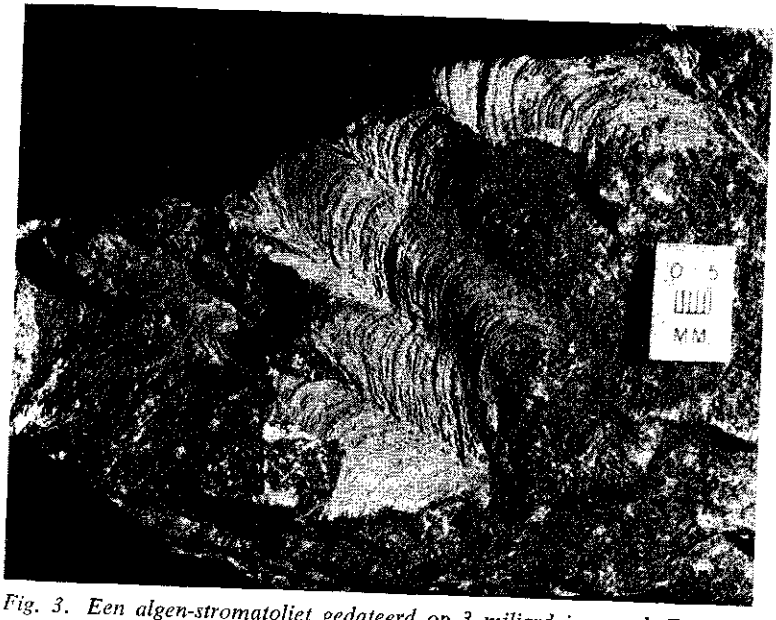


Fig. 3. Een algen-stromatoliet gedateerd op 3 miljard jaar oud. Foto: K. A. Kvenvolden.

Fig. 4. Alg-achtige vormen uit de Fig Tree Chert, Swaziland System, Zuid Afrika; 3,1 miljard jaar oud. Foto: Elso Barghoorn.

getoond. Deze microstructuren, die meer dan 3,1 miljard jaar oud zijn, doen ons ook denken aan fossiele algen (Schopf & Barghoorn, 1967; Pflug, 1967). Andere sedimenten van het Swaziland-systeem, die zelfs meer dan 3,2 miljard jaar oud zijn, bevatten dezelfde structuren (Engel et al., 1968).

Door het gebrek aan bewijs voor de aanwezigheid van reproduktieve vormen, zoals die bijvoorbeeld wel worden aangetroffen in de Gunflint Iron Formation, moet er enig voorbehoud gemaakt worden bij het accepteren van deze structuren als fossiele organismen. Verscheidene schrijvers hebben gesuggereerd, dat deze structuren in werkelijkheid 'prebiotische' fossielen vertegenwoordigen, of zelfs een mengsel van biotische en 'prebiotische'. Later in dit hoofdstuk zal hierop verder worden ingegaan. De belangrijkste conclusie die men uit de gegevens trekken kan, is dat reeds in de oudst bekende sedimenten duidelijk het bewijs aanwezig is voor het voorkomen van bepaalde structurele organisaties, die mogelijk van biotische oorsprong zijn.

De proeven

In vrijwel dezelfde tijd dat de belangstelling voor de Precambrische micropaleontologie ontwaakte, wekte de beroemde vonkontladingsproef van Miller een sterke belangstelling in die nog vroegere periode van de evolutionaire geschiedenis waarin de prebiotische evolutie plaatsvond. De theoretische basis voor de proef van Miller werd in 1924 door A. I. Oparin gelegd in een in het Russisch geschreven boek, dat later in het Engels verscheen onder de titel 'The origin of life on Earth' (Oparin, 1957). Oparin stelde dat de oorsprong van het leven op aarde vooraf gegaan was door een periode van synthese van organische verbindingen. De organische verbindingen dienden als de structurele componenten van, en later als voedsel voor de eerste levende organismen.

Ongeveer te zelfder tijd werden in Engeland soortgelijke ideeën ontwikkeld door J. B. S. Haldane. Zowel Oparin als Haldane stelden dat de primitieve aarde een zuurstofvrije atmosfeer had (Oparin, 1965).

In 1952 beredeneerde Urey in zijn boek 'De Planeten' dat de aarde tijdens zijn formatie een grote overvloed aan waterstof zou hebben gehad. De waterstof ontsnapte later in de ruimte. In de aanwezigheid van waterstof, zijn methaan, ammoniak en water thermodynamisch

gezien, de meest stabiele molekulen van de overeenkomstige elementen.

Haldane nam aan dat ultraviolet licht van de zon zou inwerken op deze bestanddelen van de primitieve atmosfeer waardoor organische verbindingen ontstonden, die zich in de oceanen ophoopten en deze tot een 'warme verdunde soep' maakten. Het atmosferische model dat door Miller gebruikt werd, was feitelijk dat van Oparin, te weten een mengsel van methaan, ammoniak, waterstof en water. Miller toonde aan dat de inwerking van elektrische vonken op dit gasmengsel resulteerde in de vorming van vele organische verbindingen, waaronder aminozuren (Miller, 1953). Fig. 5 toont een tekening van Millers apparaat. De grote, bovenste, kolf bevat de elektroden. De kleine kolf bevat water, dat gedurende de proef, die ongeveer een week duurt, aan de kook wordt gehouden. Waterdamp passeert de vonkkamer,

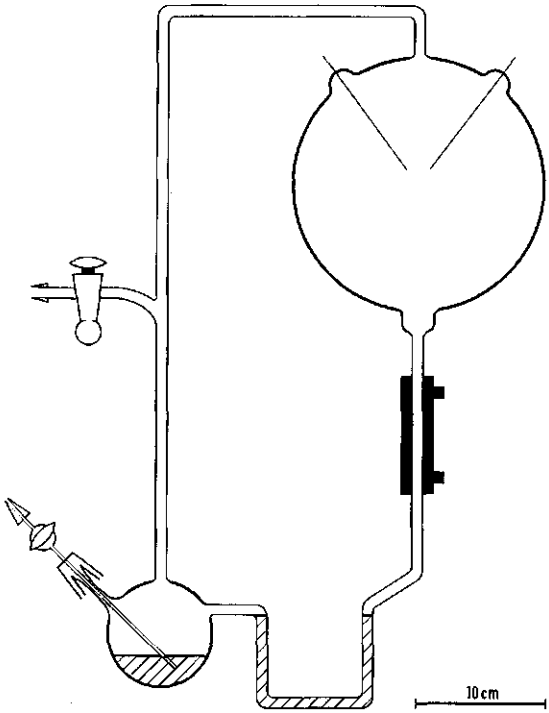


Fig. 5. Een tekening van Millers originele vonk-ontladingsapparaat.

condenseert daarna en keert via de U-vormige buis terug naar de kleine kolf. Door het water op deze manier te laten circuleren, kunnen oplosbare produkten zich in de kleine bol verzamelen. De reactieomstandigheden doen denken aan die tijdens een zwaar onweer.

In de afgelopen twintig jaar is deze proef honderden malen met vele variaties herhaald. De energiebronnen werden uitgebreid. Behalve van verschillende soorten elektrische energie, werd ook gebruik gemaakt van kort- en langgolvig ultraviolet licht, van hoge temperatuur, van schokgolven, van ultrasonoor geluid en van diverse radioactieve stralingen (Kenyon & Steinman, 1969). Indrukwekkende lijsten zijn samengesteld van de verschillende biologisch belangrijke molekulen die bij dit soort reacties ontstaan. Een belangrijk resultaat van deze proeven is dat blauwzuur en bepaalde andere eenvoudige verbindingen als eerste gevormd worden en tevens de voornaamste tussenprodukten zijn bij de vorming van meer complexe verbindingen. Aminozuren worden gevormd als de oorspronkelijke produkten in water opgelost worden. Later zal ik hier nog nader op ingaan.

Proeven van het type Miller demonstreren alleen dat de organische verbindingen spontaan konden worden gesynthetiseerd tijdens de vroege geschiedenis van het zonnestelsel. We weten nu dat ze inderdaad werden gevormd.

Meteorieten

De kennis over de spontane synthese van verbindingen is ontleend aan de analyse van de organische verbindingen welke gevonden worden in een bepaald type meteoriet, de koolstofhoudende chondriet. Deze koolstofhoudende chondrieten zijn, evenals alle meteorieten, leden van het zonnestelsel en zijn misschien restanten uit de tijd dat de aarde en andere planeten gevormd werden. Algemeen wordt aangenomen dat dit type meteoriet in feite algemeen voorkomt in de ruimte, hoewel men het zelden aantreft in meteorietverzamelingen. De reden daarvoor is, dat de koolstofhoudende chondriet snel door water wordt vernietigd. Hij moet dus zeer snel na het vallen worden gevonden, wat erg onwaarschijnlijk is, òf hij wordt in het geheel niet gevonden.

De aanwezigheid van organisch materiaal in deze meteorieten is al lang bekend, maar de scheikundigen die als eerste hierin geïnteresseerd raakten, bezaten geen geschikte analysetechnieken. Tegen de

tijd dat de technieken beschikbaar kwamen en de belangstelling herleefde, dook een ander probleem op. De beschikbare exemplaren waren tamelijk onzorgvuldig bewaard in musea, op tentoonstellingen, enz., waarbij geen voorzorgen genomen waren om besmetting ervan te voorkomen. Toen ze geanalyseerd werden, trof men aminozuren en bepaalde andere organische verbindingen aan, maar men kon natuurlijk onmogelijk vaststellen of deze oorspronkelijk aanwezig waren geweest, of later geïntroduceerd waren door bacteriën, stof, en diverse behandelingen in de loop van soms wel 100 jaar (Hayes, 1967).

In de afgelopen jaren zijn belangrijke analyses verricht aan verschillende koolstofhoudende chondrieten die binnen enkele dagen nadat zij op aarde gevallen waren, gevonden werden en snel overgebracht waren naar speciale laboratoria. Aminozuren konden met zekerheid worden aangetoond.

Nu kunnen aminozuren in twee geometrisch verschillende vormen voorkomen, de zogenaamde L- en D-vorm. Deze staan bekend als optische isomeren en zijn feitelijk spiegelbeelden van elkaar. Vrijwel elk organisme op aarde synthetiseert alleen L-aminozuren. Bij een niet-biologische synthese, zoals toegepast bij de Miller-proef, ontstaat altijd een half om half mengsel van de D- en de L-vorm. Het is thans mogelijk de vormen afzonderlijk te bepalen en men heeft kunnen vaststellen dat de aminozuren in onbesmette meteorieten mengsels zijn van half het D- en half het L-isomeer. Met andere woorden, ze zijn spontaan op niet biologische wijze gevormd (Lawless & Peterson, 1975).

Synthese op de sterren en in de ruimte

We weten nu dat de spontane vorming van organische verbindingen een universeel proces is. Dit begint feitelijk in de sterren, die de vuurhaarden zijn waar de elementen die zwaarder zijn dan waterstof gevormd zijn. De energiebron hierbij is de omzetting van waterstof in helium. De eerste drie elementen die na helium gevormd worden, zijn koolstof, stikstof en zuurstof. Deze elementen nemen in feite deel aan een katalytische cyclus, die zorgt voor de omzetting van meer waterstof in helium. Het is dus niet verbazingwekkend dat de voornaamste elementen waaruit alle levende organismen op aarde bestaan, koolstof, stikstof, zuurstof en waterstof, deel uitmaken van de zes meest voorkomende in het universum (de twee anderen zijn helium en neon, maar geen van beide is in staat chemisch te reageren). Deze vier ele-

Tabel 1. Gedeeltelijke lijst van molekulen die in de interstellaire ruimte zijn aangetoond.

NH_3	ammoniak	C_2H_5OH	ethanol
H_2O	water	CH_3C_2H	propyn
HCN	blauwzuur	CH_3CN	cyanomethaan
H_2CO	formaldehyde	HC_3N	cyanoethyn
HCOOH	mierezuur	$HCONH_2$	formamide
CH_3OH	methanol		

menten zijn, om eenvoudige fysische redenen, ook de meest geschikte voor de vorming van chemische verbindingen (Wald, 1974).

Het is mogelijk om met een spectroscoop in de buitenste, koelere regionen van enkele sterren, de vorming van eenvoudige verbindingen van twee elementen te observeren; bijvoorbeeld de verbindingen H—H, C—H, N—H en O—H, die beschouwd kunnen worden als de voorlopers van molekulaire waterstof, methaan, ammoniak en water. Eveneens worden de verbindingen C—C en C—N waargenomen, die ook beschouwd kunnen worden als directe voorlopers van organische molekulen (Aller, 1963). De toepassing van spectroscopische technieken bij het onderzoek van de ruimte tussen de sterren heeft gedurende de laatste tien jaar een groot aantal tamelijk grote molekulen aan het licht gebracht, waarvan de meeste organisch zijn (tabel 1). Bijzonder interessant is het voorkomen van HCN (blauwzuur) en formaldehyde, die door Miller werden geïdentificeerd als voorlopers van het aminozuur glycine. In feite is HCN de voorloper van vele biologische verbindingen bijvoorbeeld ook van adenine (Kenyon & Steinman, 1969).

Synthese op de primitieve aarde

Laten we terugkeren naar de aarde van ongeveer vier miljard jaar geleden en weer aan die oplossing van aminozuren denken. Zolang deze aminozuren in water opgelost blijven, is de vorming van polypeptiden door polymerisatie onwaarschijnlijk. Deze conclusie is niet alleen gebaseerd op kennis betreffende de thermodynamische instabiliteit van de peptideverbinding in de aanwezigheid van water, maar ook op het feit dat ondanks vele pogingen gedurende vele jaren in verschillende laboratoria geen systeem gevonden is dat in staat is de polypeptidesynthese in een waterige oplossing te bevorderen. Polymerisatie kan echter worden bereikt door verhitting en verdamping van de waterige

oplossing met als resultaat dehydratie-condensatie. In alle stadia van de opbouw van ingewikkelde molekulaire systemen wordt energie opgenomen. In de vroege stadia werd deze energie waarschijnlijk aan de atmosfeer geleverd in de vorm van ultraviolette straling (Miller & Urey, 1959). In de latere stadia zal de meest waarschijnlijke energiebron voor de polymerisaties de geothermische hitte zijn geweest (vulkanen). Men kan zich het proces van de polypeptidevorming op de primitieve aarde gemakkelijk voorstellen. De eenvoudige gassen in de atmosfeer reageerden met elkaar en vormden tussenprodukten zoals HCN en aldehyden. Deze verbindingen werden door de regen uit de atmosfeer gewassen en verzameld in plassen en meren, waar de verdere reacties, welke tot de vorming van aminozuren leidden, plaatsvonden. Een plas, tijdelijk gevormd in een warme omgeving, zal bij verdamping aanleiding geven tot polymerisatie van aminozuren tot polypeptiden. De volgende regenval wast de polypeptiden in een dieper, koeler meer waar verdere reacties plaatsvinden. Al deze stappen zijn experimenteel nagebootst.

In dit verband wil ik er op wijzen dat kleinere wateroppervlakten (dat wil zeggen plassen, rivieren en meren) misschien belangrijker waren voor de synthetische stadia van de prebiotische evolutie dan de oceaan. Er bestaan verschillende redenen om dit aan te nemen. Eén ervan is, dat de bindingen in biologische macromolekulen gevormd worden door het elimineren van water, waardoor ze in de aanwezigheid van water instabiel zijn. Daarenboven kan een molekuul, eenmaal opgelost in een oceaan, niet langer energie absorberen, tenzij door lichtabsorptie, en dat slechts in de bovenste lagen van de oceaan, die een zeer kleine fractie van het totale volume uitmaken. Maar het grootste probleem betreffende de prebiotische evolutie waarvoor de oceaan ons plaatst, is de verdunning.

Ook fosfaat nam reeds in een vrij vroeg stadium deel aan de prebiotische reactiesystemen. Het was alleen op fofsaat-houdende rotsoppervlakten beschikbaar voor contact met reagerende organische verbindingen (Schwartz, 1972). Mineraal fosfaat is slechts dan goed in water op te lossen, wanneer het gereageerd heeft onder vorming van een organisch derivaat. In tegenstelling tot andere biogene elementen bestaan er geen thermodynamisch stabiele, fosfor bevattende gassen.

Samenvattend moet men zich de primitieve aarde als volgt voorstellen: miljoenen meertjes met opgeloste organische verbindingen,

maar van elkaar verschillend wat betreft de temperatuur, pH, anorganische samenstelling, enz. Deze meertjes zijn natuurlijk niet stabiel. Ze zijn aan het opdrogen, koken, bevriezen, overstromen en verzamelen, een nachtmerrie voor scheikundigen. Maar even goed als er verschillen waren, moeten er ook bepaalde overeenkomsten zijn geweest zoals de aanwezigheid van aminozuren en, waar verdamping en verhitting had plaats gevonden, tevens van polypeptiden.

Protocellen en chemische evolutie

Een zeer belangrijke eigenschap van de thermisch gepolymeriseerde aminozuren moet hier vermeld worden omdat het van groot belang kan zijn voor ons begrip van de evolutie van primitieve cellulaire systemen op aarde. Fox en zijn medewerkers hebben aangetoond dat deze gepolymeriseerde aminozuren of 'proteinoids' (eiwitachtige stoffen) spontaan grote aantallen cel-achtige deeltjes vormen bij toevoeging van water (fig. 6). Deze 'proteinoid microspheres' vertonen een indrukwekkend aantal eigenschappen, die veel overeenkomst vertonen met de eigenschappen van eenvoudige cellen (Fox & Dose, 1972). Deze eigenschappen, waaronder ook een eenvoudig soort voortplanting, hebben Fox ertoe gebracht ze als modellen voor primitieve cellen of protocellen te zien. Deze structuren kunnen in verband gebracht worden met de door de Nederlandse scheikundige Bungenberg de Jong in 1949 beschreven coacervaatdruppels, die voor Oparin als model dienden van pre-cellulaire organisaties. Oparin suggereerde dat dergelijke structuren de bouwstenen hebben gevormd van eenheden die in staat zijn zichzelf te kopiëren.

Het staat vast dat de complexe ketens van chemische reacties, die levende cellen kenmerken, zich niet ontwikkelen in een homogene oplossing. Voor zo'n keten van reacties is het nodig dat hoogst instabiele macromolekulaire structuren, die spoedig zouden worden vernietigd als ze niet werden afgezonderd van de gewoonlijk waterrijke omgeving, in stand worden gehouden. De voornaamste stap in de prebiotische evolutie moet daarom de ontwikkeling zijn geweest van chemisch georganiseerde, zichzelf kopiërende open systemen, die door een grensvlak worden gescheiden van de omgeving. Alleen dàn kon een soort prebiologische, natuurlijke selectie werken om de overleving en verdere ontwikkeling te verzekeren van díe eenheden, die het meest efficiënt waren in het zichzelf kopiëren. Misschien heeft de

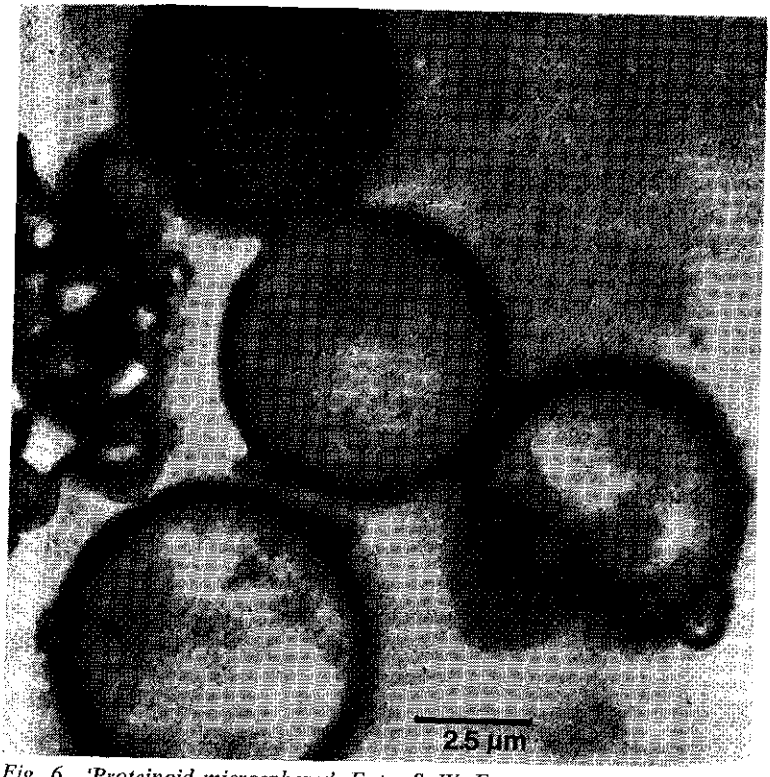


Fig. 6. 'Proteinoid microspheres'. Foto: S. W. Fox.

ontwikkeling van deze protocellen de prebiotische kolonisatie van de vroegere oceanen mogelijk gemaakt.

Ik heb nog niets gezegd over het 'metabolisme' van deze eenheden, maar het is duidelijk dat er tijdens de gehele periode van de prebiotische evolutie een voortdurende aanvulling van chemische energie nodig was. Die energie is mogelijk in de vorm van reactieve verbindingen aanwezig geweest; in latere stadia misschien als polyfosfaten, die gesynthetiseerd werden op uitgedroogde oppervlakten en steeds weggewassen werden in de waterige omgeving (waardoor deze stoffen continu werden aangevoerd), op de manier van een 'continucultuur'.

Een protocel, die gedeeltelijk samengesteld is uit polypeptide-materiaal, zal ook katalytische activiteit bezitten. Er bestaan aanwijzingen dat thermisch gepolymeriseerde aminozuren beperkte katalytische ac-

tiviteit bezitten in verschillende soorten reacties (Fox & Dose, 1972). De efficiëntste katalysatoren zouden geselecteerd kunnen worden door verschillen in snelheid van protocellulaire vermenigvuldiging. De verschillen in de efficiëntie vloeien voort uit de verschillen in de volgorde van de aminozuren in de polypeptiden. Thermisch gesynthetiseerde polypeptiden bezitten namelijk geen willekeurige aminozuurvolgorde. De natuurlijke verschillen in de reactiviteit en fysiochemische eigenschappen van de aminozuren zelf vormen een zeer primitieve blauwdruk voor de aminozuurvolgorde. Het aantal werkelijke aminozuursequenties dat aangetroffen wordt in synthetische polypeptiden is veel kleiner dan het totale aantal dat mogelijk is bij een bepaalde aminozuursamenstelling (Harada & Fox, 1975).

Ontwikkeling van een genetische code

In dit overzicht kan ik natuurlijk niet alle ideeën over prebiotische evolutie onder de loupe nemen. In het voorafgaande is de nadruk gelegd op een speciaal, misschien tamelijk ongewoon, model. We zullen nu de aandacht richten op de polynucleotiden. Het conventionele standpunt houdt in dat polynucleotiden nodig zijn om de kopiëring van polypeptiden mogelijk te maken. Het tegenwoordige systeem van vererving is gebaseerd op autokatalytische kopiëring van polypeptiden en polynucleotiden, elk afhankelijk van elkaar. Polynucleotiden zijn in staat hun eigen kopiëring te sturen door middel van een Watson-Crick paring, doch zij hebben geen eigen katalytische functie en hebben polypeptiden nodig voor hun reproduktie. Anderzijds kunnen polypeptiden, hoewel in staat tot katalyse van hun eigen synthese, niet optreden als blauwdrukken om een speciale aminozuurvolgorde te reproduceren. Het is echter duidelijk dat de polypeptiden de veelzijdigste zijn van deze twee groepen van molekulen.

In het voorafgaande werd vermeld dat polypeptiden en hun bouwstenen, de aminozuren, gemakkelijk gevormd worden onder zeer eenvoudige omstandigheden. Ze zullen zeker in een zeer vroeg stadium aanwezig zijn geweest op de primitieve aarde. De polynucleotiden stellen ons echter voor een veel moeilijker probleem. Ondanks vele jaren van proefnemingen in talrijke laboratoria, is het niet mogelijk geweest de samenstellende delen van polynucleotiden aaneen te koppelen, of zelfs maar sommige delen op een eenvoudige manier te synthetiseren. Dat wil niet zeggen dat het ook niet mogelijk is, maar

we moeten de mogelijkheid niet uitsluiten dat primitieve polypeptiden het eerst zijn ontwikkeld en door hun katalytische activiteit de synthese van polynucleotiden mogelijk hebben gemaakt. Eenmaal gesynthetiseerd kunnen dan de polynucleotiden opgenomen zijn in verschillende soorten zichzelf kopiërende protocellen. Toen dat stadium eenmaal bereikt was, zou de verdere evolutie naar de tegenwoordige genetische code snel hebben kunnen plaatsvinden.

Het ontstaan van het leven

Velen zullen misschien zeggen dat het leven ontstaan is op het moment dat het tegenwoordige genetische systeem, gebaseerd op DNA, bereikt was. Anderen zullen kiezen voor de eerste zichzelf kopiërende associatie tussen polypeptiden en polynucleotiden, hoe inefficiënt deze ook mocht zijn. Ik laat de keuze gaarne aan de lezer over. Het lijkt mij echter niet mogelijk een datum voor het ontstaan van het leven vast te stellen. Stelt U zich immers het enorme aantal verschillende plaatsen voor, en de verschillen tussen deze plaatsen op de primitieve aarde. Het is zeer onwaarschijnlijk dat gunstige condities voor het ontstaan van het leven zich slechts éénmaal ontwikkeld hebben, of slechts op één plaats. Sommige evolutielijnen hebben nergens toe geleid, maar andere moeten vele malen en op vele plaatsen hebben geleid tot zichzelf kopiërende systemen. Systemen die opklimmen van eenvoudig tot ingewikkeld, uiteindelijk gerangschikt in groepen van eenheden, die we kunnen herkennen als 'levend', maar zonder scherpe grenzen tussen de stadia. Daarom is de vraag betreffende de biotische of prebiotische aard van vroege Precambrische microstructuren mogelijk zinloos. Het tegenwoordige genetische systeem werd misschien miljarden jaren geleden in zijn huidige staat bevroren. Maar het evolutionaire pogen en falen dat hieraan vooraf ging, blijft voor ons misschien voor altijd verborgen.

De rol van microben in het evolutieproces

LYNN MARGULIS[1]

Inleiding

Alle werkers met de lichtmicroscoop (microbiologen, protozoölogen, celbiologen, histologen, micro-paleontologen, cytogenetici en wat dies meer zij) zijn min of meer afstammelingen van de Nederlandse school van microbiologen en van haar grote voorganger, de Delftenaar Antoni van Leeuwenhoek. Deze hield zich als waarnemer en onderzoeker met alles, maar wel in het bijzonder met de 'animalculi', in de natuur bezig. De natuur was voor Van Leeuwenhoek een samenhangend geheel, waarvan hij een nieuw gebied voor studie toegankelijk maakte. Graag wil ik Van Leeuwenhoeks uitgangspunt – al het kleine is het bestuderen waard – tot het mijne maken.

Wanneer we in de neo-Darwinistische opvattingen over het evolutieproces de prokaryoten en eukaryoten niet als gescheiden groepen beschouwen, komen we eigenlijk vanzelf tot de opvatting dat de eukaryote cel met zijn organellen als de mitochondriën en plastiden, is ontstaan uit een samenspel van meerdere prokaryoten door middel van erfelijke symbiose. Deze opvatting zal, met de argumenten, in dit hoofdstuk centraal staan. Aanvaarding van dit concept (de 'Serial Endosymbiosis Theory', Taylor, 1974) houdt in dat vanuit symbiontische relaties tussen micro-organismen, zoals die in de evolutie algemeen voorkomen, aanwijzingen voor de endosymbiose-theorie gevonden kunnen worden. Dit is aanleiding om de 'animalculi' wederom aan een nauwgezet onderzoek te onderwerpen, op dezelfde wijze zoals

1. Deze bijdrage is een bewerking van het artikel The microbes' contribution to evolution, dat door dr. Lynn Margulis is geschreven voor het tijdschrift BioSystems 7: 266–292 (1975). Dit artikel vormde tevens de basis voor de lezing die zij op het symposium heeft uitgesproken. Vertaling en bewerking: dr. D. van der Mei, in samenwerking met prof. dr. ir. G. D. Vogels.

Van Leeuwenhoek dat deed, zij het met de fijnere analysetechnieken die ons thans ter beschikking staan.

Pas in de laatste tijd is een samenhangend overzicht van werk en waarnemingen van Van Leeuwenhoek tot stand gekomen. De meeste biologen komen tijdens studie of werk nauwelijks in aanraking met de objecten die zo boeiend door Van Leeuwenhoek zijn beschreven. Mede hierdoor is de relatief geringe aandacht te verklaren die wordt geschonken aan het ingewikkelde samenspel tussen de 'animalculi', een samenspel dat dikwijls leidt tot symbiose. Onder erfelijke (of cyclische) symbiose zullen wij verstaan de vorm van symbiose waarbij twee of meer partners van verschillende soorten gedurende hun gehele levenscyclus in een vaste relatie met elkaar verbonden zijn.

De ruim twee eeuwen na Van Leeuwenhoek ontstane Delftse school, met als belangrijkste exponenten Beyerinck, Kluyver en Van Niel, heeft sterk bijgedragen tot de integratie van de micro-organismen en de microbiologie in de biologische wetenschappen en tot een verruiming van het biologische denken met principes uit de microbiologie. De opvattingen van deze school zijn in het bijzonder vastgelegd in publikaties zoals 'The microbes' contribution to biology' (1956) van Kluyver & Van Niel, 'The concept of a bacterium' van Stanier & Van Niel (1962) en in het tegen het einde van de vijftiger jaren gepubliceerde boek 'The microbial world' (1957) van Stanier, Adelberg & Doudoroff. Dit laatste boek geeft samen met recenter uitgaven een wél omlijnd beeld van het wezen van de bacteriële animalculi.

Het idee echter dat microben, net als metazoa en de groene planten, het produkt zijn van een neo-Darwinistisch evolutie-proces verkeert nog geheel in het ontwikkelingsstadium. Vrijwel niemand durft zich nu al als 'evolutionair microbioloog' te presenteren. Toch zal de steeds groter wordende activiteit op dit gebied vroeg of laat leiden tot het ontstaan van het vak 'evolutionaire microbiologie'. Onderwerp van deze tak van wetenschap zijn de vele vragen over de tijd waarin het leven op aarde geheel door de micro-organismen werd beheerst, van omstreeks $3{,}5 \times 10^9$ tot $0{,}6 \times 10^9$ jaar geleden (Barghoorn, 1974; Ponnamperuma, 1971; Ponnamperuma & Buvet, 1971; Schopf, 1974; Barghoorn, 1971; Dose et al., 1974; Walters, 1975). Juist voor dit soort onderzoek, dat veelal verschijnselen die wij thans kunnen waarnemen zal moeten transponeren naar die vervlogen tijden, is de lichtmicroscoop, zoals die ontwikkeld werd door Van Leeuwenhoek, nog

steeds van primair belang.

De endosymbiose-theorie als ontstaansmodel voor de eukaryote cel

De meest uitgesproken vorm van de endosymbiose-theorie zal als uitgangspunt worden genomen. Deze theorie stelt dat de mitochondria, de plastiden en structuren zoals flagellen en cilia hun oorsprong vinden in een erfelijk endosymbiontisch proces. Hoewel velen de veronderstelling dat plastiden en mitochondria op deze wijze zijn ontstaan nog wel willen accepteren (Taylor, 1974; Lipmann, 1974; Schnepf & Brown, 1971; John & Whatley, 1975a, b), is er tot op heden vrijwel niemand die ook het ontstaan van flagellaire systemen van de eukaryote cel vanuit de endosymbiose-theorie verklaard wil zien. Toch wil ik in het navolgende, ook al omdat de theorie in vrijwel alle aspecten te toetsen zal blijken, deze organellen in het geheel van aanwijzingen betrekken, en ze als onderdeel van de endosymbiose-theorie behandelen.

Alle organismen op aarde zijn ontstaan vanuit de anaërobe fermenterende, heterotrofe prokaryoten. Het lijkt aannemelijk dat de universele genetische code, zoals die zich manifesteert in de nucleotidevolgorde van het DNA bij de thans levende organismen, gelijk is aan die welke we in deze oervorm van leven aantreffen.

Gedurende het vroege Precambrium ontstonden, als gevolg van adaptatie aan selectiedruk, vele soorten onder de prokaryoten, die vooral verschilden in de wijze waarop zij hun voedingsstoffen metaboliseerden. Zo ontstonden de mycoplasma-achtige fermenterende prokaryoten (die in staat waren glucose in afwezigheid van zuurstof af te breken tot pyrodruivezuur via de Embden-Meyerhofweg), de spirocheten, de fotosynthetiserende, zuurstof producerende prokaryoten (de bolvormige blauw-groene algen) en de aërobe gram-negatieve eubacteriën, die in staat waren om kleine organische molekulen, zoals pyrodruivezuur, te verbranden tot CO_2 en H_2O met behulp van de citroenzuurcyclus (Sagan, 1967; Margulis, 1970, 1971b, 1972a, b, 1975a, b).

Volgens de endosymbiose-theorie bestond de eerste stap naar het ontstaan van de eukaryote cel uit het verschijnen van 'proto-mitochondriën' in de prokaryote cel, doordat een anaërobe, fermenterende prokaryoot ging optreden als gastheer voor een aërobe gram-negatieve bacterie, met citroenzuurcyclus, en hiermee een erfelijke symbiose

aanging. Deze associatie, oorspronkelijk tot stand gekomen vanuit een relatie predator-prooi tussen de gastheer en het binnendringend organisme, leidde tot het ontstaan van amoeboïde cellen met mitochondriën, van waaruit alle eukaryoten zijn geëvolueerd (Hall, 1973).

Over het proces van de opname van een bacterie in een andere prokaryote cel bestaan nogal wat vraagtekens. De verschijnselen pinocytose en fagocytose, waardoor eukaryote cellen in staat zijn relatief grote partikels in zich op te nemen, komen bij de prokaryoten niet voor (Stanier, 1970). Mogelijk vormt de wijze waarop *Bdellovibrio* in staat is bacteriën te infiltreren een aanwijzing hoe we ons het proces van opname van een gram-negatieve bacterie door een bacteriële gastheer moeten voorstellen, hoewel het hier gaat om een infiltratie tussen celwand en celmembraan (zie Starr & Seidler, 1971 en Starr, 1975).

Ook over de aard van het opgenomen organisme kan iets gezegd worden. De elektronentransportketen die we aantreffen in de mitochondriën van eukaryoten komt zeer sterk overeen met die van *Paracoccus (Micrococcus) denitrificans*, een facultatief aërobe bacterie (John & Whatley, 1975a). De kleine verschillen zijn te verklaren als een adaptatie van de elektronentransportketen van *Paracoccus* aan een rol die geheel intracellulair is. De inbouw van dergelijke, zich tot mitochondriën ontwikkelende aërobe, gram-negatieve bacteriën kan veel verdergaande gevolgen hebben: deze organismen waren bijvoorbeeld in staat tot de biosynthese van steroïden, waardoor endoplasmatische membranen en de kernmembraan konden worden opgebouwd. De selectiedruk die geleid heeft tot de vorming van de kernmembraan, kan mede tot stand zijn gekomen doordat het DNA beschermd moest worden tegen de oxiderende omstandigheden in het cytoplasma dat de mitochondriën omgaf.

De tweede belangrijke symbiontische stap bestond uit het samengaan van amoeboïden die mitochondriën bevatten, met zeer beweeglijke anaërobe bacteriën, mogelijk spirocheten. Deze stap leidde (uiteraard na vele mutaties en intracellulaire overdracht van genenmateriaal van gast naar gastheer) tot het ontstaan van amoeboflagellaten, ciliaten en andere protisten. De spirocheten evolueerden hierbij tot de zogenaamde '9+2'-homologen (structuren waarin microtubuli zijn gerangschikt in een karakteristiek patroon, bestaande uit twee microtubuli in het midden omgeven door negen paren in een cirkel), zoals de basale lichaampjes, ciliën en flagellen.

Verder langs deze lijn doordenkend kan ook de spoelfiguur, zoals

deze optreedt tijdens de celdeling afgeleid gedacht worden uit het samengaan van amoeboïde organismen met beweeglijke bacteriën (zie Margulis, 1970, 1974b; Pickett-Heaps, 1974). Vervolgens kreeg, als laatste stap in de endosymbiosetheorie, de heterotrofe eukaryote cel het vermogen tot fotosynthese. Dit proces wordt gedacht als een niet door vertering gevolgde opname van blauw-groene algen door protisten onder omstandigheden waarin weinig voedsel beschikbaar was. Hierdoor ontstonden eerst obligaat symbiontische plastiden in de verschillende van kernen voorziene algensoorten, en vervolgens de chlorofyten en de meercellige groene planten.

Aldus redenerend komt men tot de conclusie dat alle eukaryote cellen zijn afgeleid uit tenminste twee onafhankelijke genomen: dat van de gastheercel en dat van de protomitochondriële infiltrerende cel.

Voor het ontstaan van de meeste heterotrofe eukaryoten zijn drie genomen vereist: dat van de gastheer, dat van het protomitochondrieel organisme en dat van de beweeglijke bacteriën, van waaruit zich flagellen of ciliën ontwikkelden. Voor de fotosynthetiserende organismen komt hier nog een vierde genoom bij: dat van de blauw-groene algen die zich ontwikkelen tot plastiden (fig. 1).

Dit verschil in aantal genomen dat een bepaald celtype karakteriseert, was voor Taylor (1974) aanleiding om voor te stellen het algemene begrip cel te vervangen door *monade* voor de prokaryote cel, *diade* voor de heterotrofe eukaryote cel en *triade* voor de fotosynthetiserende eukaryote cel. Deze naamgeving brengt tot uitdrukking dat deze cellen zijn ontstaan uit één eenheid (de prokaryote cel), twee eenheden (de prokaryote cel + mitochondrion), of drie eenheden (de prokaryote cel + mitochondrion + plastide), welke eenheden alle eiwit synthetiseren en aan een membraan gebonden zijn. Het flagellair-mitotisch systeem is niet ingebouwd in deze naamgeving: het genoom van de beweeglijke bacteriën is hierbij geheel geïntegreerd in het complexe eukaryote genoom en bezit geen eigen identiteit meer, dit in tegenstelling tot dat van de mitochondriën en plastiden.

Wanneer de respectievelijke celtypen zijn gegroepeerd tot meercellige systemen, dan wordt de naamgeving polymonaden (voor filament of mycelium vormende prokaryoten), polydiaden (voor onder meer slijmschimmels, ascomyceten, metazoa) en polytriaden (voor onder meer de bryophyta, tracheophyta, bruine en rode eukaryote zeegrassen). Vanuit deze terminologie kan een bruikbaar systeem voor naamgeving van meer complexe celsystemen worden ontwikkeld (Margulis, 1975b).

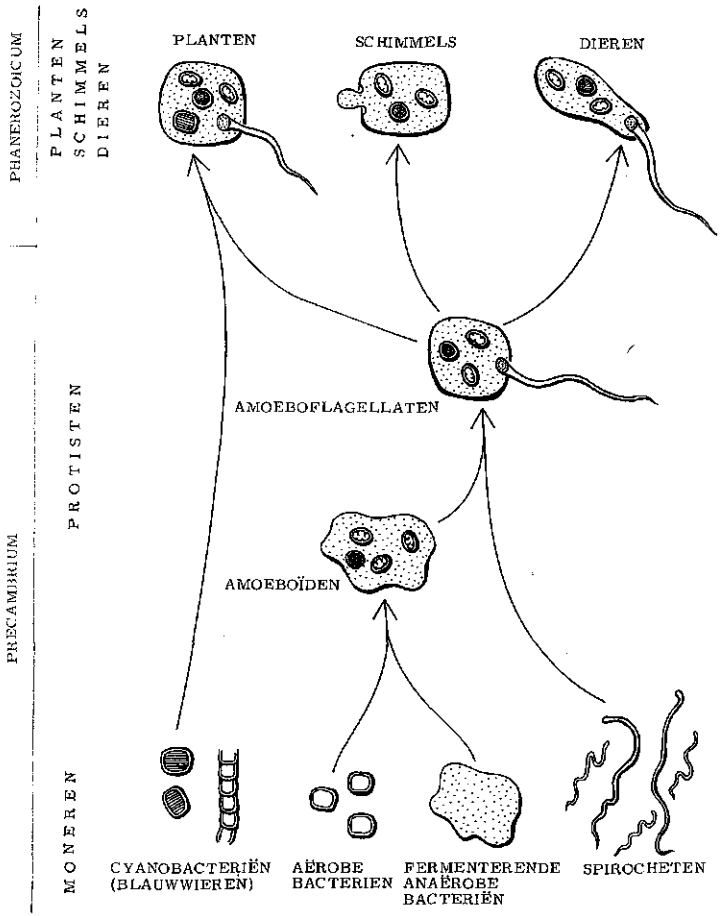


Fig. 1. Model voor de symbiontische oorsprong van organellen in eukaryoten. Zie voor details: Margulis, 1970.

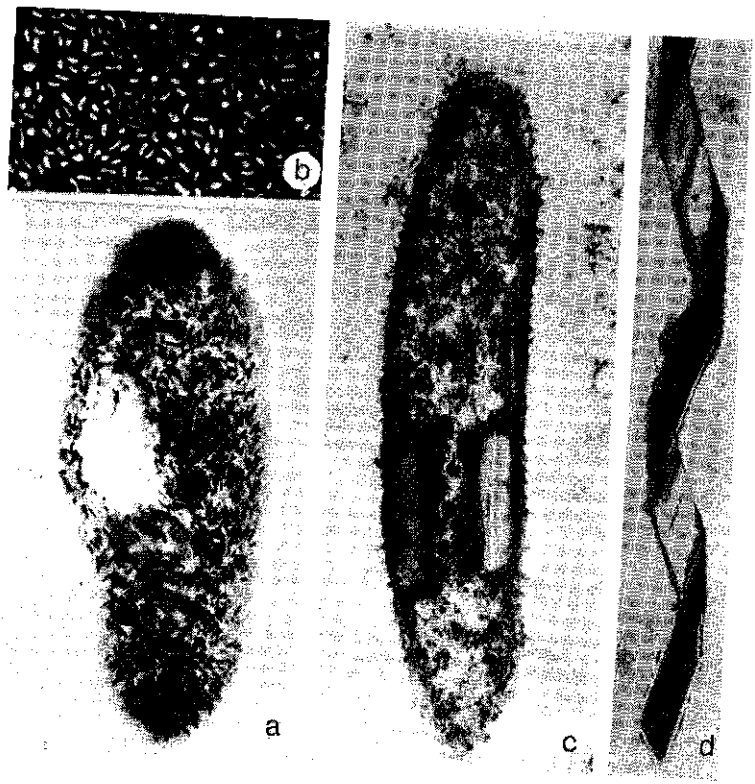
De aanwijzingen voor de endosymbiose-theorie

Zelden zal men het verloop van processen die in het verleden hebben plaatsgevonden met volledige zekerheid kunnen vaststellen. Evolutiebiologen moeten, net als historici, aangeven welke beschrijving van een opeenvolging van complexe, niet terug te draaien gebeurtenissen in het verleden het meest plausibel is. De aanvaardbaarheid van deze

beschrijving wordt groter naarmate meer verschijnselen in de tegenwoordige tijd ermee verklaard kunnen worden. Er zal nu worden nagegaan in hoeverre toetsing van de endosymbiose-theorie, zoals die in het voorgaande is geschetst, aan thans waarneembare structuren of processen mogelijk is, en welke voorspellingen kunnen leiden tot ondersteuning van de theorie.

Het genetisch gedrag van cel-organellen

Het pantoffeldiertje (*Paramecium aurelia*) kent een variant met het zogenaamde 'killer'-fenotype, dat door middel van cytoplasmatische factoren wordt overgedragen en daardoor een ander verdelingspatroon over de populatie te zien geeft dan te verwachten valt uit de wetten van Mendel (Sonneborn, 1959). Toch bestaat er een relatie



tussen deze cytoplasmatische factor en de genen in de kern: de K-genen in de kern zijn nodig voor de handhaving van de 'killer'-eigenschap, de S-genen in de kern onderdrukken deze juist. Het 'killer'-fenotype blijkt nu gecorreleerd te zijn met het voorkomen van endosymbiontische bacteriën in het cytoplasma die met een virus zijn geassocieerd (Beale et al., 1969; Preer et al., 1974) (fig. 2). Het gedrag van deze zogenaamde 'kappa-deeltjes' vertoont zeer veel overeenkomst met dat van mitochondriën en plastiden. De voor de hand liggende conclusie lijkt dan ook te zijn dat deze organellen, net als de 'kappa'-deeltjes, hun bestaan zijn begonnen als vrij levende prokaryoten die steeds meer afhankelijk werden van produkten van de genen in de kern. In de literatuur zijn zeer veel aanwijzingen te vinden voor het ontstaan van mitochondriën en plastiden uit prokaryote symbionten (zie M. M. K. Nass, 1969, 1971; S. Nass, 1969; Cohen, 1970, 1973; Pigott & Carr, 1972; Ebringer, 1972). Deze aanwijzingen hebben onder meer betrekking op het sexuele gedrag van mitochondriën en chloroplasten, dat zeer veel overeenkomst vertoont met dat van prokaryoten.

Over de wijze waarop de genetische wisselwerking tussen gastheercel en het binnendringend celtype tot stand komt is nog weinig te

Fig. 2. Voorbeelden van bacteriële symbionten in Paramecium aurelia.
a. Paramecium *met 'lambda'-symbionten, de talrijke donker getinte staafjes die de cel opvullen (fase-contrast, 300 ×, osmium-lacto-orceïnepreparaat van stock 239-syngen4. John Preer, University of Indiana.*
b. Gezuiverd preparaat van 'kappa-deeltjes' (bacteriën). De deeltjes met een karakteristieke V-vorm bevatten een bolvormig lichaampje met een sterk lichtbrekend vermogen. Deze zogenaamde R-lichaampjes hangen vermoedelijk samen met het voorkomen van de viruspartikeltjes die verantwoordelijk zijn voor de 'killer'-eigenschap: het doden van paramecia die geen 'kappa-deeltjes' bevatten. Ongefixeerd, negatief fase-contrast, 990 ×. C. Kung, University of California.
c. Elektronenmicroscopische opname van een dwarsdoorsnede van Paramecium, *met daarin in lengtedoorsnede een 'kappa-deeltje' met R-lichaampje. In het R-lichaampje zijn donker getinte virus-achtige deeltjes zichtbaar. Het R-lichaampje is omgeven door een dun membraan, dat zich aan weerskanten tot buiten het R-lichaampje uitstrekt. 36 000 ×. Preer et al., 1974. Met toestemming van Genetical Research.*
d. Elektronenmicroscopische opname van een ontrold R-lichaampje, eindigend in een scherpe hoek en aan de top stomp en onregelmatig gevormd. 18 000 ×.

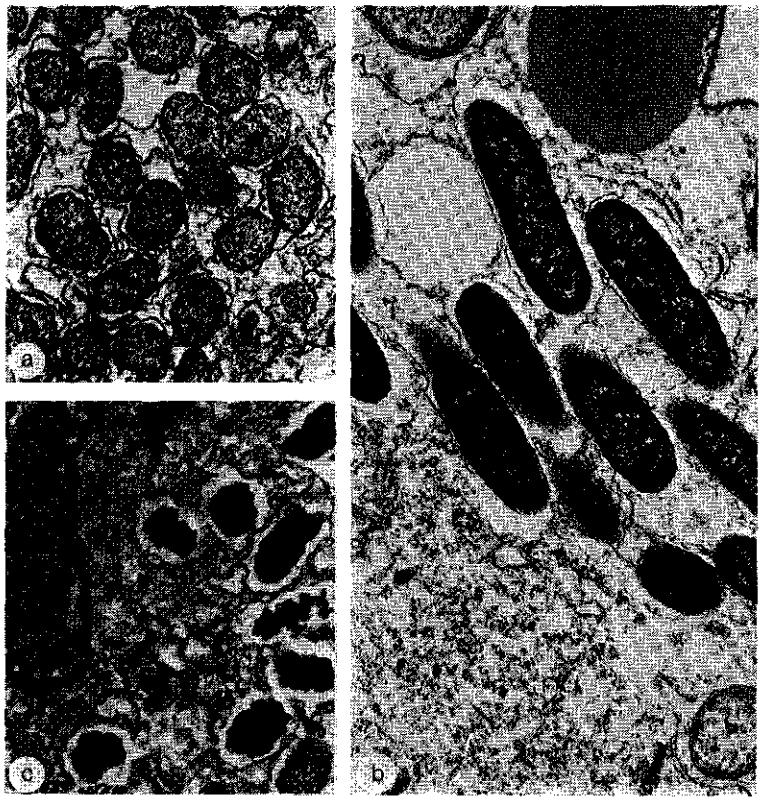


Fig. 3. Het effect van kerntransplantatie op symbiontische micro-organismen in amoeben. Deze amoeben bevatten mitochondriën, 'DNA-bevattende lichaampjes' en een recent door endosymbiose opgenomen bacteriepopulatie.

a. Elektronenmicroscopische opname van normale Amoeba discoides *waarin de 'DNA-bevattende lichaampjes' de normale morfologie vertonen (een tros van deeltjes die elk omgeven zijn door een membraan).*

b. Elektronenmicroscopische opname van Amoeba discoides *met daarin opgenomen twee soorten micro-organismen. Kerntransplantatie heeft op deze recent verworven symbionten relatief de minste invloed, hetgeen wijst op een nog geringe afhankelijkheid van de genen in de kern.*

c. Elektronenmicroscopische opname van een hybride cel, gevormd door de kern van Amoeba proteus *te brengen in het cytoplasma van* Amoeba discoides. *Let op de abnormale morfologie van mitochondriën en 'DNA-bevattende lichaampjes'. Deze hybride is niet levensvatbaar. K. Jeon, University of Tennessee.*

zeggen. De studie aan nieuwe bacterie-amoebeassociaties (Jeon, 1972) (fig. 3) kan aanwijzingen verschaffen op welke wijze de gastheerkern steeds afhankelijker wordt van de produkten van de symbiont. Een overzicht van de hierop betrekking hebbende literatuur wordt gegeven in Margulis (1975b).

De fylogenie van protisten

Zoölogen en botanici zijn er nooit in geslaagd om met hun systemen een eenduidige classificatie van de lagere eukaryoten te geven. Door

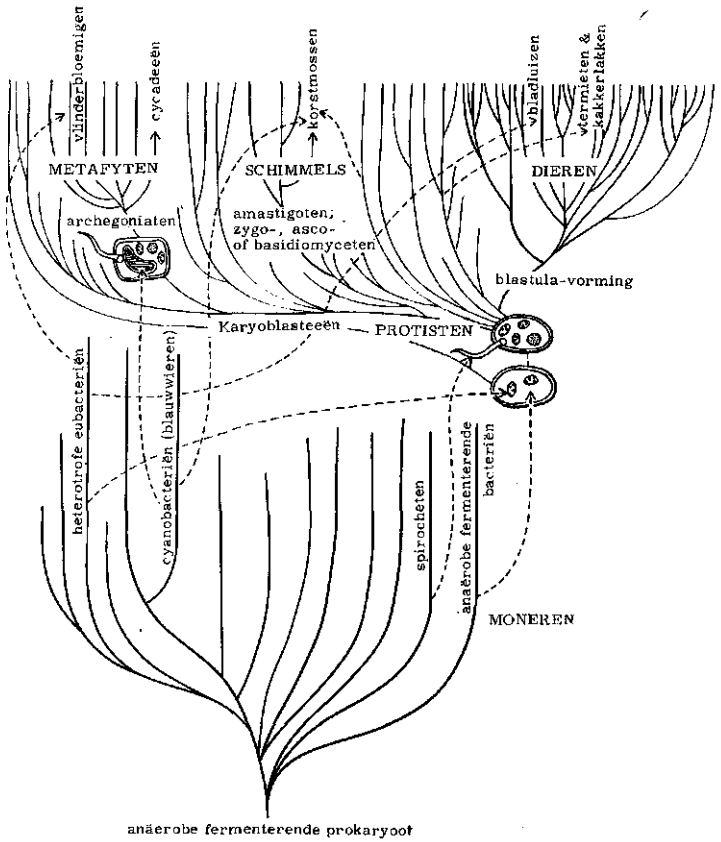


Fig. 4. Rol van symbiose in de oorsprong van de hogere taxa.

nu bepaalde groepen, zoals de korstmossen en de chlorofyte algen, te beschouwen als produkten van symbiose, wordt het beeld van de onderlinge relaties in deze groepen veel duidelijker, hetgeen leidt tot een eigen overzichtelijke fylogenie en taxonomie (Whittaker, 1969, 1975; Margulis 1974a, c; Leedale, 1974) (fig. 4).

Het microfossiele Precambrium

Wanneer het ontstaan van de eukaryote cel wordt verklaard vanuit de endosymbiose-theorie, is het begrijpelijk dat een zeer lange ontwikkeling van prokaryoten aan het ontstaan van eukaryote cellen vooraf moet zijn gegaan. Hiermee is dan tevens een acceptabele verklaring gevonden voor het feit dat de eukaryoten in de fossiele historie vrij abrupt verschijnen bij de overgang van het Precambrium, dat gekenmerkt wordt door het ontstaan van een rijk gevarieerd microbieel leven, naar het Fanerozoïcum (Barghoorn, 1974; Margulis, 1972c).

Andere voorbeelden

De endosymbiose-theorie kan een verhelderend licht werpen op een groot aantal, onderling zeer uiteenlopende verschijnselen. Zo leidde de opvatting dat microben produkten zijn van een neo-Darwinistisch evolutieproces, dat resulteerde in een grote verscheidenheid in metabole kenmerken, mede tot het in juiste volgorde zetten van bepaalde gebeurtenissen in de evolutie van de aardse atmosfeer (Cloud, 1974; Lovelock & Margulis, 1974a, b; Margulis & Lovelock, 1974; Walker, 1975). De uit de theorie volgende homologie tussen de vorming van flagellen vanuit de complexe (9+2)-rangschikking van de microtubuli en het bewegingsproces van de chromosomen tijdens de mitose, heeft geleid tot het gebruiken van melatonine en andere tegen tubuline gerichte stoffen voor het stoppen van de mitose (Banerjee & Margulis, 1973; Margulis, 1973; Banerjee et al., 1975). Op basis van de homologie tussen de flagellaire en ciliaire systemen bij eukaryoten, ontwikkelde Atema (1973) een geheel nieuwe theorie over de sensorische overdracht bij geluids-, smaak- en lichtwaarneming.

Ook het specifieke effect van antibiotica gericht tegen het bacteriële systeem voor eiwitsynthese (zoals chlooramfenicol en streptomycine) op de eiwitsynthese in mitochondriën en plastiden, maakt een bacteriële oorsprong van deze organellen aannemelijk. Door gebruik

te maken van deze antibiotica werd een beter inzicht verkregen in de afzonderlijke rol van de eiwitsynthese in deze celorganellen ten opzichte van die in de eukaryote gastheercel (Ebringer, 1972).

In chloroplasten komen biosynthesewegen voor die redundant zijn, met dien verstande dat ze ook in het metabole systeem van de gastheer voorkomen, en er eigenlijk geen behoefte aan is (bijvoorbeeld voor meervoudig onverzadigde vetzuren, Jacobson et al., 1973). Ook dit laat zich verklaren vanuit de veronderstelling dat chloroplasten van oorsprong als vrij levende organismen voorkwamen en zich later 'genesteld' hebben in de eukaryote cel.

Vanuit het besef dat het Precambrium geheel gedomineerd werd door prokaryoten, ontstaan nieuwe samenwerkingsverbanden, zoals die tussen ecologen die de levensgemeenschappen van de blauw-groene algen bestuderen en geologen die het Precambrium tot studiegebied hebben (zie bijvoorbeeld Walters, 1975; Golubic, 1973).

Hypothese en toetsing

Er kan een groot aantal experimenten bedacht worden om de endosymbiose-theorie te toetsen. Zo zullen op grond van de afstammingsgeschiedenis homologieën moeten worden gevonden tussen eiwitten, DNA's en RNA's van mitochondriën en van aërobe bacteriën; van chloroplasten en van blauw-groene algen. Ook moeten er overeenkomsten bestaan tussen de primaire structuur van eiwitten in flagellen, ciliën en spoelfiguren en de primaire structuur van bepaalde spirocheten-eiwitten. Andere voorspellingen van de endosymbiose-theorie kunnen leiden tot toetsbare uitspraken rond het ontstaan van de gewone en de reductiedeling.

Verschillen in de wijze waarop de mitose geschiedt bij lagere eukaryoten zullen blijken te berusten op fylogenetische grondprincipes, terwijl ook aanwijzingen gevonden moeten kunnen worden voor het onafhankelijk ontstaan van meiose in verschillende protisten-lijnen, analoog aan de wijze waarop in verschillende vertebratenlijnen het vermogen ontstond om de lichaamstemperatuur op een bepaalde waarde te handhaven.

Organellen van cellen met een hoog ontwikkeld genetisch overdrachtssysteem (zoals gisten, metazoa en metafyta) zullen ten opzichte van organellen in lagere eukaryoten, zonder een eumitotisch sexueel overdrachtssysteem, een minder autonoom systeem voor eiwitsynthese

moeten bezitten. Te verwachten valt dat mitochondriën en chloroplasten in vitro te kweken zijn, waarbij aan het medium met name externe factoren toegevoegd moeten worden, die gecodeerd zijn in de genen van de celkern en die op de 80-S ribosomen worden afgelezen (het cytoplasmatische systeem voor eiwitsynthese in de eukaryote cel). Celorganellen van endogene oorsprong (zoals het Golgi-apparaat, pigmentgranula, lysosomen, kernen) zullen daarentegen nooit in vitro te kweken zijn, omdat ze geen eigen replicerende structuren bezitten. Ook de 'biologische klok', het circadiane ritme dat zo karakteristiek is voor de eukaryote cel, zal mogelijk terug te voeren zijn op het feit dat eukaryote cellen zijn opgebouwd uit meer dan één genoom (diaden en triaden). Deze genomen werken vooral bij het coderen van de eiwitten die betrokken zijn bij de synthese van complexe eindprodukten met een sterk selectieve werking (zoals bepaalde alkaloïden, toxinen, steroïden, licheenzuren), op een ingewikkelde wijze samen.

Door uit te gaan van de endosymbiose-theorie zal een eenduidige fylogenie voor de hogere taxonomische niveaus (zoals die thans reeds bestaat voor de tracheofyten en de chordata) geformuleerd kunnen worden die voor botanici, zoölogen en microbiologen acceptabel is, en die uitgaat van de prokaryote oorsprong van celorganellen.

Deze opsomming geeft aan in welke richtingen de experimenten, waarvan er veel reeds worden uitgevoerd, zij het met andere doeleinden voor ogen, ter ondersteuning van de endosymbiose-theorie gedacht kunnen worden, en tot welke resultaten zij kunnen leiden.

Alternatieve theorieën voor het ontstaan van organellen

Uiteraard is de endosymbiose-theorie in het voorafgaande op een nogal indringende wijze naar voren gebracht als dé verklaring voor het ontstaan van celorganellen. Taylor (1974, 1975) heeft een zeer volledig overzicht gegeven van de verschillende alternatieven voor de endosymbiose-theorie, met name voor het ontstaan van mitochondriën en plastiden; hij heeft hiervoor ook argumenten gezocht in de nieuwste gegevens zoals deze naar voren komen vanuit de celbiologie en de molekulaire biologie.

De lezer wordt voor deze, mijns inziens minder met de feiten overeenstemmende alternatieven, verwezen naar de publikaties van Taylor en naar die van de grootste voorstanders van de non-symbiontische opvatting, Allsopp (1969), Raff & Mahler (1972), Raff (1975), Perl-

man & Mahler (1970) en Uzzell & Spolsky (1974). Voor een discussie over deze opvattingen zie Margulis (1975a).[1]

Classificatie van alle levende organismen in vijf rijken

Door Whittaker (1959, 1969) werd een indeling ontworpen waarmee alle levende organismen op ecologische grondprincipes konden worden ingedeeld in vijf rijken: één prokaryotenrijk en vier eukaryotenrijken. De indeling ging niet erg ver, zij omvatte alleen de rijken en de stammen. Met behulp van de uitgangspunten van de endosymbiosetheorie is dit systeem uit te bouwen tot een alle taxa omvattend geheel, zoals dat in fig. 1 is weergegeven (voor een meer gedetailleerde weergave zie het 'Handbook of genetics' (Margulis, 1974a). In dit schema is de hypothetische rol die symbiose speelt in het ontstaan van de hogere taxa, terug te vinden. Het bevat vele bekende groepen met stabiele symbiontische associaties en het is in overeenstemming met de gegevens uit de ontwikkelingsbiologie. Terwijl het duidelijk is dat symbiose een rol speelt in het ontstaan van hogere taxa, is de grootte van deze rol nog niet vast te stellen.

Het gemodificeerde vijf-rijkenschema van Whittaker bevat de volgende groepen:

- Moneren (alle prokaryoten; monaden)
- Protisten (verschillende groepen asexuele en eumitotische eukaryoten, met variaties in ploïdie en systemen van mitose; diaden en triaden)
- Fungi (haploïde en dikaryote vormen zonder flagellen; zygo-, asco- en basidiosporevormers, voeding door middel van absorptie; diaden)
- Dieren (diploïde metazoa, die zich vanuit een blastula ontwikkelen, voeding door middel van externe of interne vertering; diaden)
- Planten (fotoautotrofe organismen met archegonia, embryofyten; triaden).

Dit schema, waarin de moneren de basis vormen van de vier andere rijken, geeft een verdere differentiatie dan het twee-rijkensysteem van Taylor (1974), dat alleen prokaryoten en eukaryoten onderscheidt.

1. Noot bewerker: ook wordt gewezen op een nieuwe theorie van Cavalier-Smith die de eukaryote cel met zijn organellen en systemen voor genetische overdracht laat ontstaan vanuit één prokaryoot celtype, en wel een blauwgroene alg, zonder celwand, die in staat is tot fagocytose (Nature, 1975, 256: 463).

Het idee om de fungi als een apart (sub)rijk op te vatten wordt door de mycologen geaccepteerd (Ainsworth et al., 1973), waarbij echter nog geen scheiding wordt aangebracht tussen vormen met en zonder flagellen.

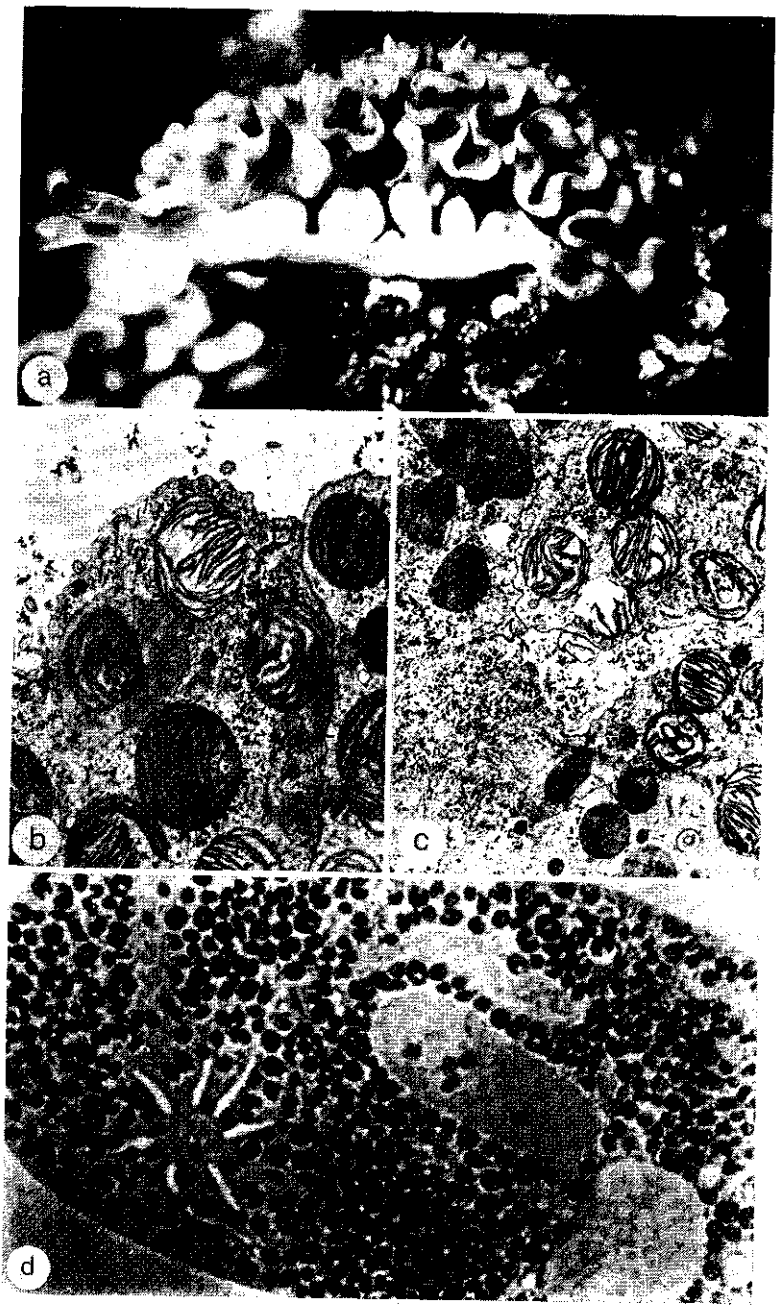
Convergentie in de evolutie van microben

Convergentie, het verschijnsel dat overeenkomstige structuren worden aangetroffen in niet-verwante organismen, is veelal een gevolg van beperkingen die door de omgeving aan organismen worden opgelegd. Convergentie vinden we onder meer bij de vleugels van fossiele reptielen, vleermuizen, vogels en insekten; bij de tegen uitdroging bestendige sporevormen van clostridiën, myxococci, cellulaire slijmzwammen en ascomyceten; bij de opvallende bescherming biedende zwart-wit tekening van de clown-vis en zebra's. Enkele voorbeelden van convergentie in micro-organismen zijn vermeld in tabel 1.

Mesodinium: *de ontwikkeling van het vermogen tot fotosynthese in de eukaryote cel*

Gebrek aan koolhydraten of andere organische voedingsbronnen en het ontbreken van voldoende bewegingsmogelijkheden tot ontsnapping aan predatoren of ongunstige verblijfsomstandigheden vormen twee van de belangrijkste middelen tot selectiedruk in de natuur. Fotosynthetiserende organismen worden door deze twee factoren relatief het minst beïnvloed, en zijn dan in het algemeen ook niet toegerust met een bewegingsapparaat. Toch zijn er in de evolutie voorbeelden te vinden van fotoautotrofe organismen die beweeglijk zijn; deze eigenschap werd verkregen door het samengaan met een niet-fotosynthetiserend, beweeglijk organisme. Een dergelijke symbiontische ontstaanswijze ligt voor de hand bij de fotosynthetiserende pantoffeldiertjes, kwalpoliepen en weekdieren (fig. 5). Aanwijzingen voor een dergelijke

Fig. 5. Ontstaan van fotosynthetiserende organismen vanuit een samengaan van niet-fotosynthetiserende beweeglijke met wel fotosynthetiserende, niet beweeglijke voorouders.
a. Elysia viridis, *een gastropode mollusk met chloroplasten die stammen uit algen die oorspronkelijk voor voeding werden gebruikt. Robert Trench.*
b. en c. Chloroplasten uit Elysia viridis.
d. Paramecium bursaria, *een ciliaat met daarin opgenomen 'zoochlorellae'. Marlene Karakashian.*


a
b
c
d

Tabel 1. Voorbeelden van convergentie en functie in de evolutie van micro-organismen.

Convergentie	Organismen	Leefmilieu	Selectiedruk	Literatuur
Sporen	myxokokken, clostridia, bacillen, slijmschimmels, sporozoën, schimmels	grond, weefsels en cellen van andere organismen	uitdroging, voedseltekort	Brock, 1970
Spore-dragende structuren	myxokokken (bijv. *Polyangium*), kolonievormende ciliaten, schimmels	grond	uitdroging en verspreiding	Brock, 1970
Aanhechtings-plaatsen voor bacteriën	spirocheten, niet-geïdentificeerde bacteriën aan andere protisten	darmen van kakkerlakken en termieten, zandkorrels, psammofiele ciliaten, huid van wormen	bevestiging (scheiding van de gastheer)	Raikov, 1974 Bloodgood, 1974 Smith & Arnott, 1974
Mycelia	slijmschimmels, actinomyceten, schimmels	grond, cellen en weefsels van andere organismen	mogelijkheid tot penetratie, toename oppervlakte	
Stromato-lieten	cyanobacteriën, groenwieren, andere algen	gebied droogvallend bij getij-beweging	stabilisering van leef-milieu tegen waterbewe-gingen enz.	Golubic, 1973 Awramik et al., 1975
Verwerving van foto-synthese door beweeglijke bacteriën	bacteriële consortia	modder van meren, oceaan	voedseltekort	zie tabel 2
Zich vast-hechtende volwassen vormen en beweeglijke stadia	*Caulobacter*, ciliaten (*Suctoria*), lagere schimmels (bijv. *Blastocladiella*)	oppervlakken	wisselende omstandigheden in leefmilieu (verspreiding door beweeglijke stadia)	

ontstaanswijze worden steeds sterker bij een toenemend aantal organismen, vooral door het toepassen van steeds fijnere analysetechnieken. Bij *Cyanidium*, *Cyanophora* en de eukaryote algen is de oorsprong van het bewegingsapparaat echter nog onduidelijk. In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van een deel van de aanwijzingen in deze.

Het is goed nog even stil te staan bij één van de organismen uit deze tabel, *Mesodinium rubrum*. Dit organisme, dat al door Charles Darwin in 1839 werd opgemerkt voor de kust van Chili, is de oorzaak dat bij bepaalde omstandigheden het zeewater rood gekleurd wordt. Het bevat, in tegenstelling tot andere fotosynthetiserende ciliaten, zoals *Paramecium bursaria*, *Stentor polymorphus* en *Paraeuplotes tortugensis*, géén *Chlorella*-algen, maar veeleer cryptomonade fotosynthetiserende symbionten.

Ook Van Leeuwenhoek heeft *Mesodinium rubrum* waarschijnlijk al waargenomen, zoals blijkt uit een notitie van 27 juli 1676 (Antoni van Leeuwenhoek, Alle Brieven, deel II, Brief no. 26): "Den 27e Julij 1676 heb ik mij begeven aan de zeestrant, ontrent den dorpe van Schevelingen[1], de wint comende uijt zee met seer warme sonneschijn, en aan strant sijnde het zee water naar mijn vermogen observerende, heb ik daar inne ontdekt verscheijde levende diertgens" . . . "en t'uijs comende, en observerende, heb ik waergenomen een diertge dat swartagtig was, hebbende de gedaante als of het van twee globule was te samen geset. Dit diertge, had een bijsondere beweginge, op die manier, als of wij voor ons oogen een seer kleijn vlootge, op een wit papier hadden sien springen, en met ijder sprong verplaetsten 't maer van ontrent een grof santge, dit mogt met regt wel een water vloo genoemt worden, en was op verre na soo groot niet, als een oog van het diertge, dat Swammerdam een watervloo noemt . . ." (*Daphnia*, doorsnee oog = ca. 200 μm).

Ten opzichte van zijn niet-fotosynthetiserende soortgenoten vertoont *M. rubrum* een aantal erfelijke verschillen, zoals achterwaarts zwemmen en een veel geringere voedselopname, hetgeen tot uiting komt in een sterk gereduceerd verteringsapparaat. Reductie van het verteringsapparaat en een toenemend vermogen tot autotrofie ten opzichte van niet fotosynthetiserende verwante soorten vinden we in bijna alle organismen die in tabel 2 zijn vermeld.

---

1. Schevelingen in plaats van Scheveningen wordt nog gebruikt in Noord- en Zuid-Holland.

Tabel 2. Fotosynthetiserende symbionten die voorkomen bij eukaryoten.

Gastheer	+ Fotosynthetiserende plastide	+ Cyanel	+ Cyanobacterie (blauwwier)	+ Alg	+ Chloroplast of deel van een alg
Protisten					
Astasia	*Euglena*				
?	*Oocystis*	*Glaucocystis nostochinearum*			
Chilomonas	*Cryptomonas* *Cyathamonas* *Cyanomonas*	*Cyanophora paradoxa*			
?		*Cyanidium*			
Vele dinoflagellaten, heterotrofe diatomeeën	vele dinoflagellaten, diatomeeën		dinoflagellaten met 'faeosomen', *Rhopalodia*[1], *Rhizoselenia*		*Peridinium balticum*
Paramecium *Mesodinium* *Prorodon* *Strobidium*				*Paramecium bursaria* (*Stentor* en *Euplotes*-soorten die geregeld algen herbergen)	*Mesodinium rubrum*
Vele foraminiferen					*Metaroliella parva*[2]
Oomyceten		*Geosiphon*			

Tabel 2. Fotosynthetiserende symbionten die voorkomen bij eukaryoten. Vervolg.

Gastheer	+ Fotosynthetiserende plastide	+ Cyanel	+ Cyanobacterie (blauwwier)	+ Alg	+ Chloroplast of deel van een alg
Dieren					
Hydra				*Chlorohydra viridis* (herbergt *Chlorella*)	
Zoanthus				*Gymnodinium*	
Anemone cassiopeia				*Anemonia sulcata* (herbergt dinoflagellaten)	
Petrosia *Ircina* *Pellina*	sponzen		*P. ficiformis* *I. variabilis* *P. semitubulosa*[3] (herbergen *Aphanocapsa*)		
Platworm				*Symbodinium convoluta* (herbergt *Platymonas*)	
Saccoglossis (mollusk)				*Tridachna*	*Tridachna*, *Placobranchus*, *Elysia*
Muizecellen					geïnduceerd: muizecellen in cultuur

Tabel 2. Fotosynthetiserende symbionten die voorkomen bij eukaryoten. Vervolg.

Gastheer	+ Fotosynthetiserende plastide	+ Cyanel	+ Cyanobacterie (blauwwier)	+ Alg	+ Chloroplast of deel van een alg
Fungi					
Ascomyceten			vele korstmossen	vele korstmossen	
Basidiomyceten			vele korstmossen	vele korstmossen (vaak *Trebouxia*)	
Planten					
Zamia } *Macrozamia* }			wortels van *Zamia*, *Macrozamia*		

1. Herbergt *Richelia intracellularis*.
2. Herbergt chloroplasten van diatomeeën.
3. Sponzen met algen kunnen groeien bij sterkere lichtintensiteiten; algen delen binnen de cellen.

Een voorbeeld van herhaling in de natuurlijke historie: de bacteriële aanhechtingsplaatsen

De (9+0)-structuur, de rangschikking van microtubuli in een cirkel, waarbij het centrale paar ontbreekt, vinden we in de basale lichaampjes van alle ciliën en flagellen, of ze nu voorkomen in cellen van het receptoire zintuigepitheel, in spermacellen of in ciliaten. Vanaf hun ontdekking aan het einde van de 19e eeuw zijn de basale lichaampjes omgeven geweest met raadsels. Terwijl Lwoff (1950) reeds de autonome replicatie van celorganellen aantoonde, is door zorgvuldige elektronenmicroskopische studies (Allen, 1969; Dippell, 1968, 1975) de mogelijkheid dat de basale lichaampjes repliceren, uitgesloten.

Bij amoebo-flagellaten is geen herkenbare structuur van waaruit de basale lichaampjes ontstaan, te vinden. In andere organismen wordt de plaats waar nieuwe basaallichaampjes ontstaan bepaald door de positie van reeds bestaande basale lichaampjes. Soms verschijnt er voor elk oud basaal lichaampje één nieuw, in weer andere gevallen worden ze aangemaakt in 100–1000-voud in één keer (bijvoorbeeld bij plantaardige spermatozoïden). Terwijl géén aanwijzingen zijn gevonden voor een behoefte aan voorafgaande DNA-synthese, is duidelijk aangetoond dat RNA-synthese, mogelijk in de vorm van een specifiek 'basaal-lichaamRNA', gepaard gaat met de vorming van nieuwe basale lichaampjes (zie ook Hartman et al., 1974; Younger et al., 1972; Frankel, 1974).

Wanneer we, uitgaande van de endosymbiose-theorie, aannemen dat deze basale lichaampjes, met de schachten van de ciliën en de flagellen, zijn ontstaan vanuit vrij levende spirocheten, dan lijkt het aannemelijk om te veronderstellen dat een samengaan tussen spirocheten en prokaryote gastheersoorten niet een eenmalige gebeurtenis is geweest, maar dat dit zich in de natuurlijke historie vele malen heeft herhaald. Uit één van deze ontmoetingen kan het typerende (9+2)-patroon zijn ontstaan in de voorloper van de eukaryote cel. Meerdere voorbeelden zijn ook nu nog bekend van het samengaan van protisten met beweeglijke bacteriën. Een dergelijk voorbeeld is te zien in fig. 6 voor *Pyrsonympha* (Smith & Arnott, 1974). Ook hierbij is er sprake van convergentie, aangezien deze structuur in veel niet verwante soorten een grote mate van overeenkomst vertoont.

Voor het ontstaan van de basale lichaampjes en de uit de basale lichaampjes afgeleide centriolen (Margulis, 1970), kunnen we in deze

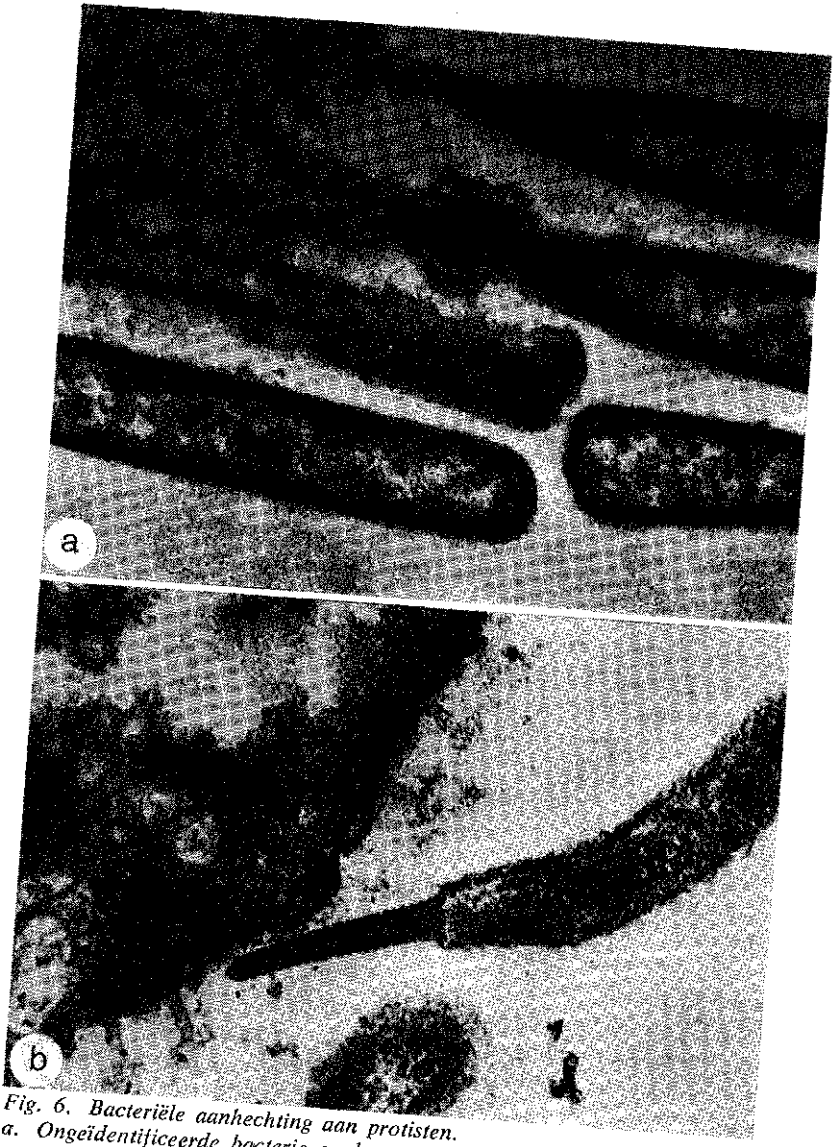
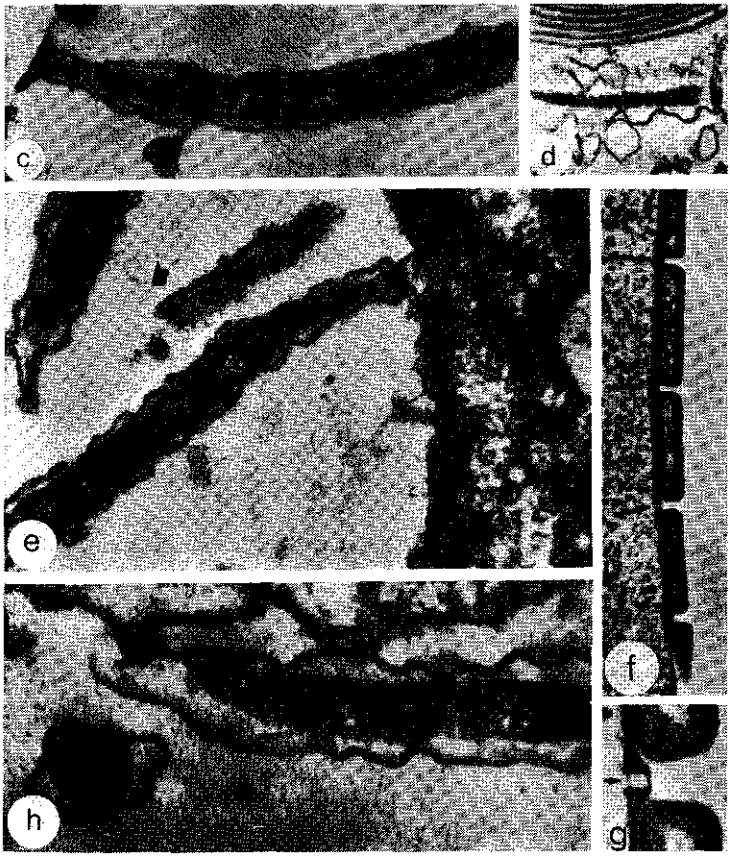


Fig. 6. Bacteriële aanhechting aan protisten.
a. Ongeïdentificeerde bacterie op het oppervlak van Urinympha, *een hypermastigoot uit termiet-ingewanden. R. A. Bloodgood, Yale University.*
b. Bacteriën op het oppervlak van Pyrsonympha, *een polymastigoot uit de termiet* Reticulitermes flavipes. *R. A. Bloodgood, Yale University.*



c. Ongeïdentificeerde spirocheet gehecht aan het oppervlak van Pyrsonympha. *R. A. Bloodgood, Yale University.*

d. Structuur waarmee de spirocheet vermoedelijk aan Pyrsonympha *verankerd is. Een deel van de uit microtubuli opgebouwde axostylus van de gastheer is zichtbaar. Harriet Smith, University of Chicago.*

e. Spirocheet gehecht aan het oppervlak van Pyrsonympha *uit de termiet* Reticulitermis tibialis, *waarbij de gespecialiseerde aanhechtingsplaats zichtbaar is. R. A. Bloodgood, Yale University.*

f. Bacterie-aanhechtingsplaatsen op het oppervlak van de protist Barbulanympha.

g. Detail van f. A. Hollande, Laboratoire de l'Evolution des êtres organisés, Parijs.

h. Ongeïdentificeerde bacterie vastgehecht aan de ciliaat Kentrophoros. *I. B. Raikov, Instituut voor Cytologie, Leningrad.*

aanhechtingsstructuren een mogelijke eerste aanzet zien. *Mixotricha*, een in de ingewanden van termieten levende symbiont, is een voorbeeld van een organisme dat door een voortdurende associatie onder meer de eigenschap van beweeglijkheid heeft verkregen. Deze eencellige is geheel bedekt met zweepdraden van verschillende grootte, die merendeels blijken te bestaan uit spirocheten, die in symbiose op het oppervlak van *Mixotricha* leven. De hypothese stelt nu dat dit soort associatie in het proces van ontwikkeling van de eukaryote cel uiteindelijk leidt tot het aanwenden van de microtubuli van de spirocheten voor structuur, mitose, pigmenttransport, gevoelswaarneming en vele andere typische processen van de eukaryote cel.

Samenvatting

De endosymbiose-theorie heeft, net als elke andere wetenschappelijke theorie, tot doel een aantal ogenschijnlijk ongelijksoortige waarnemingen te verenigen, en van hieruit te komen tot generalisaties en te toetsen voorspellingen. De endosymbiose-theorie heeft met andere theorieën die uitgaan van gebeurtenissen die zich in het verleden afgespeeld hebben gemeen, dat zij niet op directe wijze getoetst kan worden. Voor de voorspellingen die vanuit de theorie gedaan kunnen worden, is dit echter wel het geval.

De endosymbiose-theorie in zijn meest uitgesproken vorm stelt dat de volgende drie klassen organellen in de eukaryote cel zijn ontstaan vanuit vrij levende prokaryoten als voorouders: de mitochondriën, de basale lichaampjes, ciliën en flagellen ((9+2)-homologen) en de fotosynthetiserende plastiden. In de microbiologie worden aanwijzingen voor de theorie gevonden in de wijze waarop de beweeglijke microorganismen door symbiose het vermogen tot fotosynthese verkrijgen, en in de convergentie bij de ontwikkeling van de specifieke aanhechtingsplaatsen voor beweeglijke spirocheten. De theorie vormt de basis voor een groot aantal unieke en experimenteel te testen hypothesen, hetgeen op zich reeds pleit voor de waarde van de endosymbiosetheorie.

De betekenis van de microben voor het leven op aarde

J. W. M. LA RIVIÈRE

De plaats van de microben in de levende natuur

Niemand zal in een boek dat bijdragen bundelt van een botanisch of zoölogisch symposium een hoofdstuk verwachten over de betekenis van de planten of de dieren voor het leven op aarde. Hieraan is geen behoefte omdat, zolang de mensheid bestaat, de rol van deze zichtbare organismen zich dagelijks manifesteerde in de strijd om het bestaan, waardoor vroegtijdige domesticatie en exploitatie mogelijk werd. Planten en dieren worden door ons in de huiskamer gekoesterd, en in de literatuur en beeldende kunst hebben zij hun vaste plaats. Zij maken deel uit van de gemeenschappelijke ervaringswereld van iedereen.

De microben kunnen echter in het algemeen slechts uit de tweede hand gekend worden, dat wil zeggen via de microbiologen, de enigen die uit eigen aanschouwing met de microbenwereld vertrouwd zijn. Hun verslaggeving begon bij Van Leeuwenhoek, nog maar net driehonderd jaar geleden, maar gedurende de daarop volgende tweehonderd jaar moest deze tot morfologische waarnemingen beperkt blijven. Pas na Pasteur werd het mogelijk de betekenis van de microben langzamerhand naar waarde te schatten en hoewel het aantal microbiologen in de wereld intussen is uitgegroeid tot meer dan 50 000, hoeft het geen verwondering te wekken dat de kennis der microben nog lang niet die verspreiding heeft gevonden die hun betekenis zou mogen doen verwachten. Zij zijn als studieobject nog maar nauwelijks tot het basisonderwijs doorgedrongen, en voorzover mij bekend is er slechts één gedicht (Hilaire Bellock, 1955) en één sculptuur (gistmozaïek, Kalverbos, Delft) aan een microbe gewijd.

Deze stand van zaken moge de titel van deze bijdrage rechtvaardigen; of de lading door deze vlag passend wordt gedekt is echter minder zeker, want de omvang van het onderwerp dwingt tot beperking door subjectieve keuze. Dit begint al met de vraag welke orga-

nismen wij nu precies onder microben moeten verstaan en deze brengt ons direct middenin het slagveld der taxonomie op het hoogste niveau.

Wat zijn microben?

Om praktische redenen lijkt het mij het doelmatigst terug te grijpen op de indeling die door Haeckel (1866) ruim 100 jaar geleden werd opgesteld, waarin naast de rijken van de dieren en de planten een derde rijk, dat der Protista of microben werd voorgesteld. Dit omvatte alle bacteriën, algen, schimmels en protozoën (fig. 1). Sindsdien zijn vele alternatieve en beter gefundeerde indelingen, zoals die van Whittaker (1969), voorgesteld, waarbij de groepen uit het protistenrijk van Haeckel over verschillende rijken opgesplitst werden, zodat aan het woord protist of microbe de taxonomische betekenis ontviel. Geen van deze voorstellen is algemeen aanvaard. Er is veel meer sprake van een 'vreedzaam naast elkander leven' van alternatieve indelingen, en speciaal in de laatste jaren is het besef gegroeid dat men er beter aan doet deze indelingen voorlopig in alle gemoedsrust als provisorisch te aanvaarden totdat nieuwe ontwikkelingen algemeen erkende scheidingslijnen en evolutierelaties uit de verf doen komen. Zo heeft het fundamentele verschil tussen de prokaryotische en eukaryotische cel zich kunnen aftekenen door de nieuwe inzichten die onder meer de elektronenmicroscoop ons in de cel-anatomie heeft gegeven. Op

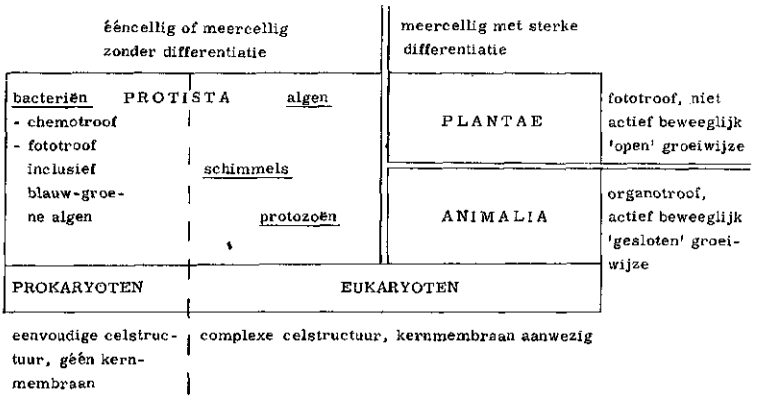


Fig. 1. Eenvoudige, doch niet algemeen aanvaarde, indeling van de levende natuur, volgens Haeckel (1866).

grond hiervan heeft Murray (1974) in de laatste uitgave van Bergey's Manual of Determinative Bacteriology onlangs het voorstel gedaan een speciaal rijk Procaryotae in het leven te roepen, daarbij in het midden latend of dan ook daarnaast een 'superrijk' Eucaryotae moest worden opgericht met drie of meer 'subrijken'. Zijn raad om af te wachten lijkt mij verstandig, maar dat neemt niet weg dat in speciale gevallen, zoals bijvoorbeeld in dit hoofdstuk, moet worden afgesproken wat precies met de term microben wordt bedoeld.

Omdat de moderne taxonomie ons hierbij in de steek laat kan men het beste aansluiting zoeken bij de praktijk van de wetenschapsbeoefening zelf: het woord microbiologie wordt door de meeste microbiologen pragmatisch uitgelegd als de leer der microben in de zin van Haeckel. Het is niet te verwachten dat taxonomische vernieuwingen hier snel verandering in zullen brengen om de eenvoudige reden dat de experimentele benadering die nodig is voor de studie van kleine organismen zo'n sterke samenbindende kracht bezit. Ik zal dus, in navolging van de meeste leerboeken, onder microben verstaan de bacteriën zowel als alle algen, schimmels en protozoën alsmede, volgens algemeen gebruik, ook alle virussen. Ik besef heel goed daarbij het risico te lopen door de botanici en zoölogen beschuldigd te worden van annexatie van respectievelijk de algen en protozoën. Tussen haakjes zij overigens opgemerkt dat vooral op aandrang van Stanier et al. (1971) de prokaryotische algen, dat wil zeggen de blauw-groene algen, gepromoveerd zijn tot blauw-groene bacteriën, cyanobacteriën, en dus onherroepelijk voor de botanicus verloren lijken te zijn gegaan.

Microben als voorloper en motor van aards leven

Professor Schwartz heeft reeds duidelijk belicht dat het eerste leven op aarde uit microben heeft bestaan en dat zij gedurende miljoenen jaren door hun stofwisseling de samenstelling van de biosfeer krachtig hebben beïnvloed. Daardoor werden zij ook de scheppers van het chemische spanningsveld, dat op zijn beurt gestalte gaf aan de reeks van hogere organismen zoals die op aarde geëvolueerd zijn. Een belangrijk voorbeeld hiervan is het gebruik van H_2O in plaats van H_2S als waterstofdonor in de fotosynthese. De eerste microben die deze weg insloegen – vermoedelijk de blauw-groene bacteriën – begonnen zuurstof als afvalprodukt te produceren. Hierdoor schiepen zij de mogelijkheid voor de evolutie van de landbewoners die door ademhaling

in hun energiebehoefte gingen voorzien en door een ozonlaag tegen ultraviolet licht werden beschermd. Deze verandering van een reducerende tot een zuurstofrijke atmosfeer en het feit dat microben in genetisch opzicht de voorouders van alle leven zijn, zouden op zichzelf al genoeg zijn om het microbenrijk als het belangrijkste fundament voor het huidige leven op aarde te beschouwen. Maar deze historische argumenten worden nog in de schaduw gesteld door het actuele gegeven dat in de kringlopen van bijvoorbeeld koolstof, zuurstof, stikstof en zwavel de microben onmisbaar zijn voor het instandhouden van de levensmogelijkheden van de rijken der planten en dieren.

De koolstofkringloop, voorbeeld van de wisselwerking mens-microbe

Helaas vertoont onze kwantitatieve kennis van deze kringlopen ernstige tekorten. Voor de bepaling van de stromen en de voorraden van de kringloopcomponenten is een multidisciplinaire aanpak door biologen, geochemici, oceanologen, meteorologen en modellenmakers nodig; deze begint gelukkig in de laatste jaren van de grond te komen. Een belangrijke stimulans hiertoe vormde de recente bezorgdheid over de biosfeer en het groeiende besef dat menselijke activiteit een niet meer te verwaarlozen invloed op het functioneren van de kringlopen op wereldniveau begint uit te oefenen.

Ter illustratie moge dienen dat de mens door verbranding van fossiele brandstoffen en cementproduktie het CO_2-gehalte in de atmosfeer met circa 0,2% per jaar doet stijgen; dit is ongeveer de helft van de stijging die verwacht kan worden als de snelheid waarmee CO_2 aan de atmosfeer onttrokken wordt constant blijft. Men moet dus concluderen dat de fotosynthetische ofwel de fysisch-chemische CO_2-vastlegging is versneld, als tenminste de biologische CO_2-produktie niet is verminderd. Studie van dit vraagstuk is belangrijk omdat, zoals bekend, verhoging van de CO_2-concentratie van de atmosfeer een zogenaamd 'broeikaseffect' heeft, dat wil zeggen leidt tot verhoging van de gemiddelde temperatuur op aarde met alle gevolgen van dien voor het klimaat. Fig. 2 geeft een beknopte samenvatting van de helaas nog gebrekkige gegevens die over de koolstofkringloop bekend zijn en de achtergrond vormen waartegen onder andere dit probleem moet worden bestudeerd.

Hieruit blijkt in de eerste plaats dat het aandeel van de microben overheersend is in de belangrijkste transformatiestromen. Jaarlijks

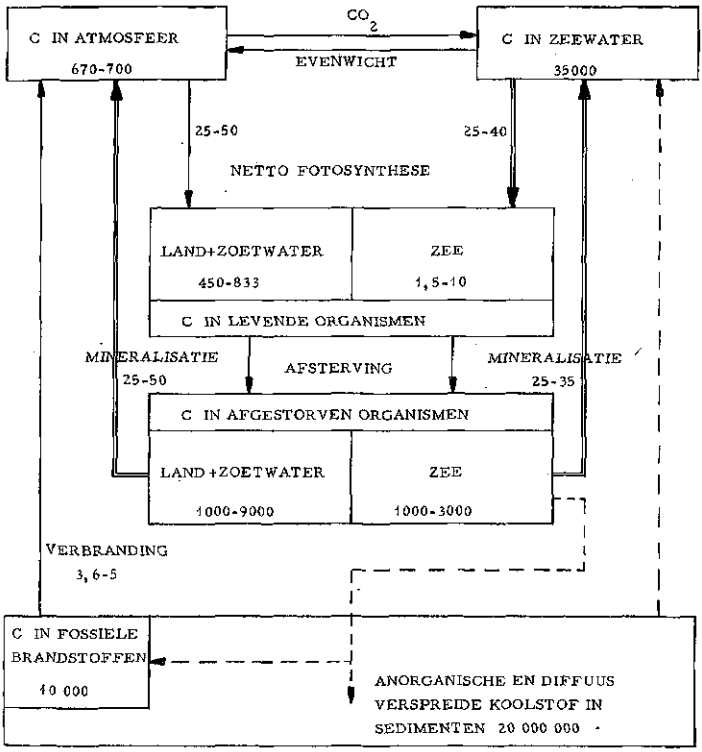


Fig. 2. Vereenvoudigde koolstofkringloop naar gegevens van Woodwell & Pecan (1973) en van Bolin (1970). Hoeveelheden zijn uitgedrukt in 10^{12} kg C; stromen in 10^{12} kg C/jaar. Dubbele lijnen stellen stromen voor die in hoofdzaak door microben worden onderhouden. Stippellijnen stellen relatief kleine stromen voor.

produceren de algen in de zee 1/3 tot 1/2 van alle organische stof en leveren andere microben door mineralisatie meer dan 90% hiervan weer terug aan de atmosfeer in de vorm van CO_2. Dit betekent dat zij per jaar welhaast ongemerkt de totale jaarlijkse wereldproduktie aan plant en dier verslinden, daarbij het wildste roofdier, de mens zelf, in omzet en vindingrijkheid verre overtreffend. Indien dit mineralisatieproces tot stilstand zou komen, zou in een periode van 10–20 jaar alle CO_2 uit de atmosfeer zijn verdwenen en plantengroei op aarde onmogelijk zijn geworden, indien het carbonaatevenwicht tussen atmosfeer en oceanen niet snel genoeg voor toevoer zou kunnen zorg

dragen. Op het diagram is gestippeld aangegeven dat sommige afbraakprocessen, bijvoorbeeld in de grond en op grote diepte in de zee traag verlopen en aanleiding geven tot vorming van respectievelijk humus en organische sedimenten. Verder zijn de gassen CH_4 en CO, die slechts een kleine stroom in de kringloop vormen, weggelaten. Hun gelukkig lage evenwichtsconcentratie in de atmosfeer wordt echter eveneens bepaald door de microben die grotendeels voor hun vorming zowel als afbraak verantwoordelijk zijn (Schlegel, 1974).

Er bestaat grote onzekerheid over de omvang van de totale biomassa op het land en in de oceanen en evenzeer over de aandelen daarin van de drie rijken. Met name over de totale biomassa der microben zijn de gegevens schaars; men vindt in de literatuur slechts onberedeneerde schattingen leidende tot een orde van grootte die overeenkomt met die van de planten en dieren. Tabel 1 geeft een proeve van een ruwe berekening welke voor verdere verfijning vatbaar is maar toch in eerste aanleg lijkt te bevestigen dat de microbenmassa op zijn minst die der dieren evenaart. Belangrijk is natuurlijk welke micro-organismen men tot de microben rekent: de algen leve-

Tabel 1. Een schatting van de biomassa van het microbenrijk (in kg gebonden C).

Biomassa *fotosynthetiserende* microben[1] (plankton in zee)	$1{,}5 - 10 \times 10^{12}$
Biomassa *mineraliserende* microben, verantwoordelijk voor de oxydatie van de jaaropbrengst[1] van de fotosynthese van 90×10^{12} kg gebonden koolstof, bij een specifiek zuurstofgebruik ($Q(O_2)$) van 20 μl per mg droge stof per uur	$0{,}38 \times 10^{12}$
Biomassa microben verantwoordelijk voor *omzettingen waarbij geen O_2 wordt opgenomen* zoals gistingsprocessen	$0{,}38 \times 10^{12}$
	+
Biomassa totaal microbenrijk	$2{,}26 - 10{,}76 \times 10^{12}$
Ter vergelijking:	
Biomassa van 3×10^9 mensen	$0{,}007 \times 10^{12}$
Biomassa dierenrijk[2]	$6 - 11 \times 10^{12}$
Biomassa plantenrijk[1]	$450 - 833 \times 10^{12}$

1. Cijfers van Woodwell & Pecan (1973).
2. Berekend naar gegevens van Delwiche (1970).

ren het leeuwedeel, maar vallen er alleen volgens Haeckels definitie geheel onder. Het lage cijfer voor de massa der niet-fotosynthetische microben is overigens gebaseerd op een vrij hoge activiteit. Is deze in feite lager, wat redelijk lijkt, dan is het massa-aandeel van deze laatste groep belangrijker.

De betekenis van de opgegeven cijfers beperkt zich intussen tot het zichtbaar maken van de consequenties die de vele gedane aannamen hebben voor de waarde van het gezochte getal en het helpen afperken van het gebied waarin het kan liggen. Vele verschillende 'kruispeilingen', elk gebaseerd op een aparte combinatie van gegevens en aannamen zijn nodig om tot een betrouwbaar resultaat te komen. Een voorbeeld van zo'n 'kruispeiling' is het volgende: bouwland bevat 300–3000 kg bacteriën per ha (Borgstrom, 1964) waarvan 5 à 10% uit koolstof bestaat. Het landoppervlak van de aarde is $1,5 \times 10^{10}$ ha. Dit geeft voor de bacteriënmassa op het land een waarde van $0,2 - 4,5 \times 10^{12}$ kg koolstof, hetgeen niet in strijd is met het overeenkomstige onderdeel van bovenstaande berekening.

Ook de omvang van de stromen is nog zeer onnauwkeurig geschat. Veranderingen van het landbouwareaal, verhoging van fotosynthese door bemesting en eutrofiëring, veranderingen in de produktiviteit van de oceanen en kustwateren, de aantasting van tropische regenwouden zijn factoren die slechts door pijnlijk nauwgezette inventarisatie en boekhouding in rekening kunnen worden gebracht en het is duidelijk dat dit een internationale inspanning op grote schaal vraagt. Het moet daarom worden toegejuicht dat het Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) van de International Council of Scientific Unions (ICSU) nu pogingen in het werk stelt om tot een inventarisatie van gegevens te komen, zodat door aanvullende en voortgezette metingen een mathematisch model kan worden opgezet, waardoor de kringlopen van koolstof en andere elementen in kaart gebracht en bewaakt kunnen worden.

Hoewel dus nog veel werk moet worden verzet om ons inzicht in de koolstofkringloop op peil te brengen, moet niet uit het oog worden verloren hoezeer kennis van segmenten ervan de mens reeds in staat gesteld heeft zijn eigen evolutie in de laatste honderd jaar krachtig te beïnvloeden. Kennis, gekoppeld aan de mogelijkheid van daarop gebaseerde doelmatige beheersing, is een verworven eigenschap die weliswaar minder tastbaar is dan bijvoorbeeld een verworven enzym maar niet minder effectief is in de evolutionaire strijd om het bestaan

van een soort. De drie voorbeelden die ik ter illustratie hiervan zal bespreken zijn alle gebaseerd op het Beijerinckiaanse principe dat elk ecologisch vacuüm de neiging heeft zich op te vullen.

Microben als ziekteverwekkers

In de eerste plaats kunnen we de biomassa van planten en dieren, inclusief de mens, zien als een permanente uitdaging aan de microbenwereld om met het mineraliseren van deze organische stof te beginnen voordat de individuen in kwestie zijn afgestorven. Als gevolg hiervan is er, een gelukkig klein, gedeelte van het protistenrijk dat wij als pathogeen beschouwen en waartegen wij ons stelselmatig met toenemend succes hebben leren verweren.

Tot nog maar ongeveer een eeuw geleden hadden besmettelijke ziekten een invloed op de sociaal-economische, culturele en religieuze aspecten van het maatschappelijk leven van een omvang die wij ons nauwelijks meer kunnen voorstellen. In zijn bekende boek 'Rats, lice and history' geeft Zinsser (1967) vele voorbeelden van gevallen waarin epidemieën in plaats van wapengeweld de uitkomst van veldslagen en daarmee de loop van de geschiedenis bepaalden. De indamming van deze bedreigingen is te danken geweest aan (1) de preventieve maatregelen die in de vorige eeuw in de vorm van sanitaire voorzieningen, vectorbestrijding en vaccinatie op gang kwamen en (2) aan het arsenaal van curatieve afweermiddelen gegeven door de ontdekking van de sulfapreparaten en de antibiotica rondom de tweede wereldoorlog. De ingrijpende gevolgen van het terugdringen der pathogenen kunnen moeilijk overschat worden. Zij hebben zich nog niet volledig gemanifesteerd en wij genieten het twijfelachtige voorrecht ooggetuigen en medespelers te zijn bij de wereldproblemen door snelle bevolkingsgroei en voedselschaarste geschapen.

Fig. 3 illustreert de grote successen van de preventie, fig. 4 die van de curatieve afweer. In het laatste geval is het meest spectaculaire succes bereikt door 'dief met diefjesmaat' te bestrijden, dat wil zeggen door antibiotica waarmee microben elkaar onderling bestrijden als therapeuticum in te schakelen. Het dramatische element in de ontdekking van penicilline werd onlangs geaccentueerd door Ronald Hare (1970), één van Flemings collega's aan het Inoculation Department van het St. Mary's Hospital. Hij reconstrueerde Flemings beroemd geworden experiment en maakte aannemelijk dat, in tegenstelling tot

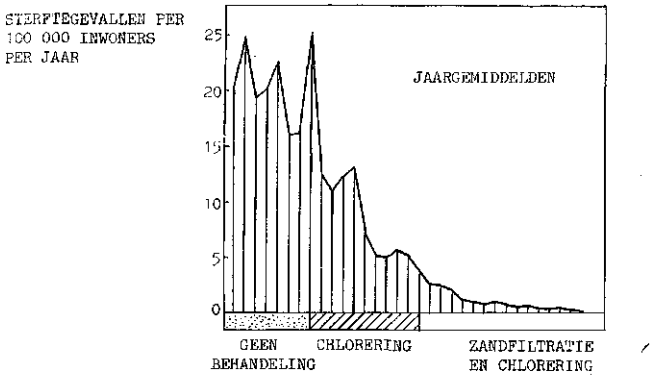


Fig. 3. Preventieve werking van de zuivering van drinkwater op de sterfte aan tyfus in Pittsburgh. Fair et al., 1968.

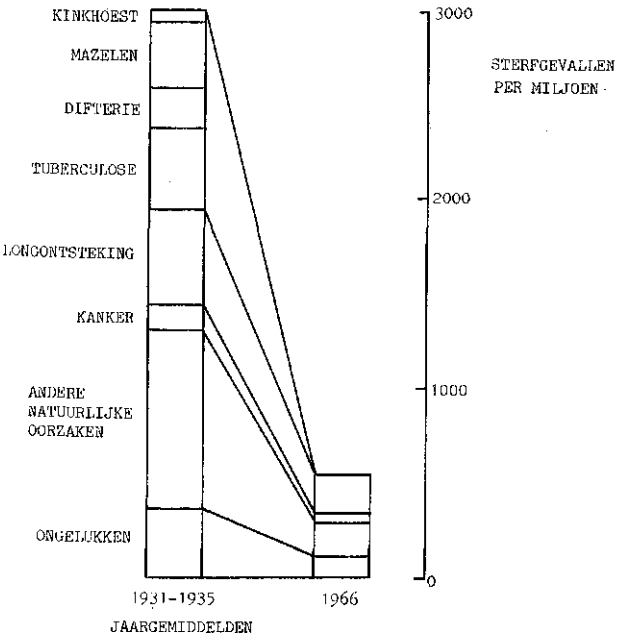


Fig. 4. Sterfte onder jonge kinderen (< 5 jaar) in Engeland vóór en na de introductie van chemotherapeutica en antibiotica. Hare, 1970.

de gangbare opvattingen, de ontmoeting tussen schimmel en *Staphylococcus* slechts tot de manifestatie van penicilline heeft kunnen leiden door een uiterst onwaarschijnlijke samenloop van omstandigheden, waaronder Flemings vakantieplannen, de slechte outillage van zijn laboratorium en het Engelse weer.

Ook het arsenaal van wapens ter bestrijding van ziektes van plant en dier is op indrukwekkende wijze versterkt. In het bijzonder verdient het gebruik van microben, pathogeen voor de te bestrijden parasieten, grote belangstelling omdat deze biologische methode veel milieuvriendelijker is dan de chemische.

Intussen dienen wij ons te realiseren dat het verworven vermogen om de pathogenen met welhaast vanzelfsprekend succes te bestrijden zich lang niet over de gehele mensheid uitstrekt. In grote delen van de wereld lijden en sterven mensen doordat de in het Westen ontwikkelde 'culturele genen' voor preventie en genezing van besmettelijke ziekten in hún landen nog niet in het socio-economische stelsel zijn ingebouwd, of 'tot expressie zijn gekomen'. Tabel 2 geeft hiervan een illustratie.

Microbieel voedselbederf

Mijn tweede voorbeeld wordt ingegeven door het feit dat voor de mens geschikte voedingsstoffen ook voor de mineraliserende microben een lekkernij zijn. Speciaal in de ontwikkelingslanden gaan grote hoe-

Tabel 2. Sterfte per 100 000 in 1964 aan maag-darminfecties onder kinderen jonger dan 5 jaar. Bengoa, 1969.

Land	In eerste levensjaar	Tussen 1–4 jaar
Oostenrijk	139,0	6,8
Denemarken	40,8	1,7
Zweden	13,0	1,4
Engeland	42,0	3,5
Chili	1588,0	69,3
Colombia	1480,4	278,6
Guatemala	1275,9	704,2
Mauritius	1380,3	203,2
Mexico	1224,0	267,4
Philippijnen	521,0	149,6
Venezuela	714,7	89,8

Tabel 3. Voedselbederf in ontwikkelingslanden. Hall, 1969; Coursey, 1972.

Land	Produkt	% Verlies
India	graan	20
Pakistan	tarwe	30
Sierra Leone	rijst	41
Centraal Afrika	aardappels	8
	tomaten	30
	sinaasappels	26
	bananen	30

veelheden voedsel door bederf verloren. Tabel 3 geeft verliezen aan van 20–30% die, behalve door knaagdieren en insekten, voor een belangrijk deel door microben veroorzaakt worden. Door de vergevorderde techniek van conservering hebben de industrielanden het voedselbederf sterk kunnen terugdringen. Mede daardoor kon men daar veel onafhankelijker van plaats en tijd van voedselwinning worden. Te weinig beseffen wij misschien dat de moderne Westerse urbanisatie mede mogelijk is geworden juist doordat voedselconservering ruimtelijke scheiding tussen landbouwgebied en woonagglomeratie toeliet. In de ontwikkelingslanden schrijdt de urbanisatie met grote snelheid voort (tabel 4) zonder dat de middelen voor opslag en transport gelijke tred houden. Hetzelfde probleem doet zich voor bij het wereldvoedselvraagstuk dat voor een belangrijk deel een distributievraagstuk en dus ook een opslag- en transportvraagstuk is. Het negatief effect van 'rottend graan op de kaden van het ontvangende land' op de bereidwilligheid tot voedselhulp is maar al te zeer bekend.

Tabel 4. Urbanisatie in de periode 1950–1970. Gordon, 1974.

Gemiddeld over:	% Bevolking wonende				Jaarlijkse toeneming in %	
	in de steden		op het land		in de steden	op het land
	1950	1970	1950	1970		
Wereld	28,3	37,4	71,7	62,6	3,5	1,2
Ontwikkelde landen	51,2	64,2	48,8	35,8	2,3	–0,3
Ontwikkelingslanden	16,2	25,9	83,8	74,1	4,6	1,6

Microben als waterzuiveraars

Als derde voorbeeld wil ik noemen het opruimen van afvalstoffen, zoals dat sinds het bestaan van de mensheid door de mineraliserende microben geruisloos en effectief werd verricht totdat dit proces door overbelasting plaatselijk niet overal snel genoeg meer kon plaats hebben. Als gevolg hiervan ontstonden in het begin van deze eeuw verschillende microbiologische technieken voor zuivering van afvalwater en de bereiding van drinkwater welke alle berusten op een intensivering van de natuurlijke mineralisatieprocessen met technische middelen waardoor de belasting van het milieu met organische stof en met pathogene bacteriën sterk kon worden teruggedrongen. Het is belangwekkend te vermelden dat de geaëreerde continue cultuur met terugvoer van celmateriaal (actief-slibinstallaties) en microbiologische filmreactoren ('trickling filters', langzame zandfilters) tot praktische toepassing gebracht werden door civiel ingenieurs, lang voordat ze ca. 20 jaar geleden door microbiologen behoorlijk werden uitgevonden. Dit heeft intussen niet verhinderd dat de biologische afvalwaterzuivering ongemerkt is uitgegroeid tot de grootste microbiologische industrie ter wereld. Maar ook in dit opzicht heerst in de ontwikkelingslanden een achterstand die jaarlijks tienduizenden slachtoffers chronisch op een laag activiteitsniveau plaatst of vroegtijdig doet sterven. Ironisch genoeg worden wij alleen wanneer wij op vakantie gaan aan den lijve geconfronteerd met de voor ons welhaast antieke ziekten die door slechte watervoorziening en riolering veroorzaakt worden.

Zuurstofkringloop

De koolstofkringloop is nauw verweven met de zuurstofkringloop. Over deze laatste kunnen we gelukkig een optimistisch geluid laten horen. Broecker (1970) heeft berekend dat onze in de atmosfeer aanwezige zuurstofvoorraad zo groot is dat verbranding van alle bekende fossiele brandstofreserves het zuurstofgehalte in de atmosfeer met minder dan 3% van de huidige waarde zou doen terugvallen. Als we verder bedenken dat praktisch al het jaarlijks gevormde fotosyntheseprodukt bij mineralisatie evenveel zuurstof verbruikt als bij de vorming ervan is vrij gekomen, en in aanmerking nemen dat de jaarlijkse biologische zuurstofproduktie slechts één vijftienmiljoenste is van de aanwezige zuurstof, kunnen we met een gerust hart de bijdrage tot

de zuurstofproduktie schrappen uit de lijst van argumenten voor het overigens zeer loffelijke planten van bomen. Intussen is het wel leerzaam om eens per land na te gaan hoeveel de jaarlijkse netto zuurstofproduktie of -consumptie bedraagt, aangezien dit een inzicht geeft in het beslag dat een land legt op 's werelds recent en fossiel fotosyntheseprodukt. Als men aanneemt dat fotosynthese en mineralisatie van de vegetatie elkaar in evenwicht houden kan de zuurstofimport berekend worden uit invoer van brand- en voedingsstoffen en de zuurstofexport uit de uitvoercijfers voor deze stoffen. Op deze wijze heeft Newman (ongepubliceerd) berekend, dat, zoals te verwachten, de meeste landen een netto zuurstofconsumptie hebben en dus leven op kosten van elders of vroeger gevormd fotosyntheseprodukt. Tabel 5 geeft hiervan een voorbeeld voor Nederland en Australië. In Japan, dat zich als eiland natuurlijk uitstekend daarvoor leent, is men begonnen nationale balansen voor de water-, koolstof-, stikstof- en zwavelkringlopen op te stellen, hetgeen een nuttig instrument voor beleid op de lange termijn oplevert.

Tabel 5. In- en uitvoergegevens van zuurstof over 1970 voor Nederland en Australië, uitgedrukt in 10^9 kg/jaar. Voor compensatie van de Nederlandse O_2-import zou een bosgebied van ca. 7,5 × de oppervlakte van Nederland nodig zijn, bij een primaire produktie van 5 g/m² per dag gedurende 100 dagen per jaar.

	Australië (bevolking 12,6 × 10^6, oppervlakte 7,6 × 10^6 km²)		Nederland (bevolking 13,1 × 10^6, oppervlakte 0,04 × 10^6 km²)	
	uitvoer	invoer	uitvoer	invoer
O_2 voor verbranding van fossiel fotosyntheseprodukt	-	129	-	130
O_2 voor verbranding van recent fotosyntheseprodukt	21	-	-	19
Totaal		108		149

Stikstofkringloop

Voor de stikstofkringloop geldt zo mogelijk in nog sterkere mate dat microben de belangrijkste circulatiepompen zijn. Fig. 5 geeft een beknopt en op vele ruwe schattingen gebaseerd overzicht van deze kringloop die eigenlijk uit twee gedeelten bestaat: één deel speelt zich af in de grond en in het water en het tweede deel bestaat uit een lus

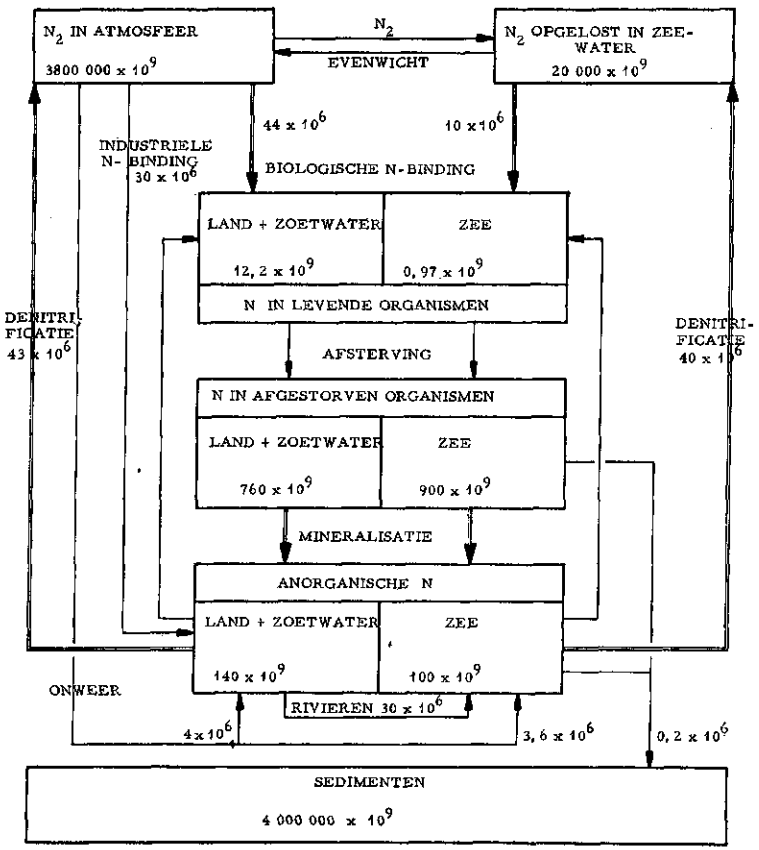


Fig. 5. Vereenvoudigde stikstofkringloop naar gegevens en schattingen van Delwiche (1970). Hoeveelheden zijn uitgedrukt in 10^9 kg N; stromen in 10^6 kg N/jaar. Dubbele lijnen stellen stromen voor die in hoofdzaak door microben worden onderhouden.

gevormd door transport van en naar het stikstofreservoir in de atmosfeer en de zee. Ook hier dwingt de stijgende invloed van de mens tot aanvulling van onze fragmentarische kennis. De industriële stikstofbinding, die langzamerhand al 20% van de totale stikstofbinding uitmaakt, neemt namelijk ondanks de energiecrisis nog steeds toe als onderdeel van de pogingen om het wereldvoedseltekort niet te doen uitgroeien. Daarnaast stijgt ook de emissie van stikstofoxyden door verbranding. Als een gevolg hiervan zijn plaatselijk te hoge nitraatgehalten in oppervlakte- en grondwater ontstaan die risico's voor de gezondheid kunnen opleveren (methemoglobinemie en kanker verwekt door nitrosaminen).

Daarnaast bevordert concentratieverhoging van gebonden stikstof de ongewenste eutrofiëring van oppervlakte-wateren. Daartegenover staat dat kustwateren in sommige gevallen door dezelfde oorzaak een produktiviteitsverhoging kunnen vertonen.

Gelukkig kunnen ook hier weer microben bijdragen leveren tot oplossingen. Nitraat kan uit afvalwater worden verwijderd door inschakeling van een eenvoudige denitrificatiestap in het biologische zuiveringsproces. Van groter belang is echter dat een bewust gebruik van de symbiotische stikstofbindende bacterie *Rhizobium* dure en energie eisende chemische kunstmeststoffen bij vele gewassen kan vervangen. Daarbij wordt de plant op zo'n efficiënte wijze van stikstof voorzien, dat ook de stikstofbelasting van het milieu kan worden teruggedrongen zonder de opbrengst te verminderen.

Het Milieuprogramma van de Verenigde Naties heeft vorig jaar een begin gemaakt met maatregelen die speciaal in ontwikkelingslanden de beschikbaarheid voor direct praktisch gebruik moet waarborgen van *Rhizobium*-stammen die specifiek zijn voor de plaatselijke gewassen. Behalve aan dit gebruik van bestaande kennis, moet aandacht worden besteed aan lange termijn researchinspanningen, gericht op het inbouwen van stikstofbindende mechanismen in niet-leguminosen. In de laatste jaren is het gelukt om in vitro, in callusweefselkweken van tarwe, knolvorming en een geringe stikstofbinding tot stand te brengen. Deze en andere proeven gericht op ontrafeling van de relatie plant - *Rhizobium* scheppen een basis voor voorzichtig optimisme (Postgate, 1975).

Microbiologische industrie

Het zou verleidelijk zijn om ook andere kringlopen zoals die van fosfor, zwavel en metalen als kwik te bespreken omdat ook daarin microben door velerlei omzettingen als oxydo-reductie, precipitatie, gasvorming en solubilisatie belangrijke transportstromen in stand houden. Voorbeelden zijn de mobilisatie van fosfaat door mycorrhiza, het winnen van metalen als uranium en koper door microbiologische uitlogingsprocessen en het oplosbaar maken van kwik door methylering. Maar dan zou eerder nog misschien een beschouwing op zijn plaats zijn van de regelingsmechanismen die de kringlopen integreren en samensmeden tot de werkelijkheid van het stofwisselingsnetwerk van de biosfeer, waarbinnen de kringlopen als zodanig slechts uit hun verband gerukte menselijke benaderingsmodellen voorstellen. Het inzicht wint veld dat de stofwisseling van de biosfeer slechts in ruimte- en tijdschaal verschilt van de nu zo goed bestudeerde fysiologische activiteiten van cellulaire en subcellulaire systemen. De toenemende effectiviteit van het analytisch arsenaal voor metingen op wereldschaal, bijvoorbeeld door satellieten, rechtvaardigt de verwachting, dat onze huidige gebrekkige kennis over de dynamiek van de biosfeer vrij spoedig met sprongen zal toenemen. Ik zal daarom liever enkele andere gebieden aansnijden waar microben van grote betekenis zijn voor het leven op aarde of dit binnenkort zouden kunnen worden.

Hierbij valt natuurlijk in de eerste plaats te denken aan de microbiologische industrie die in vele landen een hoge vlucht heeft genomen. In Japan, dat hierbij voorop gaat, zet deze industrie evenveel om als de gehele Nederlandse chemische industrie en neemt meer dan 2% van het nationaal produkt voor zijn rekening. Een gelukkig onderzoek- en ontwikkelingsbeleid levert er een stroom van nieuwe produkten, die deze industrie een uiterst dynamisch en welhaast futuristisch karakter geven. Dit heeft ook in financiële kringen de aandacht getrokken. Zie bijvoorbeeld een aan deze industrie gewijd artikel in Fortune (februari 1974). Voorbeelden zijn: de produktie van leb-vervangende enzymen, methaan, eiwit en suikers (uit cellulose). Voor dit onderwerp zie men overigens het hoofdstuk van ir. van der Waard.

Microben als onderzoeksmodel

Als tegenpool van de industriële toepassingen moet het gebruik van microben als modelorganismen voor biologisch onderzoek genoemd worden, een onderwerp dat op zichzelf een serie lezingen zou kunnen vullen. Hierover zij slechts opgemerkt dat na de biochemie en de genetica nu ook de ecologie best een dankbare cliënt zou kunnen worden. Positieve en negatieve interacties, competitie, successie en predator-prooirelaties bijvoorbeeld kunnen uitstekend aan microbenpopulaties in continue culturen onderzocht worden. Een obstakel hierbij is dat de microbenecologie zelf nog betrekkelijk weinig ontwikkeld is, aangezien de microbiologie zich sinds Pasteur in hoofdzaak op het niveau van de reincultuur of eenvoudige subcellulaire systemen heeft bewogen en zich pas in de laatste jaren weer is gaan richten op hogere niveaus van integratie zoals natuurlijke populaties. Daarbij werkt men niet meer met reinculturen maar met mengculturen. Een ander obstakel is de semantische kloof die tussen de algemene ecologen en de microbiologen bestaat, maar de dialoog begint nu op gang te komen.

Toegepaste microbenecologie

Hoe graag ik ook dieper op deze kwestie zou willen ingaan, nog belangrijker lijkt het mij enige aandacht te geven aan enkele deelgebieden van de toegepaste microbenecologie die een plotselinge impuls hebben gekregen van de groeiende erkenning van de schaarste aan grondstoffen, voedsel en energie. Dit komt doordat microben zich uiterst nuttig kunnen maken bij gebruik en hergebruik van afvalstoffen, waarbij dan tegelijk aan het verontreinigings- én het schaarsteprobleem tegemoet wordt gekomen. Bovendien kan vaak met 'soft technology' worden volstaan. Veel van de processen in kwestie bestaan al geruime tijd maar konden niet uitgroeien door gebrek aan gunstige socio-economische omstandigheden. Dit leert ons de les dat de te verwachten werkelijke behoefte een betere gids is voor toegepaste research op lange termijn dan de onmiddellijke economische rentabiliteit.

Voedselproduktie Een voorbeeld is de produktie van gisteiwit uit aardolie waartoe de principiële mogelijkheid reeds sinds het begin van deze eeuw bestond. Het eerste serieuze ontwikkelingswerk begon in

de vijftiger jaren en werd tot aan het eind van de zestiger jaren vrijwel uitsluitend sceptisch gadegeslagen als een economisch waagstuk. Door de sterk gestegen eiwitprijzen ontwikkelt het proces zich nu met een gezonde snelheid; de produktie in Europa heeft de 20 000 ton eiwit per jaar overschreden en de wereldproduktie zal binnenkort enkele honderdduizenden tonnen belopen. Methaan en methanol komen naast aardolie als substraat in aanmerking.

Hoewel het produkt voorlopig nog als veevoer wordt gebruikt moet het historisch belang van het slagen van het proces niet onderschat worden omdat (1) microben nu voor het eerst op grote schaal door de mens als eiwitbron zijn aangeboord naast dieren en planten; (2) voor het eerst industriële naast agrarische eiwitproduktie mogelijk is geworden en (3) een doorbraak is gemaakt die gebruik van andere substraten en andere microben voor produktie van SCP (single-cell protein = microbeneiwit) zal bevorderen.

Als de meest rechtlijnige weg hiertoe was het kweken van algen uiteraard allang onderkend. In het ideale geval zou een voor de mens eetbare alg met grote opbrengst per hectare gekweekt moeten worden, met liefst waterverontreinigende mineralen als voedingszouten. Hoewel dit ideaal bepaald nog niet bereikt is, is toch het onderzoek in deze richting sterk op gang gekomen. De voorwaarden noodzakelijk voor succes zijn echter verre van gering:

– Omdat steriliseren en aseptisch kweken duur is, moet men een algensoort gebruiken die door ecologische manipulatie, dat wil zeggen door regeling van de kweekcondities (pH, temperatuur, mediumsamenstelling etc.), als meerderheidsorganisme in een open-luchtcultuur kan worden gehandhaafd.

– Men moet een alg gebruiken met goede voedingswaarde en verteerbaarheid, die bovendien snel wil groeien, niet toxisch is en gemakkelijk kan worden geconcentreerd en verwerkt.

Spirulina voldoet vrij aardig aan deze criteria: het is een blauwgroene alg (bacterie) die geen stikstof bindt en aan een hoge pH en een hoog zoutgehalte de voorkeur geeft. De cellen bestaan uit filamenten en laten zich daardoor gemakkelijk affiltreren. Het eiwitgehalte is ca. 60% van de droge stof. De alg domineert in vele alkalische Afrikaanse meren en wordt rondom het Chad-meer geoogst en gegeten. In het Nakuru-meer in Kenya is *Spirulina* de belangrijkste voedselbron voor miljoenen flamingo's, die kennelijk eveneens van de gemakkelijke filtreerbaarheid gebruik maken. In Mexico werd de alg

in het verleden door de Azteken gegeten, evenals nu nog in enkele afgelegen dorpen.

De maatschappij Sosa Texcoco in Mexico City exploiteert op het ogenblik een stuk zoutmeer waar per dag 1 ton *Spirulina*-eiwit in continubedrijf wordt gewonnen; men verwacht de produktie binnenkort tot het honderdvoudige op te voeren. Het proces voldoet nog lang niet aan het gestelde ideaal, aangezien het gehalte aan nitraat en fosfaat door toevoeging van kunstmest in plaats van afvalstoffen op peil wordt gehouden. Verder wordt het produkt voorlopig nog als voedsel voor dieren gebruikt. Het is vooral in Japan in trek omdat het hoge carotenoïdgehalte ervan gunstig werkt op de kleurvorming in siervissen en -vogels.

Een geheel andere benadering wordt gevolgd door een Duits-Thailandse werkgroep in Bangkok, die de groene alg *Scenedesmus* op semi-technische schaal kweekt in ondiepe ringkanalen, waarin de vloeistof als in oxydatiesloten door draaiende borstels in beweging wordt gehouden. Men werkt in batchcultuur in een synthetisch mineraal medium onder constant inblazen van koolzuur. Het blijkt mogelijk door zwaar te enten zonder verdere sterilisatie de cultuur in enkele dagen in de open lucht te laten uitgroeien zonder last te krijgen van concurrerende of parasitaire (micro-)organismen. Deze blijven echter wel een constante bedreiging vormen. Er wordt 200 ton droog algenpoeder per jaar geproduceerd en een oogst van 50 ton per hectare bleek mogelijk. Voorlopige voedingsproeven met proefdieren en mensen verliepen gunstig. Oogsten is slechts mogelijk door centrifugeren.

Het is duidelijk dat men in het laatste voorbeeld door middel van inschakeling van technische controlemiddelen een grotere vrijheid heeft gekocht ten aanzien van de keuze van de te kweken algen. In hoeverre deze benadering ook werkelijk nodig zal blijken valt niet te zeggen, omdat nog zo weinig van de algenecologie bekend is. Het is belangwekkend in dit verband aan te stippen dat in het Franse proces voor gisteiwitproduktie uit aardolie met succes zonder sterilisatie kan worden gewerkt. De gist in kwestie, *Candida tropicalis* kan door ecologische beheersing (pH, temperatuur), als meerderheidsorganisme in continucultuur worden gehandhaafd.

Beide besproken pogingen tot algenkweek mikken hoog en vragen nog veel ontwikkeling, zowel ten aanzien van het te gebruiken medium als naar de gebruiksmogelijkheden van het produkt. In deze ontwikkeling zal de 'ontmoeting' met de bestaande afvalwaterzui-

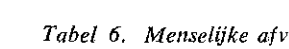
veringsmethode door zogenaamde oxydatievijvers van groot belan zijn. Deze methode heeft wel een vrij groot landoppervlak nodig maar is weinig bewerkelijk en goedkoop en daardoor in tropische lan den veel gebruikt. De organische stof in het rioolwater wordt daarbi uiteindelijk in algencellen omgezet, welke in suspensie zonder vee nadelige gevolgen in oppervlaktewater geloosd plegen te worden. De algen groeien op de zouten en het koolzuur dat mineraliserende bac teriën in de onderste lagen produceren, op hun beurt profiterend var de door algen vrijgemaakte zuurstof. Bij deze methode bestaat uiter aard weinig controle op de geproduceerde algenpopulatie.

Een ander verwant proces wordt gevonden in de bekende visvijvers in Z.O.-Azië waarin menselijke en dierlijke afvalstoffen gedeeltelijk via algen in viseiwit worden omgezet. Rationalisatie van hygiëne en opbrengst van dit eeuwenoude recycleringsmechanisme kan voor dorpsgemeenschappen van groot belang zijn.

Hetzelfde geldt voor de Oosterse fermentatieprocessen van bijvoorbeeld rijst, soja, vlees, vis en groenten, die tot grotere houdbaarheid en verbetering van smaak en voedingswaarde leiden. Deze zijn doorgaans gebaseerd op empirisch gecontroleerd 'bederf' volgens traditionele recepten. Deze processen zijn van groot belang voor de voeding van miljoenen Aziaten maar zijn nog onvoldoende bestudeerd. Alleen al in Korea kent men meer dan veertig verschillende voedselfermentaties.

Energie In het kader van de energieschaarste is de begrijpelijke wens gerezen winning van fossiele brandstoffen door produktie van recent fotosynthaat te vervangen. Dit komt dan neer op het kweken van landplanten of algen die gemakkelijk kunnen worden omgezet tot een transportabele dus gasvormige of vloeibare energiedrager zoals methaan, waterstof, ethanol of methanol. Enzymatische omzettingen van koolhydraten, inclusief cellulose, tot vergistbare suikers en de geschiktheid van verschillende algensoorten als substraat voor methaangisting zijn dan ook in versterkte mate in de belangstelling gekomen. Aangezien koolhydraten ook een uitstekend substraat voor SCP-produktie zijn, wordt het nu om verschillende redenen aantrekkelijk om bij de keuze van te kweken landbouwgewassen de opbrengst vergistbaar substraat per hectare per jaar als criterium te betrekken. Ten aanzien van het gebruik van algen voor vastlegging van zonne-energie zij nog opgemerkt dat in theorie hier de mogelijkheid is gegeven om

met een constante doch steeds recirculerende hoeveelheid mineralen methaan en zuurstof te produceren volgens de bruto vergelijking:



$$CO_2 + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 2O_2$$

Ten aanzien van menselijke en dierlijke afvalstoffen geldt als ideaal zowel de energie als de mineralen erin nuttig te gebruiken en vervolgens de mineralen te recycleren. Tabel 6 geeft aan welk een verspilling de conventionele biologische afvalwaterzuivering betekent en welk een uitdaging de benutting van menselijk afval aan de microbiologische techniek stelt. Dit laatste wordt het duidelijkst gedemonstreerd door de constatering dat de hoeveelheid gebonden stikstof die een mens per dag loost juist genoeg is voor de produktie van een hoeveelheid eiwit die zelfs nog groter is dan het door de FAO aangegeven minimum dagrantsoen van 70 g.

Als gevolg van de groeiende bio-industrie wordt het steeds moeilijker dierlijke excreta als mest terug te voeren naar de plaats waar het veevoer werd verbouwd. Vooral in de Verenigde Staten, waar bijvoorbeeld 12 miljoen runderen in ca. 2000 bedrijven voor vleesproduktie worden opgefokt, dienen zich nieuwe oplossingen aan. Methaangisting gekoppeld aan koolzuurwinning en verwerking van het achterblijvende slib tot kunstmest werd door de Montfort-maatschappij gekozen voor diens reuzebedrijf in Colorado waar 100 000 runderen per dag 1650 ton mest produceren met een methaanopbrengst van 113 000 m^3/dag waarmee ca. 10 000 huizen verwarmd kunnen worden. Uiteraard

Tabel 6. Menselijke afvalstoffen als grondstof.

Afvalproduktie per persoon per dag	Maximaal theoretische opbrengst	Proces
81 g Organische stof uitgedrukt in O_2-equivalenten	29 g CH_4 40 g S 28 g N_2	methaangisting reductie van gips nitraatverwijdering
13 g Organisch en anorganisch gebonden stikstof	81 g eiwit 59 g HNO_3 16 g NH_3	volledige omzetting in eiwit volledige nitrificatie volledige ammonificatie
1,4 g Fosfor	150 g fotosynthaat of 200 g O_2-equivalenten 49 g CH_4	algenproduktie algenproduktie gevolgd door methaangisting

werkt een dergelijk project stimulerend op onderzoek en ontwikkeling van het methaangistingsproces dat technisch nog steeds in een primitief stadium verkeert. De Ceres Ecology Corporation volgt een geheel andere benadering. De rundermest wordt in drie fracties gesplitst: (1) onverteerbare vezels die al of niet na fermentatie weer als veevoer dienst kunnen doen; (2) een humusfractie die voor grondverbetering kan worden gebruikt; (3) een brei die na gisten, drogen en pasteuriseren met ander veevoer vermengd kan worden; het hoge eiwitgehalte (27%) van deze fractie is hoofdzakelijk van bacteriën afkomstig. In feite verhoogt men dus de efficiëntie van de spijsvertering van het rund door een technologische maar ook microbiologische extra 'maag' aan de reeds bestaande toe te voegen.

Samenvatting

Pogend nu tot een samenvatting te komen van mijn noodzakelijkerwijs fragmentarisch betoog moet ik voorop stellen dat 'in den beginne', toen alle leven nog uitsluitend uit microben bestond, de microben genetisch zowel als ecologisch de grondslag hebben gelegd voor het leven op aarde zoals wij dat in zijn uitbundige verscheidenheid kennen.

Sedert de mens ontstond was zijn bestaan omgrensd door een voor hem onwaarneembare microbenwereld die op grillige wijze gaf en nam. Gedurende lange tijd was echter het rund de mens ver vooruit in de kunst van exploitatie van het microbenrijk: tot circa een eeuw geleden beperkte de mens zich tot halfbakken empirische initiatieven ten aanzien van alcoholische gisting, voedselfermentatie en -conservering. Pas sedert Pasteur is de mensheid zich bewust geworden van de wijze waarop zijn lot met dat van de microben is vervlochten en zonder aan zijn uiteindelijke afhankelijkheid van de microben te kunnen ontsnappen is hij intussen begonnen op de hem eigen wijze zijn relatie tot de microbenwereld ten gunste van eigen evolutie te herscheppen. De grote vorderingen die hierbij in de ontwikkelde landen zijn gemaakt, zijn nog in zeer onvoldoende mate tot de Derde Wereld doorgedrongen. De huidige crisis ten aanzien van milieu, grondstoffen, voedsel en energie biedt een speciaal en boeiend spanningsveld voor een versnelde ontwikkeling in het temmen en exploiteren van de microben.

Microbiologische afbraak van synthetische verbindingen

G. J. E. Thijsse

Inleiding

Eeuwenlang heeft de mens alleen de produkten die de natuur hem bood, kunnen gebruiken om zijn leven te veraangenamen. Pas in de negentiende eeuw, toen de scheikunde zich snel tot een exacte wetenschap ontwikkelde en men niet alleen een inzicht kreeg hoe de atomen in organische molekulen gerangschikt waren, maar ook de werkwijzen vond om ze zo te rangschikken, veranderde dit.

De eerste synthesen waren er voor het grootste deel op gericht de natuur te imiteren. De uitgangsprodukten waren veelal afkomstig uit de bijprodukten van de gas- en kolenindustrie. Wegens de steeds toenemende vraag naar nieuwe en goedkopere produkten werden niet alleen nieuwe synthesewegen beproefd, maar werd ook gezocht naar methoden om produkten te maken die de natuurlijke voorgangers konden vervangen. Tegelijkertijd kwamen andere grondstoffen, onder andere verkregen uit de aardolieraffinage, in grote hoeveelheden beschikbaar. Vervangingsprodukten (Ersatz!) hadden aanvankelijk voor velen de bijsmaak van minderwaardig. Ten onrechte, want al spoedig bleken deze produkten ook kwalitatief ernstige mededingers van de natuurprodukten.

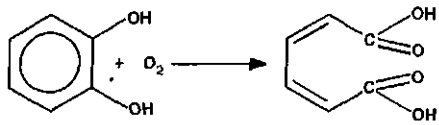
Bij al deze nieuwe produkten was binnen het raamwerk van de beschikbare grondstoffen de 'performance', dus de geschiktheid voor het doel waarvoor ze ontworpen werden, het belangrijkst. Aan de vraag of deze op maat gemaakte molekulen konden worden afgebroken en gemineraliseerd, en dus weer aan de levenskringlopen konden deelnemen, als ze na gebruik in 'Het Milieu' terecht kwamen, werd vooreerst niet gedacht.

Enige bezorgdheid over deze gang van zaken leek echter wel gewettigd – prof. Kluyver wees hier al voor de tweede wereldoorlog op – omdat deze verbindingen geen enkele band meer hadden met pro-

dukten die in de natuur voorkomen. Zij zouden dus niet door de microflora gemetaboliseerd kunnen worden, aan het biologische reinigingsproces ontsnappen en een blijvende verontreiniging van het milieu geven. Aan de andere kant gebruikt bijvoorbeeld het organisme mens in zijn dagelijks leven voortdurend verbindingen zoals alkaloïden, geneesmiddelen, specerijen en dergelijke, die voor zijn stofwisselingspatroon vreemd zijn. Desalniettemin ondergaan een zeer groot aantal van deze lichaamsvreemde stoffen gedurende hun verblijf in het organisme vaak wel degelijk flinke veranderingen.

De enzymen die in staat zijn deze lichaamsvreemde verbindingen af te breken of ingrijpend te veranderen, blijken vaak te behoren tot de groep van de *oxygenasen*. Ze zijn wijd verbreid en komen in alle aërobe organismen voor. Het zijn deze enzymen die bij de mens, voornamelijk in de lever geconcentreerd, de lichaamsvreemde stoffen omzetten. Zij zijn het ook, die bij de bacteriën veelal de eerste veranderingen van vele synthetische verbindingen bewerkstelligen.

Het bestaan van de oxygenasen is nog niet zo lang geleden ontdekt. In 1950 werd bij een *Pseudomonas* een enzym geïsoleerd, dat de splitsing van de benzeenring van catechol volgens onderstaand schema katalyseerde:



cis,cis-muconzuur

Volgens de toen heersende opvattingen leek dit vrijwel onmogelijk. Immers men meende dat de enige wijze waarop zuurstof in een molekuul terecht kon komen, was door de inbouw van water, die volgde op de voorafgegane dehydrogenering. Door het gebruik van $^{18}O_2$ en $H_2{}^{18}O$ werd echter het vóórkomen van bovenstaande reactie onomstotelijk bewezen. In een atmosfeer met $^{18}O_2$ is de zuurstof in het gevormde *cis,cis*-muconzuur inderdaad het ^{18}O, terwijl met een normale $^{16}O_2$-atmosfeer en $H_2{}^{18}O$ in de waterfase, het gevormde *cis,cis*-muconzuur geen ^{18}O bevat.

Zeer schematisch zijn de oxygenasen als volgt in te delen:

– Di-oxygenasen. Hierbij wordt het gehele zuurstofmolekuul in het substraat ingebouwd.

– Mono-oxygenasen: een kruising tussen een oxygenase en oxydase. Hierbij wordt maar één atoom van het zuurstofmolekuul in het sub-

straat ingebouwd, het andere wordt tot H_2O gereduceerd – vandaar hun andere naam: 'mixed-function oxygenases'. Hierbij is de aanwezigheid van een H-donor onontbeerlijk, zoals NADH en NADPH. In een levende cel is hieraan uiteraard automatisch voldaan. In een enzympreparaat moet een H-donor worden toegevoegd.

Het begrip oxygenase houdt in dat vrije zuurstof een conditio sine qua non is en niet vervangen kan worden door waterstofacceptoren zoals methyleenblauw, nitraat en sulfaat. Deze enzymen worden dan ook alleen in aërobe of facultatief aërobe organismen aangetroffen.

Di-oxygenasen katalyseren hoofdzakelijk de ringsplitsing van aromatische verbindingen. Mono-oxygenasen katalyseren hydroxyleringsreacties van zowel aromatische als alifatische verbindingen. Zij katalyseren bovendien een groep van uiteenlopende reacties zoals de vorming van epoxyden, decarboxyleringen, de-amineringen, de-alkyleringen en de vorming van N- en S-oxyden. Het uiteindelijk verloop van al deze reacties moge verschillend zijn, het begin is steeds het invoeren van een zuurstofatoom.

Het algemeen voorkomen en hun grote mate van a-specificiteit binnen een groep van verbindingen maken deze mono-oxygenasen zeer waardevol bij de afbraak van allerlei vreemde verbindingen. Hoewel de enzymen van deze groep niet de enige zijn die in de afbraak van moeilijk afbreekbare verbindingen een belangrijke rol spelen, zijn ze wel de belangrijkste. Daarom zijn ze hier apart genoemd; de andere voor de afbraak van dit soort verbindingen verantwoordelijke enzymen komen vanzelf bij de voorbeelden ter sprake.

De voorbeelden van de microbiologische afbraakmechanismen van synthetische verbindingen zijn gekozen uit het onderzoek over de afbraak van detergenten, omdat hierbij vrijwel alle aspecten van de afbraak van deze levensvreemde verbindingen ter sprake komen. Tevens zijn het ook de verbindingen waarbij voor het eerst op overduidelijke wijze moeilijkheden bij de afvalwaterzuivering werden ondervonden. Moeilijkheden, die opgelost werden dank zij een groeiend inzicht in de wijze waarop dit soort verbindingen microbiolologisch worden afgebroken.

Microbiologische afbraak van detergenten

Alkylbenzeensulfonaten $NaSO_3(C_6H_4)C_nH_{2n+1}$

Vanaf 1945 werden de klassieke zeeppoeders langzaam maar zeker verdrongen door de nieuwe synthetische wasmiddelen. Omstreeks 1950 werd een nieuw detergent in een aantal zeer succesvolle wasmiddelen gebruikt, het Dobs PT. Dit alkylbenzeensulfonaat was verkregen door eerst benzeen onder invloed van een katalysator te condenseren met tetrapropyleen, een sterk vertakte koolwaterstof, en vervolgens het zo verkregen alkylbenzeen met zwavelzuur om te zetten in het sulfonaat. Het nieuwe produkt had naast goede waseigenschappen met andere synthetische detergenten gemeen, dat het veel minder gevoelig was voor de calciumionen in het water. Deze eigenschap kon nog aanzienlijk worden verbeterd door toevoeging van natriummetafosfaat aan het waspoeder.

In de jaren na 1950 bleek er iets met de waterzuivering mis te zijn. Tijdens het proces van de afvalwaterreiniging ontstonden er grote schuimbergen, die niet in de zuiveringsinstallatie bleven, maar tijdens de lozing van het gereinigde water vrolijk mee dreven en zo het buitenwater op exotische wijze versierden. Omdat in Engeland de eerder gebruikte alkylsulfaten ($C_nH_{2n+1}OSO_3Na$) nooit moeilijkheden hadden gegeven in de waterzuiveringsinstallaties, werd de schuld gegeven – en zoals later bleek terecht – aan de sulfonaatverbindingen.

Nu worden bij het zoeken naar een nieuw produkt uiteraard tientallen verwante verbindingen gemaakt, zodat een redelijk aantal zuivere verbindingen met een bekende structuur beschikbaar was. Uit een groot aantal experimenten met deze modelverbindingen bleek dat het verschil in microbiologische afbreekbaarheid niet afhangt van het feit of het een sulfaat- dan wel een sulfonaatverbinding is, maar van de structuur van het koolstofskelet.

Zo wordt het alkylbenzeensulfonaat uit fig. 1a, met een groot aantal vertakkingen, niet of nauwelijks afgebroken, terwijl de verbinding met een rechte structuur (fig. 1b) geen enkele moeilijkheid geeft. Dat rechte structuren gemakkelijker afbreekbaar zijn dan vertakte structuren geldt vrij algemeen en niet alleen voor alkylbenzeensulfonaten.

In principe was het probleem dus opgelost en het woord was nu aan de chemische techniek, die zich voor de taak zag gesteld uit de beschikbare grondstoffen olefinen met een zo recht mogelijke keten

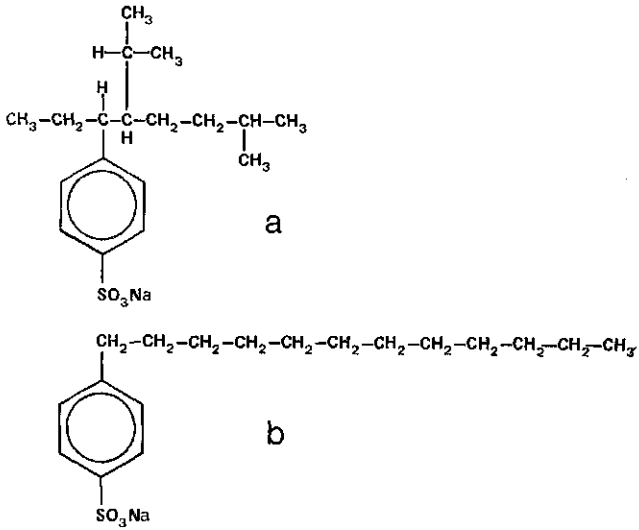


Fig. 1. a: tetrapropyleenbenzeensulfonaat; b: recht n-*alkylbenzeensulfonaat.*

te maken. In het algemeen kan men zeggen dat dit redelijk is gelukt en dat de huidige alkylbenzeensulfonaten geen probleem meer geven bij de afvalwaterzuivering.

Bekijken we nu het afbraakmechanisme van deze alkylbenzeensulfonaten door bacteriën zoals in fig. 2 is weergegeven. In analogie met de microbiologische afbraak van alkanen door micro-organismen, geschiedt de eerste aantasting via de CH_3-groep, waarin, via een 'mixed-function oxygenase', een OH-groep wordt ingevoerd. De alcohol die hierbij ontstaat, wordt door een dehydrogenase, via een aldehyde, tot een vetzuur geoxydeerd. Door β-oxydatie wordt dit zuur trapsgewijs ingekort, totdat uiteindelijk benzoëzuursulfonaat of fenylazijnzuursulfonaat overblijft, alnaargelang de keten een oneven of even aantal koolstofatomen bezat.

Vervolgens wordt de sulfonaatgroep afgesplitst, waarbij sulfiet ontstaat. Het mechanisme hiervan is niet geheel bekend, dit in tegenstelling tot de afsplitsing van de sulfonaatgroep bij de alkaansulfonaten, zoals wij later zullen zien.

Volledigheidshalve dient te worden opgemerkt dat volgens sommige onderzoekers (Willets, 1973) bij bepaalde reinculturen de afsplitsing van de sulfonaatgroep en de vervanging door een OH-groep de aller-

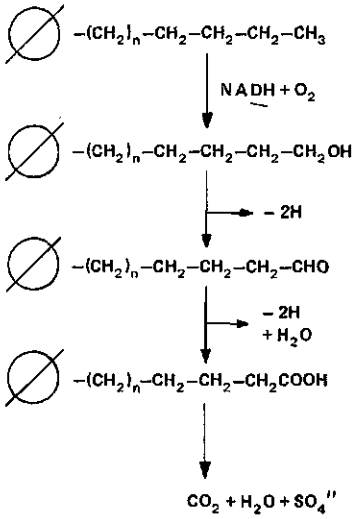


Fig. 2. Afbraakschema n-*alkylbenzeensulfonaat.*

eerste stap in de aantasting is. Het zo gevormde intermediair wordt dan vervolgens via het gegeven schema verder afgebroken.

Afbraak van hydroxyfenylazijnzuur of hydroxybenzoëzuur door middel van oxygenasen is bekend. Er ontstaan polyhydroxybenzeenderivaten, waarbij door een di-oxygenase de ring wordt geopend. De precieze afbraakweg van de gevormde carbonzuren is niet in detail bekend, maar via muconzuurderivaten ontstaan produkten die zonder meer passen in de normale metabolische cycli.

Wat zijn nu de redenen dat vertakkingen de afbraak bemoeilijken?
– Door de vertakking kan de hydroxyleringsreactie geremd worden: het substraat past minder goed op het enzym, en
– de normale β-oxydatie van het vetzuur, dat als tussenprodukt gevormd wordt, wordt door de vertakkingen belemmerd.
Hoewel uit een aantal publikaties over de afbraak van alkylbenzeensulfonaat wel valt af te leiden hoe de microbiologische hydroxylering van de alkaanketen door de structuur wordt beïnvloed, zijn toch de onderzoekingen van Van Ravenswaay Claasen & Van der Linden (1971), die speciaal daarop gericht waren, het meest verhelderend.

Terwijl het hydroxylerend enzym in het bacterie-extract rechte ketens vrijwel steeds met dezelfde snelheid aantast, blijkt dat vertak-

Tabel 1. Oxydatie van vertakte alkanen door een ruw preparaat van de alkaanhydroxylase. De produkten zijn niet geïdentificeerd.

Substraat	Snelheid[1]	Substraat	Snelheid[1]
2-Methylhexaan	60	2,4-Dimethylhexaan	30
3-Methylhexaan	40	2,5-Dimethylhexaan	30
2,2-Dimethylhexaan	5	3,4-Dimethylhexaan	10
2,3-Dimethylhexaan	15	2,2,4-Trimethylpentaan	0

1. In arbitraire eenheden. De grootste gemeten snelheid, die met *n*-octaan, werd op 100 gesteld.

kingen de reactie aanmerkelijk vertragen: blijkbaar past hét molekuul niet meer zo goed in het enzym (tabel 1). Uit de resultaten van hun onderzoekingen blijkt dat de gevoelige plaats op het enzym een kloof moet zijn van ca. 0,5 nm breed en ca. 0,8 nm diep. Voor een goede enzymreactie moet het te hydroxyleren deel van het molekuul in de sleuf passen. Om deze reden wordt het isobutylbenzeen, dat een dikkere ruimtelijke structuur heeft dan het isopentylbenzeen, niet geoxy-

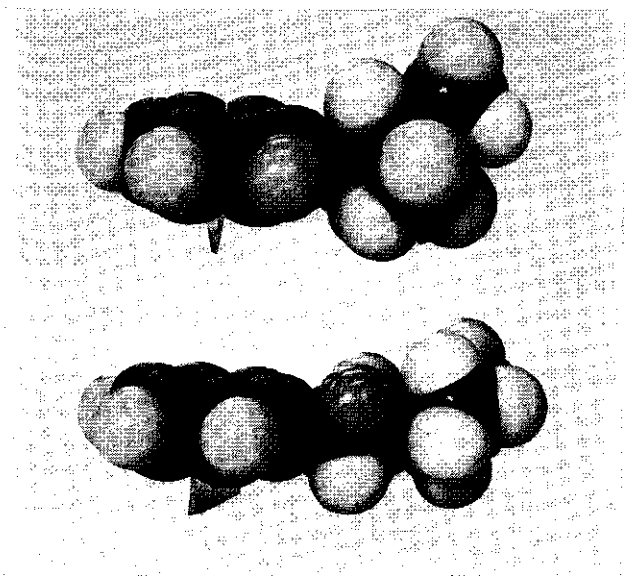


Fig. 3. Boven: isobutylbenzeen; onder: isopentylbenzeen.

Tabel 2. Oxydatie van 2,2-dimethylalkanen door de alkaanhydroxylase. De produkten zijn niet geïdentificeerd.

Substraat	Snelheid[1]	Substraat	Snelheid[1]
2,2-Dimethylpentaan	0	2,2-Dimethyloctaan	100
2,2-Dimethylhexaan	5	2,2-Dimethylnonaan	100
2,2-Dimethylheptaan	90		

1. In arbitraire eenheden. De grootste gemeten snelheid, die met *n*-octaan, werd op 100 gesteld.

deerd en zijn slankere broeder wel (fig. 3). Evenzo wordt 2,2-dimethylhexaan, omdat zijn CH_3-groep de bodem van de kloof niet kan bereiken, minder goed geoxydeerd dan de langere dimethylalkanen (tabel 2). Gezien deze uitkomsten behoeft de slechte afbraak van het tetrapropyleenbenzeensulfonaat ons helemaal niet meer te verwonderen. Verder verklaren hun resultaten het feit dat vooral vertakkingen aan het uiteinde van de keten, dus bij de methylgroep, de afbraak remmen.

Als de vertakkingen van de alkaanketen, omdat zij zich dichter bij de benzeengroep bevinden, de hydroxylering en de oxydatie tot een vetzuur niet hebben verhinderd, wat is dan de invloed van de vertakkingen op de β-oxydatie? In fig. 4 is de β-oxydatie schematisch weergegeven: bij rechte vetzuren is X=H en bij de vertakte is het een alkylgroep. Op de aangegeven plaats zal, behalve misschien door sterische hindering, de β-oxydatie rustig kunnen doorgaan: geen van de dehydrogeneringen of de hydrateringen wordt verhinderd.

Anders is het gesteld als de alkylgroep op het derde C-atoom zit! Dan is de normale β-oxydatie volledig gestoord; immers dehydrogenering van de hydroxyverbinding is dan onmogelijk. Toch heeft de bacterie daar weer een antwoord op.

Eén mogelijkheid is dat met behulp van een carboxylase aan de CH_3-groep CO_2 wordt aangelegd. Uit het hierdoor ontstane glutaarzuurderivaat wordt, door enkele stappen van de β-oxydatie, een gesubstitueerd 3-hydroxyglutaarzuur gevormd, dat gemakkelijk gesplitst wordt in andere rechte vetzuren (fig. 5). Het is echter lang niet zeker dat dit voor alle 3-hydroxyglutaarzuurderivaten geldt!

Een andere mogelijkheid is dat door een hydroxylerend enzym een hydroxylering op het α-C-atoom wordt uitgevoerd. Door CO_2-afsplit-

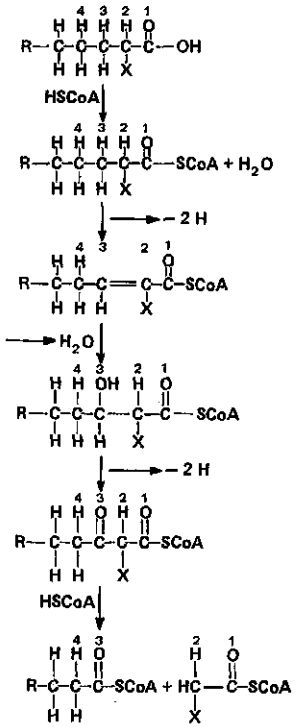


Fig. 4. β-Oxydatie van een vetzuur.

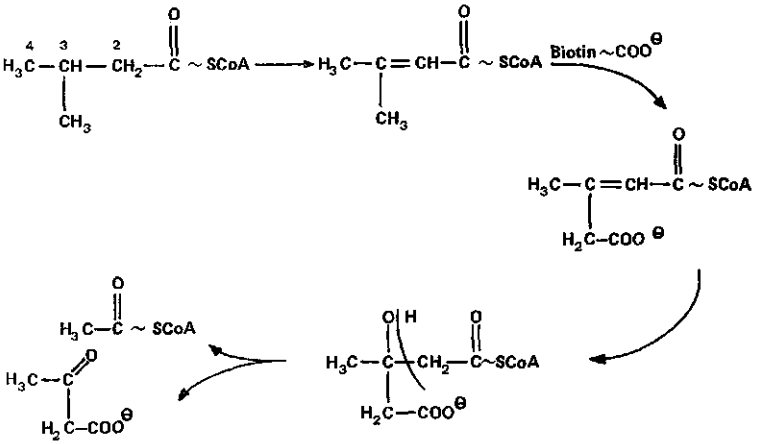


Fig. 5. Biologische afbraak van een vertakt vetzuur.

sing ontstaat een vetzuur met een C-atoom minder. Dit is de zogenaamde α-oxydatie van vetzuren. Door deze gang van zaken is het C-atoom met de vertakking in een veel gunstiger positie gekomen en kan de normale β-oxydatie verder gaan.

Veel ernstiger is het vóórkomen van quaternaire C-atomen. In dergelijke gevallen kan alleen hydroxylering van de CH_3-groep uitkomst brengen. Zo wordt bijvoorbeeld het trimethylazijnzuur, hoewel zeer langzaam, toch volledig afgebroken tot dimethylmalonzuur. Dimethylmalonzuur zou verder worden ontleed tot CO_2 en isoboterzuur. Het bovenstaande moge duidelijk maken dat, al is de eerste omzetting gelukt, het ontstaan van een rechte keten de volledige afbraak zeker ten goede komt.

Secundaire n-alkylsulfaten

Evenals de primaire *n*-alkylsulfaten zijn de secundaire *n*-alkylsulfaten een bestanddeel van allerlei schoonmaakmiddelen, bijvoorbeeld van het vrij bekende Teepol. Terwijl de primaire *n*-alkylsulfaten ook door anaërobe bacteriën volledig afgebroken kunnen worden, gelukt dat niet met de secundaire.

Toch zijn de eerste stappen in de afbraakmechanismen ongeveer hetzelfde. In beide gevallen wordt door een sulfaat-hydrolyserende esterase, een enzym in vele bacteriën aanwezig, sulfaat afgesplitst en een alcohol gevormd. Wordt de primaire alcohol, gevormd uit het primaire sulfaat, via aldehyde, vetzuur en β-oxydatie door klassieke dehydrogenasen verder ontleed, uit de secundaire alcohol, gevormd uit het secundair alkylsulfaat, kan door een dehydrogenase alleen nog maar een keton gevormd worden. Voor de verdere afbraak is een 'mixed-function oxygenase' nodig.

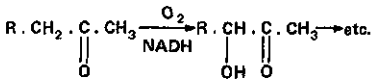
Nu zijn er voor deze ketonafbraak twee verschillende mechanismen voorgesteld:

(a) hydroxylering van de CH_2-groep naast de C=O naar het schema van Lijmbach (Lijmbach & Brinkhuis, 1973);

(b) invoeging van een zuurstofatoom tussen de C=O en de CH_2-groep naast de C=O. Dit mechanisme zou overeenkomen met de Baeyer-Villiger-oxydatie van ketonen in de organische chemie volgens het schema van Forney & Markovetz (1968).

In mechanisme (a) wordt de verbinding tussen de C=O en de CHOH via dehydrogenering en hydratering verder gesplitst in twee

a



b

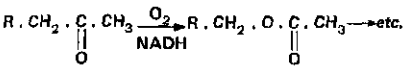


Fig. 6. Bacteriologische afbraak van een keton.

vetzuren (fig. 6a). Deze reactie werd onder meer bewezen door de vorming van radioactief acetoïne uit [2-^{14}C]2-butanon.

De in tabel 3 vermelde vetzuren werden uit diverse secundaire alcoholen gevormd, door een ruw celvrij extract van bacteriën die gegroeid waren op 2-butanol, met deze alcoholen gedurende ca. 4 uur te schudden. NADH was in al deze experimenten de H-donor voor de 'mixed-function oxygenase'. Tijdens deze reacties ontstond vaak een kleine hoeveelheid primaire alcohol, gevormd door de reductie van het langere vetzuur.

In mechanisme (b) ontstaat door invoeging van het zuurstofatoom een ester die via een esterase in alcohol en vetzuur gesplitst wordt (fig. 6b). Tegen schema (b) kan worden ingebracht, dat gedurende de lange incubatietijd van de enzymreactie ook een ester gevormd zou kunnen worden volgens schema (a), ontstaan uit de door reductie gevormde alcohol en het andere vetzuur. Echter bij uitvoering van hun enzymreacties in een atmosfeer van $^{18}O_2$ vonden Britton et al. (1974) dat de O in de alcohol van de ester, voor ca. 90% ^{18}O was. Dit zou niet mogelijk geweest zijn als de alcohol door enzymatische reductie

Tabel 3. Afbraak van secundaire alcoholen.

Substraat	Gevormde vetzuren
2-Butanol	azijnzuur
2-Pentanol	propionzuur + azijnzuur
2-Octanol	pentaancarbonzuur + azijnzuur
3-Hexanol	propionzuur
3-Nonanol	propionzuur + pentaancarbonzuur
3-Decanol	propionzuur + hexaancarbonzuur
4-Decanol	boterzuur + pentaancarbonzuur
5-Decanol	valeriaanzuur

van een vetzuur was ontstaan, omdat tijdens deze reactie en ook bij de vorming van het vetzuur uitwisseling met $H_2{}^{16}O$ zou optreden.

Dat de afbraak van acetofenon eveneens via O-invoeging verloopt, is door Cripps (1975) bewezen. Zoals zo vaak bij micro-organismen voorkomt, zijn er blijkbaar verscheidene wegen om eenzelfde produkt af te breken.

Niet-ionogene detergenten van het type alcohol-ethoxylaat $CH_3(CH_2)_nO(CH_2CH_2O)_mH$

Niet-ionogene detergenten van het type alcohol-ethoxylaat worden verkregen door condensatiereactie van alcoholen met ethyleenoxyde. Zij worden algemeen toegepast in was-, afwas- en schoonmaakmiddelen. De microbiologische afbraak van deze verbindingen geeft geen bijzondere moeilijkheden, mits de alkaanketen recht is en de polyethyleenoxydeketen niet te lang is. De afbraak verloopt zowel via de alkaanketen als via de polyethyleenoxydeketen.

De afbraak van de alkaanketen is hierboven reeds beschreven en dus wordt hier alleen de afbraak van de polyethyleenoxydeketen behandeld. Het gaat hier om de afbraak van een ether-structuur en deze is onder andere door Heydeman (1974) bestudeerd.

Ook hier wordt weer, zoals blijkt uit zijn studie van de microbiologische afbraak van diethylether door een 'mixed-function oxygenase', een hydroxylgroep ingevoerd. Niet aan de CH_3-groep maar aan de CH_2-groep naast de zuurstof, waardoor de instabiele semiacetaalstructuur-CHOH-O-CH_2- ontstaat (fig. 7). Dit semiacetaal ontleedt in een alcohol en aldehyde of wordt door een alcohol-dehydrogenase tot een esterstructuur geoxydeerd en via een esterase gesplitst in alcohol en azijnzuur. Ook bij hogere ethers, bijvoorbeeld dibutylether, is hetzelfde principe werkzaam en in dit geval ontstaat tijdens de afbraak boterzuur. Veilig kan worden aangenomen dat eenzelfde afbraakmechanisme ook werkzaam is bij de afbraak van de polyethyleenoxydeketen. De produkten die hierbij ontstaan, zoals glycolzuur, worden

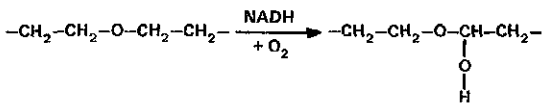


Fig. 7. Bacteriologische afbraak van een ether.

verder gemakkelijk in de stofwisseling opgenomen.

n-Alkaan-1-sulfonaat $CH_3(CH_2)_nCH_2SO_3Na$

Hoewel de primaire *n*-alkaansulfonaten nog niet zijn gebruikt als detergent, is hun biologische afbraak door een *Pseudomonas*-stam interessant. Hierbij kan namelijk de wijze waarop een sulfonaatgroep wordt afgesplitst, duidelijk worden gedemonstreerd (Thijsse & Wanders, 1974). Dit is anders dan bij de alkylbenzeensulfonaten, waar de afsplitsing van het sulfonaat nog steeds niet duidelijk is.

Bij deze alkaansulfonaten wordt weer met behulp van een 'mixed-function oxygenase' een hydroxygroep ingevoerd en wel aan het C-atoom naast de sulfonaatgroep. De verbinding die hierbij ontstaat, is het 1-hydroxyalkaan-1-sulfonaat $CH_3(CH_2)_nCHOHSO_3Na$, dat identiek is met het sulfiet-additieprodukt van een aldehyde. Het valt gemakkelijk uiteen in zijn componenten. De vorming van het 1-hydroxyalkaan-1-sulfonaat kon weliswaar nog niet worden aangetoond, maar wel kon in experimenten met celvrije extracten, verkregen uit bacteriën gegroeid op alkaan-1-sulfonaat, de vorming van sulfiet uit alkaan-1-sulfonaat worden aangetoond. Omdat in deze experimenten de oxydatie van aldehyde naar vetzuur zeer snel verloopt, werd een ander aldehyde tezamen met het alkaansulfonaat aan het celvrije bacterie-extract toegevoegd. Het toegevoegde aldehyde zal met het te verwachten aldehyde wedijveren om een plaats op het aldehyde-oxyderende enzym. Met behulp van deze methode (substraatcompetitie) kon de vorming van aldehyde uit alkaansulfonaat worden aangetoond (tabel 4).

Tabel 4. Vorming van sulfiet en aldehyde uit alkaan-1-sulfonaten.

Enzymsubstraat	Gevormd zuur (μmol)	Gevormd bisulfiet (μmol)	% van de theoretische opbrengst
C_7SO_3Na	9,8	9,9	101
C_8SO_3Na	10,3	10,8	105
	Mededingend aldehyde	Geaccumuleerd aldehyde	
C_8SO_3Na	hexanal	octanal	
C_9SO_3Na	heptanal	octanal	

Vooral de waargenomen stoichiometrie bij de vorming van sulfiet en vetzuur ontstaan uit omgezet alkaansulfonaat, sluit een afbraak door zuurstofinvoeging tussen het zwavelatoom en het eerste koolstofatoom en de vorming van een sulfaatester volledig uit.

De waterstofdonor voor de 'mixed-function oxygenase' is weer NADH. De NADH-oxydatie is een maat voor de snelheid waarmee het alkaansulfonaat wordt gehydroxyleerd. In experimenten met celvrije bacterie-extracten werd deze NADH-oxydatie met de spectrofotometer bepaald. De snelheid waarmee dit enzym diverse alkaansulfonaten hydroxyleert is in tabel 5 opgegeven. De tabel toont duidelijk aan dat ook deze alkaansulfonaat-hydroxylase een weinig specifiek enzym is. Sterische hindering schijnt hier de reactiesnelheid minder te beïnvloeden dan bij de alkaanhydroxylase. Anderzijds verhindert de aanwezigheid van een hydroxy- of carboxylgroep op enige afstand van de gevoelige plaats in het molekuul de hydroxylering volkomen. Blijkbaar is voor de binding van deze substraten aan het enzym een interactie tussen hydrofobe plaatsen op het enzym en het hydrofobe deel van het molekuul noodzakelijk.

Anaërobe afbraak van detergenten

Al deze voorbeelden betroffen de *aërobe afbraak* van synthetische

Tabel 5. Oxydatiesnelheid van diverse sulfonaten door een celvrij extract van een Pseudomonas-*stam gegroeid op octaansulfonaat.*

Enzymsubstraat	Substraatconcentratie ($mmol \cdot l^{-1}$)	Specifieke activiteit $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$
1-Sulfonaat van		
n-octaan	3,9	44
6-hydroxyhexaan	0,33	0
3-hydroxynonaan	1,36	36
3-oxononaan	1,37	41
5-carboxypentaan	1,39	0
1-octeen	0,31	36
2-noneen	0,29	80
2-methylnonaan	1,37	40
3-methylnonaan	1,37	51
3-methylheptaan	0,31	67
2-Sulfonaat van		
n-dodecaan	0,25	38

verbindingen, detergenten, maar hoe is het met de *anaërobe afbraak* van deze verbindingen of komt die niet voor? Een van de belangrijkste groepen in de detergentmolekulen is de lange alkaanketen. Veel zou al gewonnen zijn als deze anaëroob zou kunnen worden afgebroken. Meer algemeen gesteld luidt de vraag: Kunnen alkanen anaëroob afgebroken worden? Hierbij wordt uiteraard aangenomen dat, ofschoon er geen molekulaire zuurstof aanwezig is, andere waterstofacceptoren, zoals NO_3^- en SO_4^{2-}, wel aanwezig zijn.

De reactie: alkaan $\rightarrow$ alkeen + H_2 mag dan microbiologisch volslagen onmogelijk zijn, maar indien de dehydrogenatiestap aan een waterstofacceptor zoals bijvoorbeeld nitraat gekoppeld zou zijn: alkaan + nitraat $\rightarrow$ alkeen + N_2, is er thermodynamisch gezien niet veel bezwaar. Aan het alkeen zou door een volgreactie water aangelegd kunnen worden, waarbij een alcohol zou ontstaan en deze zou door normale dehydrogenering verder geoxydeerd worden.

Voor de hierboven geschetste anaërobe afbraak is echter nog nooit een overtuigend bewijs geleverd. De mededelingen die van tijd tot tijd in de literatuur verschijnen, zijn meestal weinig overtuigend en worden later vaak door anderen tegengesproken (Izuka et al., 1968; Chao Min Liu & Johnson, 1971).

De moeilijkheden bij alle experimenten om bacteriën anaëroob op alkanen te laten groeien is, dat het alkaan-hydroxylerende enzym al bij zeer lage zuurstofspanning werkzaam is. En is het alkaan eenmaal gehydroxyleerd, dus omgezet in een alcohol, dan kan de verdere afbraak anaëroob verlopen met bijvoorbeeld nitraat als waterstofacceptor. Om dus anaërobe groei op alkanen te kunnen bewijzen, moet men zelfs sporen zuurstof verwijderen, wat niet altijd eenvoudig is!

Als de anaërobe oxydatie van de alkaanketen van alkylbenzeensulfonaat onwaarschijnlijk is, hoe is het dan met de benzeenring gesteld? Hoewel wordt aangenomen dat de opening van de benzeenring een aëroob proces is, waarbij door een oxygenase de ring geopend wordt, is de anaërobe afbraak van bepaalde aromatische verbindingen bekend.

Gedurende de anaërobe fotosynthetische groei van *Rhodopseudomonas palustris* kan benzoaat als koolstofbron worden gebruikt. Aanvankelijk werd verondersteld dat een fotochemisch gevormde oxydant voor de ringsplitsing zorgde. De latere onderzoekingen van Guyer & Hegeman (1969) en van Dutton & Evans (1969) echter, toonden een geheel ander mechanisme aan. Hierin wordt benzoëzuur door de bac-

terie gereduceerd tot cyclohex-1-een-1-carboxylaat; door wateraanlegging ontstaat hieruit 2-hydroxycyclohexaancarboxylaat, en hieruit vervolgens pimelinezuur en acetaat. Een groot deel van deze stappen, die in fig. 8 zijn weergegeven, zijn identiek met die welke bij de β-oxydatie van een vetzuur worden gevonden. Hoogstwaarschijnlijk zijn een deel van deze verbindingen dan ook niet de vrije zuren, maar CoA-derivaten (fig. 8).

Hier kan worden opgemerkt dat de werking van het hydrogenerend enzym en de hydratase het oorspronkelijk vreemde substraat zodanig veranderen, dat het beter in een bestaand afbraakschema past, in dit geval de β-oxydatie. Het lijkt verder waarschijnlijk dat eenzelfde mechanisme werkzaam is in de microbiologische methaanvorming uit benzoëzuur, hoewel dit nog niet definitief bevestigd is.

Een geheel ander mechanisme blijkt werkzaam te zijn in de afbraak van benzeenderivaten door nitraat-reducerende bacteriën. Zo werd door Taylor et al. (1970) een *Pseudomonas*-stam geïsoleerd (Ps. PN1) die niet alleen aëroob op *p*-hydroxybenzoëzuur en -benzoaat groeit, maar ook anaëroob in aanwezigheid van nitraat als waterstofacceptor. Dat hier toch een oxygenase haar werk kan doen door de aanwezigheid van sporen zuurstof, lijkt onwaarschijnlijk, omdat de enzymen die essentieel zijn voor de aërobe ringsplitsing en zijn gevonden bij de aëroob groeiende cellen, niet zijn gevonden bij de anaëroob gegroeide bacteriën.

Omdat deze bacterie ook niet groeit op cyclohexaancarbonzuur en evenmin dit zuur oxydeert met KNO_3, werd een reductieve afbraak-

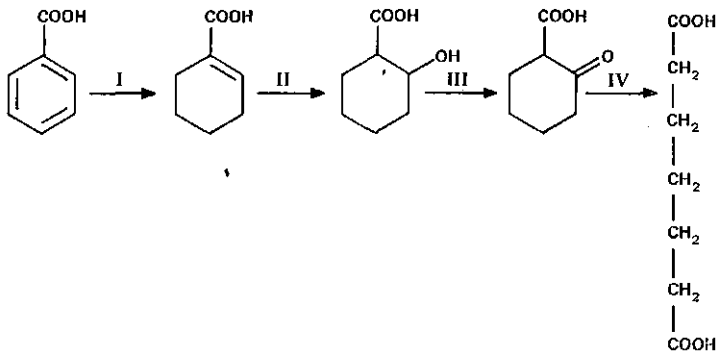


Fig. 8. Anaërobe afbraak van benzoëzuur.

weg zoals bij *Rhodopseudomonas palustris* afgewezen. De meeste *R. palustris*-stammen kunnen namelijk groeien op cyclohexaancarbonzuur, hoewel het geen echt tussenprodukt is van de benzoëzuurafbraak. Waarschijnlijker lijkt een mechanisme waarbij door wateraanlegging aan de dubbele bindingen een trihydroxycyclohexaancarbonzuur ontstaat en hieruit, door dehydrogenering dihydroxycyclohexaan-2-on-1-carbonzuur wordt gevormd. Door wateraanlegging en ringsplitsing ontstaat het dihydroxypimelinezuur. Deze laatste stappen zijn weer gelijk aan de β-oxydatie van de vetzuurafbraak.

Hoewel de anaërobe afbraak van benzoëzuur en benzoëzuurderivaten door nitraat-reducerende bacteriën bewezen schijnt, verdient het precieze afbraakmechanisme nog wel verdere aanvulling. In beide gevallen is de ringopening onderdeel van een mechanisme dat enige gelijkenis heeft met de β-oxydatie van vetzuren. Een dergelijk mechanisme kan niet voorkomen bij benzeen en cyclohexaan en dus lijkt de anaërobe afbraak van deze verbindingen hoogst onwaarschijnlijk.

Co-metabolisme

In de hiervoor besproken voorbeelden is steeds aangenomen, dat een verbinding alleen door een bacterie wordt afgebroken, als deze die verbinding als groeisubstraat kan gebruiken. Er zijn nu echter ook gevallen bekend dat een bacterie in staat is om een enkele of meerdere stappen in de afbraak van een molekuul te verrichten zonder daarbij energie en een koolstofbron voor zijn groei te verkrijgen. Een ander substraat moet daarvoor zorgen. Dit verschijnsel wordt co-metabolisme of co-oxydatie genoemd.

Een goed gedocumenteerd voorbeeld van co-oxydatie, waarbij bovendien het door co-oxydatie ontstane produkt door een andere bacterie als substraat gebruikt wordt en verder wordt afgebroken, is de oxydatie van cyclohexaan. In tegenstelling tot benzeen en hexaan is cyclohexaan een stof waarvoor het moeilijk, zo niet onmogelijk, is een bacterie te isoleren die er op kan groeien. Van Ravenswaay Claasen en Van der Linden hadden echter in hun oxydatie-experimenten al aangetoond dat cyclohexaan door extracten van de *Pseudomonas*-stam Ps. 473 geoxydeerd kan worden tot cyclohexanol. In experimenten met heptaan en cyclohexaan werd ook in vivo cyclohexanol gevormd door de stam Ps.T. Deze *Pseudomonas*-stam groeit evenals Ps. 473 uitstekend op heptaan, maar heeft bovendien een actiever

hydroxyleringssysteem en is daarom in deze experimenten verkozen boven Ps. 473.

Echter noch Ps. 473 noch Ps.T. kan op cyclohexaan *groeien*; blijkbaar kunnen ze het gevormde cyclohexanol niet als koolstofbron voor hun groei gebruiken. Het gelukte echter wel een *Pseudomonas*-stam te isoleren die wél op cyclohexanol maar níet op cyclohexaan of heptaan kan groeien (Ps.C.). Door nu een mengsel van Ps.T. en Ps.C. met heptaan en cyclohexaan tezamen te incuberen, konden De Klerk & Van der Linden (1974) het toegevoegde cyclohexaan volledig oxyderen. Dit blijkt uit hun experiment met ^{14}C-gemerkt cyclohexaan, waarin bij het mengsel van Ps.T. en Ps.C. niet alleen radioactief CO_2 ontstaat, maar ook de bacteriecellen radioactief worden (tabel 6).

Hoe belangrijk de co-oxydatie voor het verwijderen van ongewenste verbindingen in oppervlaktewater of in de afvalwaterzuivering is, valt moeilijk te bepalen. In principe levert de co-oxydatie van deze verbindingen geen enkel materieel voordeel op voor de betrokken bacteriën, zodat hun aantal niet of nauwelijks zal toenemen. Echter in de gevallen, zoals bij de co-oxydatie van cyclohexaan, waarbij het 'andere substraat', in dit geval heptaan, selectief de bacteriën die de co-oxydatie uitvoeren ophoopt (en veelal ook de betrokken enzymen induceert), zal hun aantal wél toenemen en zal de co-oxydatie dus sneller verlopen. In de traagverlopende oxydatie van 2,3,6-trichlorobenzoëzuur door rivierwater neemt de hoeveelheid bacteriën tijdens de oxydatie nauwelijks toe. Dit duidt op een energetisch niet zo erg voordelig oxydatieproces. Toevoeging van benzoëzuur versnelt de oxydatie echter aanzienlijk. Ook hier is het benzoëzuur groeisubstraat, maar tevens is het de verbinding die in de bacterie de enzymactiviteit induceert voor een succesvolle co-oxydatie. Hoewel het zeker is dat in

Tabel 6. Co-oxydatie van ^{14}C-cyclohexaan in een systeem met twee Pseudomonas-*stammen en in aanwezigheid van heptaan. dpm = desintegraties per minuut.*

Bacterie-stammen	Gevormd $^{14}CO_2$ (dpm)	Gevormd ^{14}C-cyclohexanol (dpm)	^{14}C in celmateriaal (dpm)
Ps.T.	86	10496	118
Ps.T. + Ps.C.	7580	100	6039
Ps.C.	103	100	41

deze gevallen door co-oxydatie de afbraak bevorderd wordt en zeker getracht moet worden in redelijkheid de juiste omstandigheden te scheppen die de afbraak bevorderen, kan het voortdurend toevoegen van extra 'pep' om de oxydatie van ongewenste verbindingen te versnellen tot misbruik leiden en een bron van verontreiniging op zichzelf worden.

Slotbeschouwing

In het voorgaande is getracht een inzicht te geven, hoe de bacteriën door op zich zelf 'kleine' veranderingen in het molekuul aan te brengen dit meer aanvaardbaar maken voor de normale stofwisselingssystemen. Omgekeerd kunnen wij door kleine veranderingen, bijvoorbeeld invoering van een substituent, een oorspronkelijk microbiologisch 'zachte' verbinding 'hard' maken. Ervaring heeft ons geleerd dat er wel enige regels zijn die men in acht kan nemen om zachte verbindingen te maken. Zo moeten we voorkeur geven aan rechte alkaanketens. Zo er al vertakkingen zijn, dan liever methylgroepen dan ethyl- of propylgroepen en deze laatste in ieder geval niet op plaatsen naast elkaar. Quaternaire C-atomen moeten worden vermeden, enz. Dat een alcoholgroep beter afgebroken zal worden dan een ketongroep is overduidelijk, maar of een ketongroep nu harder is dan een ethergroep is wel discutabel. Bij benzeen bevordert een alkaangroep, mits recht, de afbraak, maar meerdere methylgroepen remmen de afbraak. Chloor en nitro remmen, maar hydroxyl bevordert de afbraak.

Een voorspelling van de afbreekbaarheid louter uit structuurgegevens is natuurlijk te onbetrouwbaar om zekerheid te geven over de afbreekbaarheid. De overheid zal steeds een experimenteel bewijs verlangen, indien men over de toelaatbaarheid wil oordelen.

Aan de talrijke voorschriften opgesteld om bijvoorbeeld de afbreekbaarheid van detergenten te bepalen, zou alleen al een congres gewijd kunnen worden. In de E.E.G.-landen is voor de bepaling van de afbraak van anionische detergenten het Husmann-apparaat bindend voorgeschreven. In Engeland wordt op het ogenblik voor het bestuderen van de afbraak van diverse niet-ionogene detergenten met veel succes een poreuze plastic pot gebruikt. Zie Hitz et al. (1975) en The Department of the Environment (1974).

In elk geval vormen snelheid en volledigheid van de afbraak een voortdurende zorg van fabrikant en overheid. In de toekomst zal zo,

door een groeiend besef van de verantwoordelijkheid van alle betrokken partijen, in vele, zo niet alle, gevallen ongewenste vervuiling kunnen worden voorkomen.

Hoewel het misschien mogelijk is door inductie, selectie en mutatie bacteriën te verkrijgen die de nu nog hardnekkige verbindingen zouden kunnen afbreken (Painter, 1974, blz. 157), is het beter hierop niet te anticiperen. We kunnen van onze kleine vrienden niet steeds nieuwe wonderen verwachten, tenslotte hoeven ze niet altijd op hun tenen, of beter gezegd, op hun flagellen te lopen.

Residenten en passanten

F. WENSINCK

Inleiding

De term residente (blijvende) flora is door Price (1938), die baanbrekend onderzoek verrichtte over de huidflora van de mens, ingevoerd. Hij wordt vaak gebruikt om flora's aan te geven met een betrekkelijk constante samenstelling die karakteristiek zijn voor een bepaald milieu, een bepaalde 'ecologische nis'. In een residente flora is een beperkt, soms zelfs een zeer klein aantal soorten vertegenwoordigd en de aantallen van elke groep of soort van micro-organismen liggen vrij vast. Zo bedraagt de verhouding tussen de totale aantallen strikt anaërobe en facultatief anaërobe bacteriën in de menselijke darm 500–1000 op 1 en die tussen aantallen bacteriën en protozoën in de herkauwersmaag ongeveer 50 000 op 1.

Residente flora's worden vaak normale flora's genoemd, doch deze term is niet op zijn plaats. De residente darmflora van de ene mens kan blijvend verschillen van die van de andere, zonder dat wij de ene flora normaal en de andere abnormaal mogen noemen. Abnormaal is een residente flora pas, wanneer haar samenstelling buiten de, meestal wijde grenzen van het 'normale' variatiegebied valt.

De numeriek belangrijkste residenten worden vaak, in het Engels, 'major' en de minder belangrijke 'minor residents' genoemd. Een voorbeeld: soorten die tot de geslachten *Bacteroides, Bifidobacterium* en *Eubacterium* behoren zijn major residents in de menselijke darm, *Escherichia coli* is een minor resident; de eerstgenoemde komen voor in aantallen van ongeveer 10^{10} per gram darminhoud, *E. coli* is met 10^6 tot 10^7 numeriek van geen betekenis.

Tussen de residenten vindt men altijd, om met Price te spreken, 'transients', ook wel passanten genoemd, die in kleine aantallen voorkomen en zich meestal niet blijvend nestelen. De aanwezigheid van passanten is begrijpelijk wanneer men weet dat het besmettingsniveau

van onze omgeving (grond, water, lucht en sommige voedingsmiddelen) zeer hoog kan zijn en dat een voortdurend, grootscheeps transport van micro-organismen plaatsvindt. Begrijpelijk is, dat niet altijd een scherp onderscheid tussen minor residents en passanten kan worden gemaakt. Beschouwingen over residente flora's waarbij men zich afvraagt of milieu en eigenschappen van de residenten de samenstelling van de flora verklaren, terwijl men eveneens de invloed van de flora op het milieu nagaat, zijn ecologische beschouwingen. Ecologie wordt in de Encyclopaedia Britannica (1970) omschreven als de leer van en de bestudering van betrekkingen tussen populaties van organismen en hun omgeving. Een wijd begrip dus, dat gevaar loopt te verwateren. Ik meen dat de volgende beschouwingen over de residente huid- en darmflora van de mens met recht ecologisch mogen worden genoemd.

Onderzoekers die ecologische problemen bestuderen worden door Brock (1966) in twee groepen verdeeld: zij die zich richten op de vindplaats (de plaats waar het organisme zich vermenigvuldigt in de vrije natuur) en zij die zich richten op het organisme zelf. Degenen die de residente flora's van de mens onderzoeken hebben meestal meer belangstelling voor de micro-organismen dan voor hun milieu. Dit is te begrijpen, want in de medische microbiologie staat het zoeken naar en onderzoeken van ziekteverwekkers, die ook in residente flora's kunnen voorkomen, op de voorgrond. Bovendien is een analyse van de milieu's waarin zich menselijke residente flora's ophouden, verre van gemakkelijk – denk bijvoorbeeld aan de darm. Ik zal trachten aan het milieu zoveel aandacht te besteden, dat een evenwicht wordt bereikt tussen gerichtheid op milieu en op micro-organismen.

Selecterende milieukenmerken

Elk milieu selecteert uit het voortdurende aanbod aan soorten die micro-organismen die zich kunnen nestelen en vermenigvuldigen, waarbij een hiërarchische orde onder de residenten ontstaat, die gehandhaafd blijft. Deze selectie vindt plaats omdat fysische en chemische grootheden in een nis een bepaalde en vrij constante waarde hebben. In tabel 1 zijn deze grootheden aangegeven. Tevens is vermeld welke groepen van micro-organismen worden begunstigd wanneer een grootheid een bepaalde waarde heeft. De beschikbare voedingsstoffen vormen uiteraard een zeer complexe milieufactor. Wij verstaan daaronder niet alleen de nutriënten die dienen voor de ener-

gielevering en de opbouw van microbiële celbestanddelen, maar ook die stoffen die een min of meer selectieve bevordering of remming van de groei kunnen veroorzaken, zoals galzure zouten en vetzuren.

De milieukenmerken in tabel 1 kunnen ongedwongen in twee groepen worden verdeeld: degene die niet en degene die duidelijk door de residente flora worden beïnvloed. Temperatuur, zout- en vochtgehalte behoren tot de eerste groep, zuurstofspanning en zuurgraad tot de tweede. Ook de beschikbare nutriënten zijn natuurlijk sterk afhankelijk van de residente flora. Zo worden in de herkauwersmaag kooldioxyde en waterstof vrijwel continu gevormd als eindprodukten van de cellulosefermentatie. Mede door de lage redoxpotentiaal is het milieu zeer geschikt voor de nesteling van methaanbacteriën, die kooldioxyde tot methaan reduceren. De eindprodukten van de stofwisseling van één groep residenten dienen hier als substraat voor een andere groep, de methaanvormers.

Vaak is duidelijk dat de samenstelling van een residente flora door een combinatie van milieukenmerken wordt bepaald. Dergelijke combinaties worden bij sommige industriële processen bewust gekozen. Een voorbeeld hiervan is de bereiding van zuurkool. Door in repen gesneden kool opeen te stapelen ontstaat, daar zuurstof door de plantencellen en ook door bacteriën wordt verbruikt, vrij snel een anaëroob milieu. De toevoeging van 2,5% zout onderdrukt de vermenigvuldiging van ongewenste concurrenten van de facultatief anaërobe, zouttolerante melkzuurvormers. Hun vermenigvuldiging leidt tot verlaging van de pH (tot ongeveer 3,5). In dit milieu bepaalt dus een

Tabel 1. Milieukenmerken die een selecterende invloed uitoefenen.

		Begunstigde micro-organismen
Temperatuur	< 25°C	psychrofielen
	25–45°C	mesofielen
	45–80°C	thermofielen
Zuurgraad	pH < 6	zuurtoleranten
Zuurstofspanning	hoog	aëroben
	laag	anaëroben
Zoutgehalte	> 2%	zouttoleranten en halofielen
Belichtingsgraad	hoog	foto-autotrofen

Vochtgehalte: beïnvloedt populatiedichtheid
Nutriënten: selecteren op tal van wijzen

combinatie van drie selecterende factoren, namelijk lage zuurstofspanning, hoog zoutgehalte en hoge zuurgraad, de samenstelling van de flora.

Residente flora's van de mens

Deze flora's bestaan uiteraard uit mesofiele heterotrofen. De mens is immers warmbloedig en niet zo verlicht dat autotrofen zich op hem kunnen nestelen. Wat op of in ons groeit is daarom aangewezen op organische koolstof- en energiebronnen en daarom heterotroof. Residente flora's vindt men op de huid en op de slijmvliezen van neusgaten, mond- en keelholte, darmkanaal en vagina. De flora van het neusslijmvlies is, met stafylokokken en difteroïden, wel de eenvoudigste, die van mondholte en darmkanaal bestaat uit zeer veel soorten. Wij beperken ons hier tot de huid- en de darmflora. De milieu's huid en darm contrasteren zeer sterk en in beide overheersen enkele selecterende milieukenmerken. De flora's gelijken – dat zij reeds nu vermeld – in het geheel niet op elkaar. Voor de residente flora's van de mens zie men Skinner & Carr (1974).

De residente huidflora

Milieukenmerken De huid van de volwassen mens heeft een oppervlak van ongeveer 2 m^2 en een groot gedeelte van dit oppervlak is, in microbiologische zin, een onherbergzaam gebied. De temperatuur varieert van 32 tot 34 °C, de pH van 4 tot 6 en de zoutconcentratie kan oplopen tot 2%. Onder deze condities is bacteriegroei natuurlijk zeer goed mogelijk, maar de combinatie relatief lage temperatuur, relatief hoge zuurgraad en hoog zoutgehalte schept een ongunstig milieu voor veeleisende residenten uit mond-, keel- en darmflora, die in grote aantallen op de huid terecht komen. Begrijpelijk is, dat zij zich hier niet nestelen. De zuurstofspanning is overal hoog, behalve in nissen zoals haarfollikels en talgklieren; de enige anaërobe huidresidenten, de propionzuurbacteriën, worden bij uitstek in deze nissen gevonden.

De substraten waarvan bacteriën op de huid kunnen leven zijn afkomstig van secreties van zweetklieren, talgklieren en van verhoornende epitheelcellen. Gezien de verschillen in plaatselijke dichtheid en activiteit van genoemde klieren is het niet verwonderlijk dat de

samenstelling van het substraat wisselt. Concentraties van nutriënten in de oppervlakkige huidfilm zijn uiteraard sterk afhankelijk van de zweetproduktie en de verdampingssnelheid. In tabel 2 zijn enkele gegevens verzameld over de samenstelling van zweet en talg, en zijn de belangrijkste nutriënten in de oppervlaktefilm aangegeven. Deze waarden hebben, dat moet met nadruk worden vermeld, niet meer dan een oriënterende betekenis. Probeert men zich bij de gegevens van tabel 2 een bacteriologische voedingsbodem voor te stellen, dan kan dat wel, maar het wordt een wat onalledaagse voedingsbodem. Vooral het hoge lipoïdgehalte is ongewoon en dat heeft voor de samenstelling van de residente huidflora een niet te onderschatten betekenis. Huidresidenten vormen vaak lipasen, gebruiken vetzuren als energiebron en sommige zijn voor hun groei zelfs van vetzuren afhankelijk. Anderzijds remmen vetzuren de vermenigvuldiging van streptokokken en schimmels zodat hun invloed van tweeërlei aard is, groeibevorderend en groeiremmend. Vrije vetzuren worden in de talgklier zelf slechts in lage concentratie gevonden; men is het erover eens dat hun vorming uit talg-triglyceriden hoofdzakelijk door bacteriële lipasen geschiedt.

Wanneer wij aan de vermelde gegevens toevoegen dat het microklimaat op de huid gekenmerkt is door een laag vochtgehalte, dan is duidelijk dat wij met een 'schrale' ecologische nis te maken hebben.

Tabel 2. Bacteriële nutriënten op de huid. De waarden verschillen plaatselijk en fluctueren sterk, afhankelijk van uit- en inwendige omstandigheden. Gegevens ontleend aan Champion et al. (1970), Herrmann et al. (1973), Marples (1965) en Stüttgen (1965).

Samenstelling zweet (mg/100 g zweet)		Beschikbare nutriënten (gew. % van de huidfilm, 0,5 μm dik)		Globale samenstelling van lipoïde op de huid (%)	
Lactaat	200–300	lactaat	2,5	triglyceriden	30
Glucose	3	glucose	–	vetzuren	30
Ureum	20–60	ureum	1	was, sterolesters en squaleen	25
Amino-zuren	50	amino-zuren	10		
P	1–10	P	0,005		
NaCl	30–600	NaCl	2		
		talg 0,2 mg/cm²			
		pH 4,5–6,5 (plaatselijk, b.v. oksel, wat hoger)			

Hij is ook spaarzaam bevolkt: hier en daar een nederzetting van stafylokokken en difteroïden en in de follikels propionzuurbacteriën. Wil men een getal: 10^2 tot 10^3 bacteriën (of groepjes daarvan) per cm^2.

Oksel, het behaarde deel van het hoofd, perineum, binnenzijde van het bovenbeen en ruimten tussen de tenen zijn dichter bevolkt: 10^6 tot 10^7 bacteriën per cm^2. Twee vragen zijn hier van belang: (a) waardoor wordt de hogere bevolkingsdichtheid veroorzaakt en (b) zijn alleen de aantallen groter of is ook de samenstelling van de flora anders. Als representatief voorbeeld van een dichtbevolkt gebied nemen wij de oksel. Vochtgehalte, temperatuur en pH zijn daar iets hoger dan elders en dat verklaart zeker de grotere populatiedichtheid. In de okselflora overheersen, als elders, stafylokokken en difteroïden maar gram-negatieve staafjes worden vaak als minor residents gevonden. Het feit dat zij op de schrale huidgebieden slechts als passant worden gevonden berust grotendeels op hun geringe weerstand tegen uitdroging hetgeen experimenteel overtuigend is aangetoond.

De samenstelling van de residente huidflora kan dus zonder moeite worden verklaard uit de omstandigheden die in dit milieu heersen.

Invloed op de gastheer Vragen wij ons, zoals in een ecologische beschouwing behoort, af welke invloed de huidflora op de gastheer heeft, dan is het antwoord: op het eerste gezicht een geringe. De (oksel)flora veroorzaakt, door inwerking op zweetkliersecreties, de 'mensengeuf'; op welke wijze, is niet geheel duidelijk. Deodoranten leiden tot verschuivingen in de flora door antibacteriële bestanddelen zoals hexachlorofeen en bevatten eveneens remmers van de transpiratie. Geurvorming wordt dus op tweeërlei wijze onderdrukt. Welke prijs men daarvoor betaalt heeft Lucas Reijnders (1975) uitgerekend; welke gevaren floraverstoringen, bijvoorbeeld door systematische toediening van antibiotica, met zich meebrengen is door Taplin (1972) en Amonette & Rosenberg (1973) uiteengezet.

Algemeen geformuleerd: onze residente huidflora bewaakt het 2 m^2 grote territorium tegen invasie door passanten, die lang niet altijd ongevaarlijk zijn. Uitgebreide gegevens over de huid en zijn flora vindt men bij Kligman (1965), Marples (1965, 1974) en Woodruffe & Shaw (1974).

De residente darmflora (zie Drasar & Hill, 1974)

Milieukenmerken Micro-organismen worden overal in het darmkanaal aangetroffen maar bij residente flora denkt men bij uitstek aan die van de dikke darm; elders is de flora numeriek van weinig betekenis. Het totale aantal bacteriën in de dikke darm bedraagt ruim 10^{11} per gram darminhoud. In de dunne darm vindt men er maximaal 10^3 per ml inhoud behalve in het laatste gedeelte, waar de aantallen van 10^4 tot 10^8 variëren. Twee sprongen dus, van het middelste naar het laatste stuk van het ileum (de kronkeldarm) en van daar naar het begin van de dikke darm.

De factoren die bacteriegroei op de huid beperken, zijn in de darm niet selecterend. Het vochtgehalte is hoog, de zoutconcentratie is lager dan 1% NaCl en de pH ligt overal in een niet-selecterend gebied, 6,5 tot ruim 7, behalve in de maag. Bij gezonden varieert de pH van maagsap van 1 tot 4. Nu wordt de maag dagelijks zwaar met microorganismen besmet, zowel door speeksel (ongeveer 10^9 levende bacteriën per ml) als door voedsel. Een verblijftijd van 1 tot 2 uur is voldoende om het merendeel van in de maag terecht komende bacteriën te doden. Uit bepalingen van aantallen bacteriën en pH van maagsap is gebleken dat de aantallen groter zijn naarmate de pH hoger is. Is de zoutzuursecretie gestoord (pH 5 en hoger), dan worden bacteriën in vrijwel alle monsters gevonden in aantallen die kunnen oplopen tot 10^7/ml. De maag mag het aantal bacteriën dat de dunne darm bereikt sterk verminderen, een beslissende invloed op de samenstelling van de residente darmflora heeft hij niet. Vertegenwoordigers van alle soorten die zich in de dikke darm kunnen nestelen, passeren vroeg of laat deze barrière.

De samenstelling van de darmflora wordt in de eerste plaats bepaald door de lage redoxpotentiaal van de darminhoud (–200 mV) en de lage zuurstofspanning, twee grootheden die met elkaar samenhangen. Een van de verklaringen voor de lage zuurstofspanning is dat facultatief anaëroben, minor residents, zuurstof verbruiken. In het darmkanaal van kiemvrije dieren is de redoxpotentiaal vrijwel overal gelijk, ongeveer +50 mV, en na besmetting en nesteling van een residente darmflora daalt deze potentiaal in enkele dagen. We zien hier dus een duidelijke invloed van de flora op het milieu.

De samenstelling van het gas in de dikke darm verschilt sterk van die van lucht. De meest opvallende verschillen zijn het lage zuurstof-

gehalte (minder dan 1%) in het darmgas, waarin voorts wisselende hoeveelheden kooldioxyde, waterstof en methaan worden aangetroffen. Kooldioxyde is grotendeels, en waterstof en methaan zijn uitsluitend eindprodukten van fermentaties van de darmflora. Hoe actief de stofwisseling is blijkt wel wanneer, met een sonde, een fermenteerbaar substraat in het laatste gedeelte van de dunne darm wordt gebracht: binnen enkele minuten stijgt de waterstofproduktie, hetgeen door analyse van de uitademingslucht kan worden vastgesteld.

In tegenstelling tot waterstof wordt methaan niet door elke residente darmflora gevormd. Ongeveer 30% van de daarop onderzochte bevolkingsgroepen is 'methaanproducent'. Zijn beide ouders methaanproducent dan zijn de kinderen dat eveneens. Het feit dat methaanbacteriën zich bij sommigen wel en bij anderen niet nestelen, illustreert duidelijk dat de samenstelling van onze darmflora mede door subtiele factoren wordt beïnvloed. Zie voor de samenstelling van het darmgas Leodolter (1971).

Van de tot dusver besproken milieukenmerken van de darm is alleen de lage redoxpotentiaal een duidelijk selecterende factor. Hiermee is verklaard dat onze darmflora uit heterotrofe, mesofiele anaëroben bestaat waaraan niet de eis wordt gesteld dat zij zuur- of zouttolerant behoeven te zijn, noch resistent tegen uitdroging.

Wij hebben echter nog niet verklaard waarom de residente darmflora in hoofdzaak bestaat uit soorten die tot de geslachten *Bacteroides*, *Bifidobacterium* en *Eubacterium* behoren, terwijl soorten van andere anaërobe geslachten zoals *Clostridium*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* en *Propionibacterium* hoogstens de status van 'minor resident' bereiken. Een antwoord op deze vraag kan wellicht worden gegeven, wanneer de *substraten* waarvan onze darmflora leeft bij onze beschouwing worden betrokken.

De residente darmflora leeft van complexe substraten, die gedeeltelijk voedselresiduen zijn en gedeeltelijk als 'endogene afval' mogen worden beschouwd. De mens is voor de spijsvertering geheel onafhankelijk van zijn darmflora. Enzymatische splitsing van polymeren uit het voedsel en resorptie van kleine bouwstenen vinden in de dunne darm plaats. Alleen niet-hydrolyseerbare voedselbestanddelen bereiken de dikke darm en het merendeel daarvan bestaat uit plantaardige oligo- en polysacchariden. Een aantal van deze residuen zoals pectinen en oligosacchariden wordt door de darmflora gefermenteerd

Met 'endogene' afval wordt materiaal bedoeld dat uit bestanddelen

van speeksel en maagsap, afscheidingsprodukten van de dunne darm en afgestoten epitheelcellen bestaat. De hoeveelheid daarvan is groot. Geschat wordt dat per dag 100–200 gram eiwit (enzymen, celeiwit, glycoproteïne), opgelost of gesuspendeerd in ongeveer 8 liter water (speeksel, maagsap, vocht in dunne darm), in de dunne darm terechtkomt; een groot gedeelte van dit materiaal wordt gehydrolyseerd en, met water, teruggeresorbeerd. Ongeveer $^1/_2$ l vloeistof bereikt de dikke darm (zie voor intern eiwitverlies Da Costa (1971) en Da Costa et al. (1971)). Men kan berekenen dat slechts een klein gedeelte van de endogene afval voldoende is om de dagelijkse bacterieproduktie in de dikke darm te garanderen. Deze produktie bedraagt ongeveer 15 gram (150 gram feces met 10^{11} bacteriën per gram; gewicht van een bacterie 10^{-12} gram), waarvan 1,5 gram koolstof. De 100–200 gram endogene afval bevat 50–100 gram koolstof. Nu moet niet alleen met koolstof die in bacteriecellen wordt ingebouwd, maar ook met koolstofverbruik voor energielevering rekening worden gehouden. Rekent men dat per gram in bacteriën ingebouwde koolstof 5 maal zoveel koolstof voor energielevering wordt verbruikt dan zou voor de produktie van 15 gram bacteriën $5 \times 1{,}5$ gram koolstof nodig zijn, dus ongeveer 10% van de in endogene afval aanwezige koolstof.

In aanmerking nemende dat voedselresiduen eveneens bijdragen tot het koolstofaanbod mogen wij concluderen dat slechts weinig materiaal de dikke darm hoeft te bereiken om een dagproduktie van 15 gram bacteriën mogelijk te maken. Deze produktie wordt, bij gezonden, kleiner wanneer een chemisch gedefinieerd dieet wordt gegeven en dit is begrijpelijk omdat het aanbod van voedselresiduen dan vrijwel nul wordt, terwijl men ook mag aannemen dat de vorming van endogene afval vermindert. Bij patiënten met darmziekten is dit effect minder duidelijk maar ook dit is begrijpelijk want aard en hoeveelheid van de endogene afval zijn anders dan bij gezonden.

Onze darmflora heeft voldoende substraat om van te leven, maar de complexe aard van deze substraten geeft ons nog niet een verklaring voor de eerder genoemde hiërarchie onder de darmresidenten waarin *Bacteroides*, *Bifidobacterium* en *Eubacterium* aan de top staan. Deze hiërarchie is zeer hecht: verschillen in dieet hebben daarop nauwelijks invloed, behalve wanneer zij extreem zijn. Selectieve groeibevordering of remming in de darm wordt toegeschreven aan galzure zouten, vluchtige vetzuren (eindprodukten van bacteriestofwisseling) en bacteriocinen (door bacteriën gevormde stoffen met een

zeer speficieke bacterie-dodende werking). Conclusie: de hiërarchie wordt zo subtiel geregeld dat ons nog ontgaat hoe dat precies gebeurt.

Betekenis voor de gastheer Onze darmflora heeft, in vergelijking met die van bijvoorbeeld herkauwers, niet meer dan een rudimentaire betekenis. Voor de spijsvertering heeft zij geen belang en voor onze energievoorziening is het niet van belang dat de darmflora uit residuen vluchtige vetzuren vormt. Onder normale omstandigheden is het evenmin van voordeel dat dagelijks ongeveer de helft van onze ureumvoorraad in de dikke darm, door bacterieel urease, in ammonia en kooldioxyde wordt gesplitst waarna de ammonia naar de lever wordt gevoerd. Wij scheiden immers al 10–15 gram ureum per dag met de urine uit. Een pluspunt is, dat de darmflora ons van vitamine K voorziet.

Net als voor de huidflora geldt voor de darmflora dat haar betekenis het duidelijkste naar voren komt wanneer wij haar verstoren. Deze verstoring maakt het mogelijk dat minor residents en passanten in aantal toenemen. Dit kan gevaarlijk zijn, want colibacteriën, *Pseudomonas*-soorten, stafylokokken en gisten zijn geconditioneerd pathogeen, dat wil zeggen: zij kunnen ziekten veroorzaken wanneer de weerstand van de gastheer op enigerlei wijze is verminderd. De meest extreme verstoring is wel dat residente flora's in het geheel niet aanwezig zijn zoals bij het kiemvrije dier. De blinde darm is sterk vergroot, de wand daarvan is dun, de beweeglijkheid van de darm is verminderd en het lymfatische apparaat is slecht ontwikkeld. Worden kiemvrije dieren besmet, dan is hun weerstand minder dan die van een conventioneel dier. Commensalen groeien uit tot veel grotere aantallen dan in het conventionele dier en pathogenen geven al in veel kleinere aantallen infecties (zie voor kiemvrije dieren en de gevolgen van besmetting Heneghan (1973)).

Algemeen geformuleerd: onze darmflora beschermt ons tegen invasie door 'minor residents' en passanten, en is er, mede met de andere residente flora's, voor verantwoordelijk dat wij conventioneel zijn. Conventioneel zijn is, in dit geval, van voordeel.

Aan het grensvlak mens-microbe

K. C. WINKLER

De huid

Ons huidoppervlak bestaat uit een laag verhoornde cellen, doorbroken door haarzakjes, talgklieren, zweetklieren en dergelijke. De verhoornde cellen schilferen voortdurend af (fig. 1).

Op deze koude, droge hoogvlakte, door zweet verzilt en verzuurd, kunnen alleen bacteriën leven die uitdroging en afkoeling goed weer-

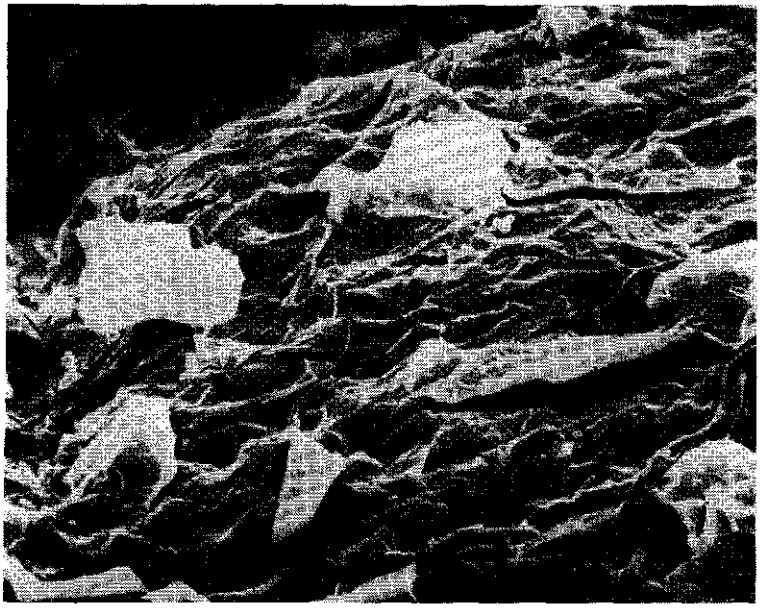


Fig. 1. Scanning-elektronenmicroscoopfoto van huidoppervlak. Uit: Clark, 1974.

staan, die een hoge inwendige osmotische druk hebben en een dikke celwand, zoals bijvoorbeeld onze vaste huidbewoner: *Staphylococcus epidermidis*. Maar zelfs deze stoere klant woont vooral in de vette oase van de talgklier. De spaarzame bevolking ($10^3/cm^2$) van de huid van romp en ledematen steekt schril af tegen de dichte heterogene populaties van vochtiger en vruchtbaarder gebieden ($10^6/cm^2$) zoals het tropische regenwoud onder de oksels en het peri-anale moeras. Ook hier selecteert het milieu zijn bewoners en veranderen de bewoners het milieu.

De slijmvliezen

Op onze vochtige slijmvliezen is het bevolkingsprobleem nog groter. Als ik mijn vriendinnetje vraag mij een zoen te geven . . . op een petri-

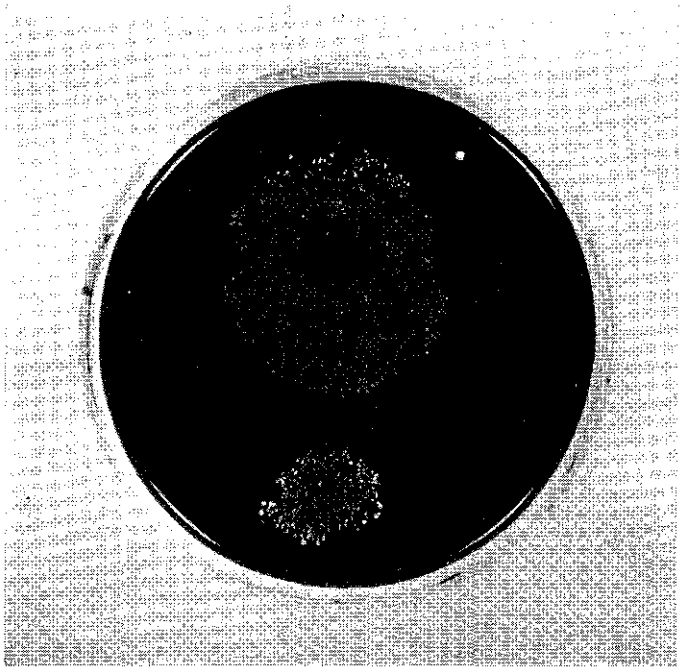


Fig. 2. Afdruk van lippen en kin op petrischaal met bloedagar. Men ziet de talrijke kolonies waartoe de overgeplante bacteriën zijn uitgegroeid.

schaal met bloedagar (fig. 2), dan kan men, na bebroeding van de plaat, de talrijke kolonies van de bacteriën van de lieve lipjes en van het zoete kinnetje duidelijk zien.

Een bacterie leeft in een milieu als de condities van temperatuur en vochtigheid gunstig zijn en hij er voedsel kan vinden. Soms heeft hij een houvast nodig om zich te handhaven, een pleisterplaats om te blijven plakken.

De mond

Reeds Van Leeuwenhoek wist, dat het tandbeslag (zie figuur bij Williams, 1898; Frank & Brendel, 1966) vooral uit bacteriën bestaat (10^8–10^9 per mg). Wordt de tand goed schoongemaakt, dan vestigen zij zich er weer snel. Na een half uur vindt men al enkele kokken (fig. 3). Kweekt men een van deze bacteriën (*Streptococcus mutans*) in bouillon met rietsuiker, dan maakt de bacterie uit de suiker een kleverige gom (dextraan) en blijft daardoor stevig aan de glaswand kleven (zie figuur bij De Stoppelaar et al., 1971). Een mutant die geen dextraan maakt, blijft niet kleven.

Kiemvrije hamsters hebben gezonde tanden, zelfs als zij een dieet met rietsuiker krijgen. Besmet men zulke dieren met de dextraanvormende *Streptococcus mutans*, dan kleeft de bacterie aan de kiezen vast en vormt rijkelijk zuur, waardoor de tand wordt aangetast (zie figuur bij Keyes, 1960). Een dextraan-negatieve mutant van dezelfde bacterie maakt wel zuur, maar omdat hij niet vastkleeft, blijven de kiezen gezond (De Stoppelaar et al., 1971).

De streptokok die zich op het tandoppervlak had vastgehecht (fig. 3) vermeerdert zich snel. Het is een plakker met een eigen stamkroeg, die zelfs in de kroeg groeit. Bovendien is het hier 'zwaan, kleef aan', omdat ook vele andere bacteriën in de kleverige dextraanmassa blijven plakken.

Van het standpunt van bacteriën hebben alle mensen een grote mond. In elke mond leven er een paar honderd miljard. Velen hebben er een vaste plaats. Sommigen wonen op de tong, anderen op het wangslijmvlies, op de amandelen of op het tandvlees. Voor deze lokalisatie is geen lijmpot nodig. Haalt men met een houten spatel wat cellen van het wangslijmvlies en wast men deze schoon, dan zien die epitheelcellen er uit als in fig. 4. Brengt men de cellen samen met een verdunde suspensie van *Streptococcus salivarius*, dan blijven deze

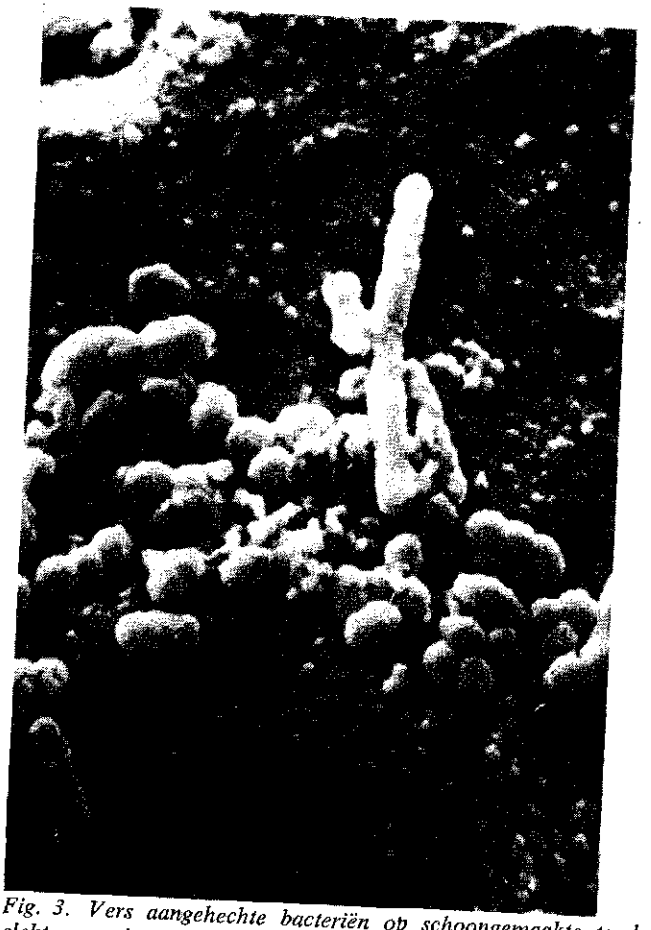


Fig. 3. Vers aangehechte bacteriën op schoongemaakte tand (scanning-elektronenmicroscoopfoto).

bacteriën aan de cellen vastzitten (fig. 4). De meeste andere streptokokken doen dit niet (Gibbons & Van Houte, 1971). *Sommige bacteriën adsorberen blijkbaar aan sommige gastheercellen.*

Voor virussen wisten we dit allang. Het influenzavirus adsorbeert aan de cellen van het slijmvlies van de luchtwegen en zelfs aan rode bloedcellen. Voegt men rode bloedcellen van een kip bij een suspensie van influenzavirus, dan plakken de virusdeeltjes de cellen aan elkaar, zodat de celklompjes uitzakken (hemagglutinatie).

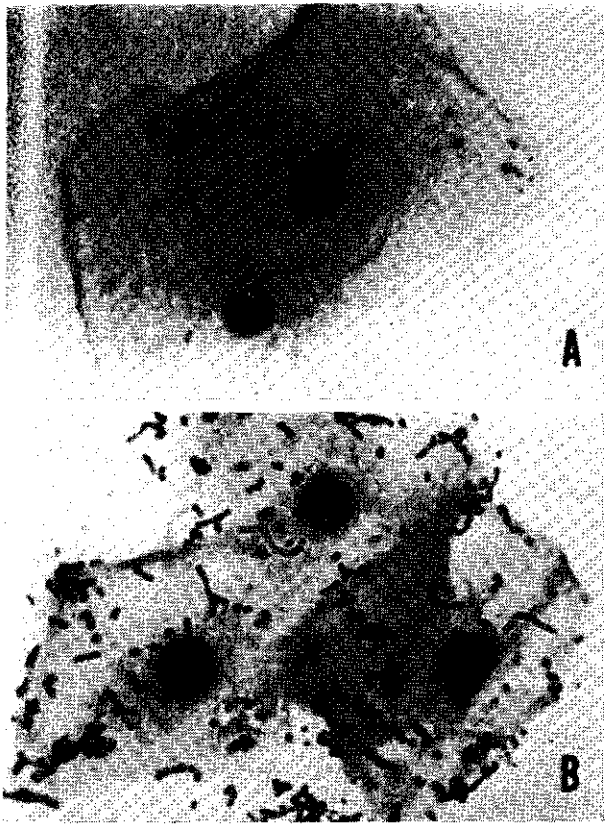


Fig. 4. Adsorptie van Streptococcus salivarius *aan wangslijmvliescellen. Boven: gewassen cellen. Onder: na de adsorptie. Uit: Gibbons & Van Houte, 1971.*

Verschillende bacteriën, zoals kinkhoestbacteriën, *Haemophilus* en *Klebsiella,* kunnen ook rode bloedcellen aan elkaar doen kleven (Duguid, 1959). Hier is geen aparte gom of lijm nodig. Een molekuul uit de celwand van de bacterie past op een molekuul van de gastheercel (fig. 5). Er zit dus een speciaal handvat aan de gastheercel, waaraan de bacterie zich vast kan houden. In dit geval houdt de bacterie zich vast met de suiker mannose. Voegt men eerst mannose aan de rode bloedcellen toe, dan raken alle handvaten bezet en blijft de adsorptie uit. Op deze wijze houden kinkhoestbacteriën zich vast

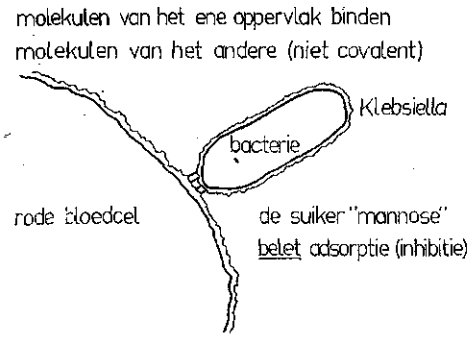


Fig. 5. Schema van de adsorptie van een bacterie aan een rode bloedcel.

tussen de trilharen van luchtpijp en bronchiën (voor figuur zie Davis et al., 1973), en zet *Mycoplasma* zich vast op de trilhaarcellen (voor figuur zie Collier et al., 1971) van het luchtpijpepitheel en geeft longontsteking.

De gonokok is de oorzaak van de geslachtsziekte, die druiper heet. Deze bacterie kan zo slecht tegen uitdroging en afkoeling, dat hij alleen bij vrijen wordt overgebracht. In de urine-afvoerbuis van de man houdt hij zich zorgvuldig aan de epitheelcellen vast (voor figuur zie Ward & Watt, 1972), om niet door de urine te worden weggespoeld. Hij adsorbeert ook aan spermatozoën. De gonokok is een lifter (fig. 6) en reist met de 'spermazauto' mee naar het beloofde land, waar geen douane is. Hij bezit speciale uitsteeksels (pili) om zich mee vast te houden (zie figuur in Ward et al., 1974).

Ook in de maag van de muis houden zich bacteriën vast. Zij hebben geen last van maagzuur (voor figuur zie Savage & Blumershine, 1974). In de dunne darm van de muis kleven weer andere soorten aan het epitheel.

De luchtwegen

Daar waar het er op aan komt een slijmvlies vrij van bacteriën te houden, zoals in de long, wordt de adsorptie moeilijk gemaakt door het oppervlak voortdurend te vernieuwen. Het slijmvlies van de luchtwegen bestaat uit trilhaarcellen, afgewisseld door bekercellen, die slijm produceren. De slijmlaag wordt door trilhaarcellen voortbewogen (fig. 7). In de neus ontstaat zodoende een 'tapis roulant' (lopende band),

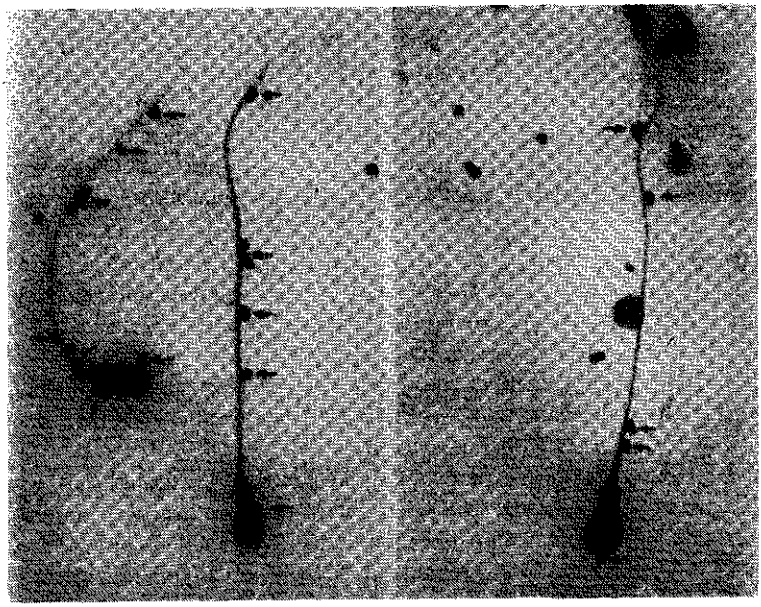


Fig. 6. Aanhechting van gonokokken aan spermatozoën. Uit: James-Holmquest et al., 1974.

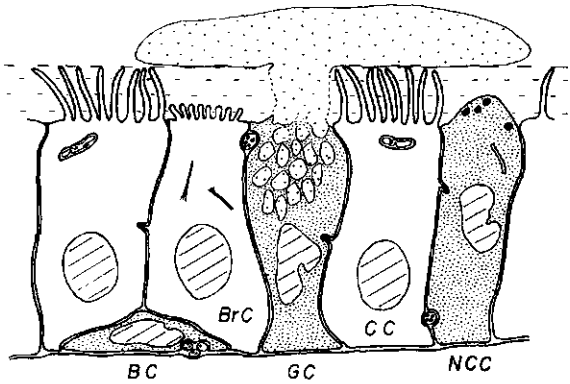


Fig. 7. Slijmvlies van de bronchiën. Uit: Reid, 1973.

waarop de bacteriën binnen 20 minuten, dus voor zij zich kunnen vermenigvuldigen, worden afgevoerd en worden doorgeslikt (fig. 8).

In de long bestaat zelfs een roltrap. Omdat dit transport veel langer duurt, reizen er fagocyterende macrofagen mee als conducteurs, die de ingeademde passagiers op de slijmlaag consumeren, maar zelf ook mee de maag in gaan. De roltrap reikt niet tot in het longblaasje; wat daar terecht komt wordt door long-macrofagen geconsumeerd.

Ook deze *fagocytose* is een reactie tussen cel-oppervlak en bacterie-oppervlak. Als de verhouding tussen de oppervlaktespanningen gunstig is, breidt het fagocyten-oppervlak zich over de bacteriecel uit zoals water over een glasplaat (voor figuur zie Jones et al., 1972).

Een pneumokok met een zuur, negatief geladen kapsel wordt door de fagocyt echter niet aangeraakt (fig. 9). Ontbreekt het kapsel, dan wordt de bacterie snel gefagocyteerd.

De streptokokken die roodvonk en keelontsteking veroorzaken, bezitten aan hun oppervlak een eiwit dat M-proteïne heet en waarmee zij zich aan sommige slijmvliescellen kunnen vasthouden (Fox, 1974). Op het oppervlak van fagocyterende lichaamscellen past dit M-proteïne niet. Integendeel, het zure karakter ervan belet de fagocytose. Behandelt men deze streptokokken eerst met trypsine, zodat het M-proteïne wordt afgebroken, dan worden ze snel gefagocyteerd (fig. 9).

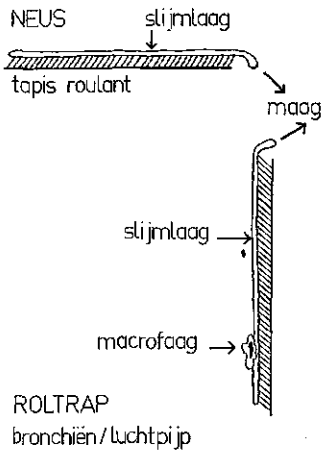


Fig. 8. Schema van het verweer van het slijmvlies van de luchtwegen.

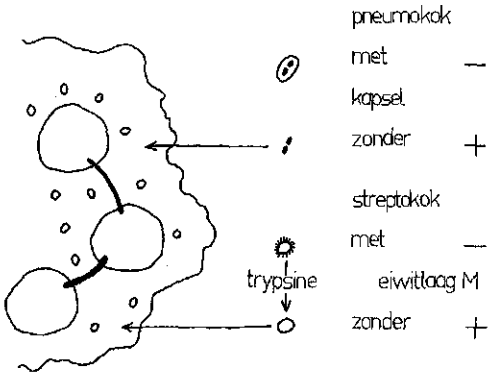


Fig. 9. Schema van fagocytose. De fagocyterende cel links neemt pneumokokken met een zure kapsel slecht op. Pneumokokken zonder kapsel worden snel opgenomen. Bij streptokokken belemmert het oppervlakkige M-eiwit de fagocytose. Haalt men dit eiwit met een eiwitsplitsend enzym eraf, dan wordt de bacterie goed opgenomen.

Streptokokken zonder M-proteïne hebben een veel lager ziekmakend vermogen.

Stafylokokken worden relatief gemakkelijk gefagocyteerd (Goodman et al., 1956).

Fagocyterende cellen kunnen kruipen, maar niet zwemmen. Fagocytose gaat dan ook het beste als de bacteriën op een oppervlak liggen en door de fagocyterende cel als het ware tegen dat oppervlak kunnen worden vastgedrukt of tussen twee cellen kunnen worden ingeklemd (oppervlakte-fagocytose, zie Smith & Wood, 1947).

Specifieke weerstand

De natuurlijke weerstand rekent met vele bacteriën af. Pathogeen (ziekmakend) zijn zij, die aan de natuurlijke weerstand ontsnappen. We worden dan ziek, maar meestal ook weer beter (fig. 10). De meeste infectieziekten gaan vanzelf over, omdat de gastheer nieuwe weerstandsfactoren produceert, zoals antilichamen of immuunactieve cellen. Antilichamen zijn nieuwe serumeiwitten, die specifiek met deze ziekteverwekker, en niet met een andere, reageren. Specifiek wil hier zeggen, dat de gastheer nieuwe oppervlakken heeft geproduceerd die precies passen op (stukken van) het oppervlak van deze ziekte-

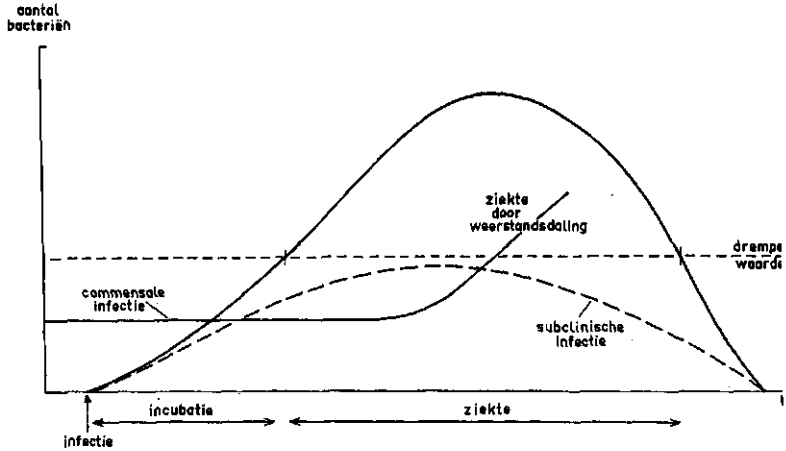


Fig. 10. Na de infectie ontwikkelen de micro-organismen zich tegen de weerstand van het lichaam in. Pas als een zeker aantal bereikt wordt (drempelwaarde) ontstaan verschijnselen. Meestal neemt na verloop van tijd (bijvoorbeeld door vorming van antilichamen) het aantal weer af en worden de micro-organismen geëlimineerd. Is de natuurlijke weerstand (of bij herinfectie de specifieke weerstand) hoger, dan kan de infectie beneden de drempelwaarde blijven (stippellijn). Bacteriën die normaal op de slijmvliezen wonen (commensalen), worden door de normale weerstand in bedwang gehouden en ontwikkelen zich slechts als de weerstand faalt.

verwekker, en zich daaraan hechten: een nieuwe reactie tussen grensvlakken van gast en gastheer. In de elektronenmicroscoop kan men de antilichaammolekulen die bijvoorbeeld twee virusdeeltjes verbinden, zichtbaar maken (zie bijvoorbeeld Almeida et al., 1967). Zo'n antilichaammolekuul heeft twee identieke combinerende groepen (zie figuur bij Jerne, 1973) die precies passen op een stukje van het virus of van de bacteriecelwand.

De gastheer heeft zijn fabriek van reserve-oppervlakken ingeschakeld. Hij had enkele lymfocyten in voorraad, die molekulen kunnen maken, die precies op het pneumokokkenkapsel passen (fig. 11) en deze aan hun oppervlak dragen. Na contact met de kapselsubstantie gaan deze cellen zich (in de lymfklier) vermenigvuldigen, zodat een hele familie van antilichaam-vormende plasmacellen ontstaat. De afgescheiden antilichamen komen in de serumeiwitten van het bloed terecht. Als de antilichamen zich aan een pneumokok hechten, veranderen zij de oppervlaktelading en de oppervlaktespanning (Van Oss

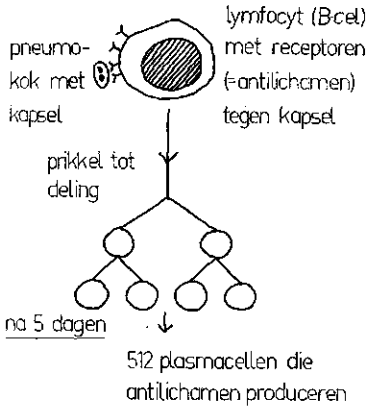


Fig. 11. Schema van de prikkel die tot antilichaamvorming leidt. Onder de vele uit het beenmerg afkomstige (B) lymfocyten zijn er enkele die de erfelijk bepaalde informatie bezitten voor de vorming van een eiwit dat met het kapsel van deze pneumokok kan reageren.

et al., 1972) zodat de bacterie nu wel wordt gefagocyteerd.

Bij gastheren die al antilichamen bezitten, heeft zo'n pneumokok geen kans. In de loop van de evolutie zijn dus pneumokokken ontstaan, die een ander kapsel-koolhydraat produceren. Zo kennen wij 50 typen pneumokokken met verschillende kapsels en streptokokken met 50 verschillende M-proteïnen.

Voor de geneeskunde was het natuurlijk belangrijk deze typen te kunnen onderscheiden en de antilichamen te kunnen aantonen. Voor de taxonomie was deze serotypering op grond van de structuur van één of enkele koolhydraatmolekulen in de celwand niet erg gewichtig.

Een mooi voorbeeld van de oppervlakkige molekulen aan de buitenkant van de celwand is te vinden bij de groep van gram-negatieve darmbacteriën (Enterobacteriaceae), waartoe zowel de colibacterie als de tyfusbacterie behoort. Deze bacteriën hebben een dunne celwand, die toch nog complex genoeg van structuur is (zie figuur bij Costerton et al., 1974). Naar buiten steken lange ketens van koolhydraten, die met een vet voetje in de buitenste lipidelaag vast zitten (lipopolysacchariden). De algemene structuur van deze ketens is steeds gelijk (zie figuur bij Staub & Westphal, 1964), maar door kleine variaties in de aard en bindingswijs van de samenstellende suikers zijn er zeer vele typen mogelijk. Zo kennen wij wel honderd serotypen van *E. coli* en

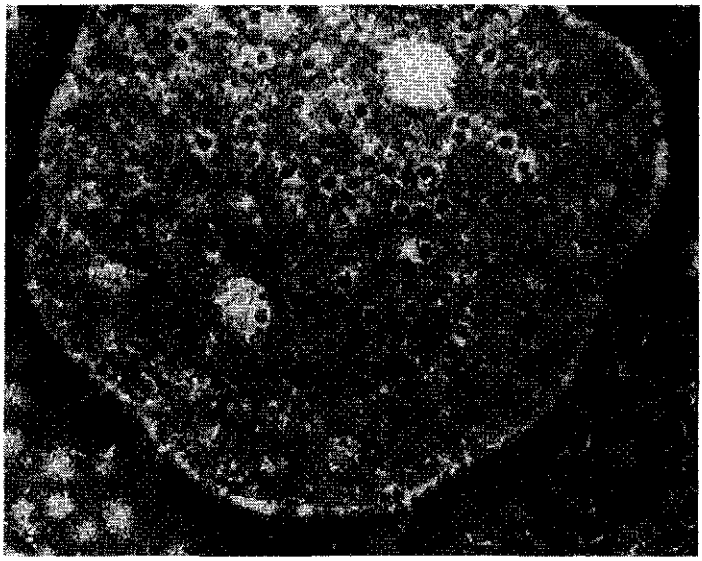


Fig. 12. Elektronenmicroscoopfoto van de gaatjes die in de lipidelaag van de celmembraan ontstaan onder invloed van antilichamen en complement.

nog meer paratyfusbacteriën. Tegen de colibacteriën uit de eigen darm bezit de mens altijd wat antilichamen, maar soms komen er nieuwe varianten binnen die dan toch ziekte (diarree) kunnen geven.

De evolutie heeft dus bacteriën met allerlei rare oppervlakken geproduceerd. De gastheer heeft dit beantwoord met steeds nieuwe antilichamen.

Een antilichaammolekuul dat zich aan (een stuk van) de koolhydraatketen van zo'n bacterie hecht, verandert van vorm, het ontvouwt zich. Uit de vouw komt een nieuw stukje eiwitketen naar voren, dat als signaal werkt voor de inschakeling van een versterkersysteem. Dit complementaire systeem bestaat uit een serie normale serumeiwitten (enzymen) die elkaar achtereenvolgens activeren (Mayer, 1973). De geactiveerde hydrofobe brokstukken hechten zich aan de lipidelaag van het bacterieoppervlak en bovendien aan elkaar, zodat zij in een ring door de lipidelaag zakken en een gaatje vormen (fig. 12). Door dit gaatje kunnen gastheerenzymen, zoals lysozym, naar binnen, die de celwand afbreken. De bacterie-inhoud lekt dan naar buiten en de bacterie lost op en gaat dood.

U ziet dus, hoe belangrijk het bacterieoppervlak is, zowel voor de bacterie als voor de gastheer.

De inhoud van de bacterie zullen wij een volgende keer, 400 jaar na Antoni van Leeuwenhoek, behandelen.

De bereiding van penicilline; een voorbeeld van het gebruik van micro-organismen in de procesindustrie

W. F. VAN DER WAARD

Inleiding

In een overzicht van de stand van zaken in de microbiologie drie eeuwen na Van Leeuwenhoek mocht, naar de mening van het organiserend comité, een bijdrage vanuit de industrie niet ontbreken. Immers de tak van de industrie die stoelt op het gebruik van microorganismen heeft een grote ontwikkeling doorgemaakt, vooral na 1945, en het einde van deze ontwikkeling lijkt nog niet in zicht.

Het belang van deze nijverheid zou men kunnen aflezen aan de hoeveelheden die worden geproduceerd. De wereldjaarproduktie van een betrekkelijk kostbaar produkt als penicilline wordt geschat op ruim 10.000 ton; de hoeveelheid citroenzuur per jaar langs microbiologische weg verkregen bedraagt ca. 200.000 ton. Aan wasmiddelprotease wordt per jaar ca. 10.000 ton geproduceerd. Grote capaciteit hebben de installaties die momenteel worden gebouwd voor de produktie van microbieel eiwit, meestal aangeduid als single-cell protein of SCP, dat op het ogenblik nog geen andere toepassing vindt dan in veevoeder. Zowel op Sardinië als in Zuid-Italië worden fabrieken neergezet voor een jaarproduktie van 100.000 ton (Humphrey, 1974). Ze vormen een duidelijk bewijs, dat de microbiologische procesindustrie in volle ontwikkeling is.

Deze ontwikkeling zou niet kunnen plaatsvinden zonder de microbiologie, een wetenschap die we gaarne laten beginnen met de beroemde brief van Antoni van Leeuwenhoek aan de Royal Society. Toch is het jaar waarin de brief werd geschreven, 1676, niet te beschouwen als het geboortejaar van wat kan worden aangeduid als industriële microbiologie. Deze tak van nijverheid heeft veel oudere papieren en is in zekere zin zelfs zo oud als de mensheid. Bij de bereiding van alcoholische dranken – alle volkeren hoe primitief ook beschikten wel over een of ander alcoholisch produkt – en kaas, zijn

micro-organismen betrokken, hoewel dit uiteraard eeuwenlang onopgemerkt bleef. Deze micro-organismen waren in het materiaal of in de omgeving aanwezig, behoefden niet opzettelijk te worden toegevoegd, zodat lang kon worden aangenomen dat de processen spontaan verliepen. Er kwamen wel microben maar nog geen microbiologie aan te pas.

Dit soort processen wordt tot op de huidige dag overal toegepast, zowel op industriële schaal in zuivelfabrieken en brouwerijen, als op traditionele wijze, door zelfkazende boeren, kleine wijnbouwers en dergelijke. Het is een uitgebreid gebied, dat reikt van wijn tot yoghurt en van zuurkool tot compost. Hoe fascinerend deze processen uit microbiologisch oogpunt ook mogen zijn, toch zal hierop niet nader worden ingegaan; we zullen ons beperken tot de microbiologische procesindustrie in engere zin, waarbij micro-organismen op grote schaal worden gekweekt voor specifieke doelen in daarvoor ontworpen apparatuur.

Microbiologische procesindustrie

Laten we eerst nagaan welke die doeleinden zijn. We zijn gewoon de processen in drie groepen in te delen:

– De micro-organismen worden gekweekt om de cellen als zodanig. Het oudste voorbeeld is bakkersgist, maar we kennen nu ook het single-cell protein. In opkomst is de produktie van schimmelmycelium als eiwitbron. Verder het laten groeien van gisten als *Torula* op afvalstromen en, in gespecialiseerde bedrijven en instituten, het kweken van bacteriecellen voor de bereiding van vaccins. Strikt genomen moet ook het telen van champignons tot deze categorie worden gerekend, hoewel hierbij niet iedereen onmiddellijk aan microbiologie denkt.

– De micro-organismen worden gekweekt ter wille van een of meer metabolische produkten. We kennen een hele reeks van deze produkten: antibiotica, organische zuren waaronder aminozuren, enzymen, vitamines, alcohol, aceton. Het is hierbij niet noodzakelijk, dat de produkten door de micro-organismen worden afgescheiden. Sommige enzymen zijn aan of in de cel gebonden en kunnen in een later stadium van het proces worden geïsoleerd, bijvoorbeeld na autolyse van de microbiële cel.

– De micro-organismen worden gekweekt om ze een chemische reactie te laten uitvoeren. Een oud voorbeeld is de azijnbereiding waar-

bij alcohol in azijnzuur wordt omgezet, maar we kennen tegenwoordig fraaie voorbeelden in de steroïdchemie. Zo kunnen bij de bereiding van hydrocortison een aantal chemische bereidingsstappen worden overgeslagen door de voor dit hormoon karakteristieke 11β-hydroxylgroep in te voeren met behulp van een schimmel (bijvoorbeeld *Curvularia lunata* of *Cunninghamella blakesleeana*) (fig. 1). Zelfs kan men deze reactie laten volgen door een tweede waarbij prednisolon ontstaat. In dit geval is de reactie een dehydrogenering welke met behulp van een bacterie (bijvoorbeeld *Corynebacterium simplex* of *Bacillus lentus*) kan worden uitgevoerd. Micro-organismen zijn tot vele specifieke reacties van dit type in staat. Voor een uitvoerig overzicht zie Beukers et al. (1974).

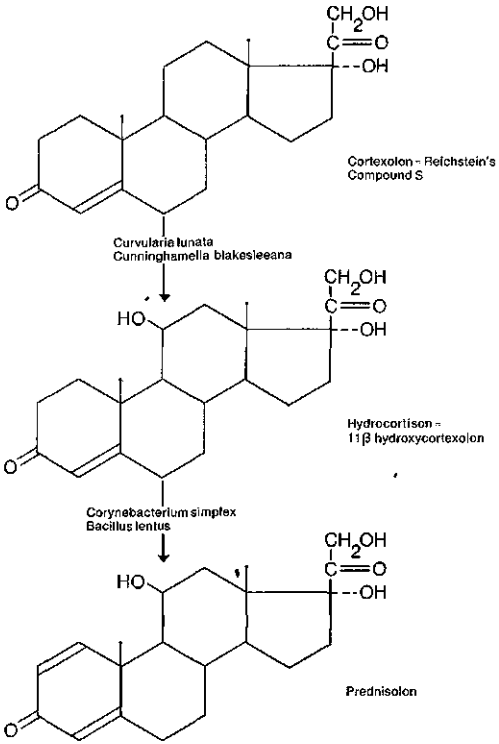


Fig. 1. Enige voorbeelden van omzettingen van steroïden met behulp van micro-organismen.

Een recent voorbeeld vinden we in de octrooien die betrekking hebben op de omzetting en vorming van prostaglandines.

Tenslotte behoort in deze categorie de belangrijke splitsing van penicilline G thuis, welke het 6-aminopenicillaanzuur oplevert, bouwsteen voor vele nieuwe penicillines. Hierop wordt later in dit hoofdstuk teruggekomen.

De bereiding van penicilline

We hebben bij de beperking tot de eigenlijke industriële microbiologie te maken met een grote verscheidenheid aan processen en het is onmogelijk ze in kort bestek uitvoerig te bespreken. Voor het verkrijgen van enig begrip van deze industrie is dit niet strikt nodig want de processen hebben in de uitvoering zoveel gemeen, dat we kunnen volstaan met er één uitvoeriger te belichten. De keuze is hierbij gevallen op de bereiding van penicilline, dus die van een metabolisch produkt, in dit geval een antibioticum. Deze keuze is niet geheel willekeurig. Het is een van de belangrijkste processen; er is vrij veel werk aan verricht, vrijwel alle typische facetten van het werken met micro-organismen op grote schaal komen er bij aan de orde en ten slotte is er nog een interessante uitbreiding op organisch-chemisch terrein. Penicilline is een antibioticum, dat wordt gevormd door een schimmel, *Penicillium chrysogenum.* In feite zijn er vele penicillines; bedoeld wordt hier penicilline G of benzyl-penicilline. Op de betekenis van dit voorvoegsel zal later nader worden ingegaan.

De microbioloog in de industrie doet in wezen hetzelfde wat de meeste microbiologen in het laboratorium doen. Hij kweekt een bepaald micro-organisme in een voedingsbodem onder gekozen voorwaarden. Er is slechts een schaalverschil. De afmetingen van de in de industrie gebruikte apparatuur wijken sterk af van die in het laboratorium, waardoor speciale problemen voor de microbioloog ontstaan.

Submerse kweek

De schimmel die bij de bereiding van penicilline wordt gebruikt wordt voor dit doel submers gekweekt. Dit betekent, dat het micro-organisme zo homogeen mogelijk wordt verdeeld over het beschikbare gistingsvolume. De cultuurvloeistof zal dus in beweging moeten blijven, bijvoorbeeld door middel van een roerwerk of luchtbellen. Dit ener-

zijds om uitzakken of floteren van het schimmelmycelium te voorkomen en anderzijds om rond het micro-organisme steeds een zo gunstig mogelijk milieu te scheppen door aanvoer van voedingsstoffen en vooral zuurstof. Deze submerse kweekmethode werd reeds lange tijd toegepast bij de bereiding van bakkersgist; in het laboratorium zijn de bouilloncultures van beweeglijke bacteriën reeds lang bekend. Tot voor 1945 heeft men echter voor het kweken van zo sterk aërobe micro-organismen als schimmels in de industrie steeds gebruik gemaakt van de oppervlaktecultuur, waarbij men de schimmel laat groeien op een stilstaand vloeibaar medium en eventueel lucht overblaast om een goede aëratie te verzekeren. Het is duidelijk, dat op deze wijze een minder efficiënt gebruik wordt gemaakt van het beschikbare volume. De schimmel put de bovenste laag van het medium uit en aanvulling van voedingsstoffen kan slechts door diffusie plaatsvinden. Toch wordt deze werkwijze nog hier en daar toegepast voor de bereiding van citroenzuur. Ook die van penicilline is zo begonnen, namelijk in liggende melkflessen. De ontwikkeling van het kweken van schimmels op deze grote schaal zou zonder deze methode, waarvan de eerste pogingen reeds dateren van 1933, niet mogelijk zijn geweest (Kluyver & Perquin, 1933).

We kunnen de benodigdheden voor de uitvoering van een gistingsproces op grote schaal in vier groepen verdelen, nl.:
- apparatuur, voornamelijk de gistingsbak of fermenter
- micro-organisme
- voedingsmedium
- procesgegevens.

Apparatuur

Hier wordt uitsluitend besproken de apparatuur die nodig is voor het gistingsproces zelf; uiteraard moet het gevormde produkt na afloop worden afgescheiden, waarvoor aangepaste apparatuur benodigd is. Hierbij is de verscheidenheid over het algemeen groter dan bij het eigenlijke gistingsproces. Bij de produktie van bakkersgist kan men volstaan met het afscheiden van de cellen met centrifuges en filters, de produktie van een metabolisch produkt vereist meestal een extractiestap, zoals ook bij penicilline het geval is. Op dit gedeelte van de processen, dat van fysisch-chemische aard is, zal in dit hoofdstuk niet nader worden ingegaan.

Het is nuttig hier op te merken, dat de microbioloog in de industrie voortdurend spreekt van gisting en fermentatie. In de meeste gevallen is dit onjuist; deze woorden behoren eigenlijk alleen te worden gebruikt om anaërobe processen aan te duiden, dus processen waarbij geen zuurstof van buitenaf wordt toegevoerd. De meeste processen die in de industrie worden uitgevoerd, zijn aëroob, maar worden in het heersende spraakgebruik toch als gisting of fermentatie aangeduid.

De *fermenter* is een grote, vrij slanke ketel, bij voorkeur vervaardigd uit roestvrij staal. De grootte kan variëren; we kennen ze met een netto inhoud van 150 m^3 en meer. De fermenter of gistingsbak bevat in het algemeen de volgende, voor het proces onmisbare, elementen en aansluitingen (fig. 2 en fig. 3):

- roerinrichting
- koelinrichting
- luchtinvoer
- luchtafvoer
- stoomaansluiting
- aansluiting voor gedoseerde toeloop
- meetmogelijkheden voor temperatuur, pH, opgeloste zuurstof
- regelingsmogelijkheden voor temperatuur, pH
- inrichting voor de toevoeging van een antischuimmiddel.

Uit het eerder vermelde over de submerse cultuur volgt dat het

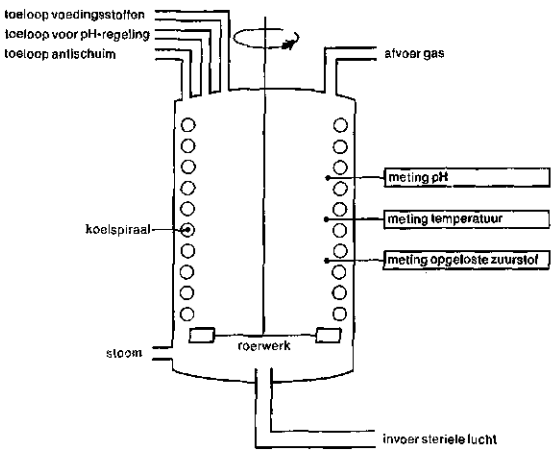


Fig. 2. Schematische voorstelling van een fermenter.

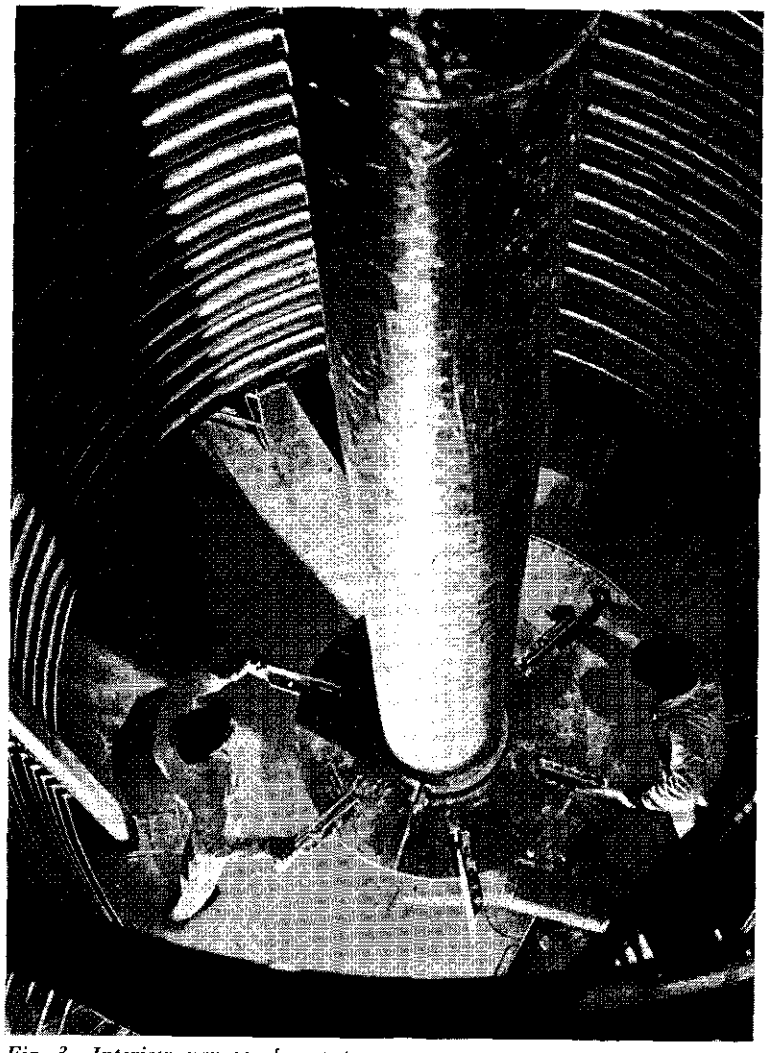


Fig. 3. Interieur van een fermenter.

roerwerk een belangrijke rol zal spelen. Het is nodig voor een goede menging van de cultuur; de aëratie wordt er door bevorderd via het kapotslaan van ingevoerde luchtbellen, tijdens het proces toegevoegde voedingsstoffen worden verdeeld. Het is onmisbaar bij het verkrijgen

van optimale stofoverdracht. Het roerwerk is vrij krachtig (enige tientallen kW) en dat is ook wel nodig als men bedenkt, dat een goed gegroeide cultuur van *P. chrysogenum* ongeveer de consistentie van havermoutpap heeft. Er zijn typen gistingen die het zonder roerwerk kunnen stellen en de benodigde agitatie van de vloeistof verkrijgen via het inblazen van een grote hoeveelheid lucht. Dit is uitsluitend het geval bij cultures met een lage viscositeit, bijvoorbeeld van bakkersgist en van bepaalde bacteriën.

Koeling is noodzakelijk. Tijdens het proces worden door de schimmel grote hoeveelheden suiker gedissimileerd, waarbij een deel van de energie in de vorm van warmte vrijkomt. Verder levert het roerwerk warmte, ca. een derde van de af te voeren hoeveelheid. Hier vinden we een kenmerkend verschil met de laboratoriumpraktijk van de microbioloog. Hij plaatst zijn cultures in een broedstoof om ze op de gewenste temperatuur te houden, die meestal ligt boven de omgevingstemperatuur. Zijn zorg is de cultuur warm genoeg te houden omdat het afkoelend oppervlak van een cultuurbuisje relatief groot is ten opzichte van de inhoud. Bij een grote fermenter is het juist omgekeerd.

Voor de koeling gebruikt men meestal een koelspiraal; koelmantels zijn eveneens in gebruik en soms vindt de temperatuurregeling wel plaats door eenvoudig water over de buitenwand van de fermenter te laten lopen (Rieselkühlung).

Besmettingsgevaar

De lucht welke wordt ingevoerd dient uiteraard om de schimmelcellen van zuurstof te voorzien. Het af te voeren gas is armer aan zuurstof dan lucht en rijker aan CO_2, dat bij de verbranding van de suiker ontstaat. De aan en af te voeren hoeveelheden zijn groot (enige duizenden m^3 per uur). De lucht dient volkomen steriel te zijn en passeert daarom een aantal filters. Hier zijn we aangeland bij een belangrijk probleem voor de industriële microbioloog, namelijk dat van de *steriliteit*. Het is een strikte eis, dat in de fermenter en dus in het daarin aanwezige voedingsmedium als micro-organisme uitsluitend de daarin gebrachte schimmel aanwezig is. Kan men in het laboratorium vaak volstaan met een wattenprop, de fermenter met zijn afmetingen stelt ons voor grotere problemen. Genoemd werd al de luchtfiltratie, maar het is duidelijk dat elke toegang tot de fermenter, zoals de door-

voer van de as van het roerwerk, bijvoorbeeld door middel van stoom, beveiligd moet zijn.

De gevolgen van besmetting zijn in vele gevallen desastreus. Als de omstandigheden gunstig zijn voor de vermenigvuldiging van het besmettend micro-organisme, neemt het een deel van de beschikbare voedingsstoffen voor zijn rekening, zodat er minder overblijft voor het producerende micro-organisme. Meestal zo weinig, dat de gisting als verloren moet worden beschouwd. Bij de bereiding van penicilline bestaat de mogelijkheid van besmetting door penicillinase-producerende micro-organismen. Eenmaal gevormde penicilline kan in zo'n geval in korte tijd geheel verdwijnen.

Niet altijd zijn de steriliteitseisen zo streng; soms bezit de cultuur in zekere mate zelfbescherming, bijvoorbeeld door een lage pH. Ook de duur van het proces is van belang. Een bakkersgistfermentatie duurt nog geen 24 uur, zodat infectie weinig kans krijgt. In een enkel geval voegt men kleine hoeveelheden antibiotica toe, die vanzelfsprekend geen schadelijke invloed op het producerende micro-organisme mogen uitoefenen (protected fermentation).

Stoom is al genoemd en dient behalve voor de beveiliging ook voor het in situ steriliseren van de fermenter en het daarin aanwezige medium. Een fermenter zal daarom voldoen aan bepaalde voorwaarden door het stoomwezen gesteld.

De suikertoeloop

Het medium bevat aan het begin van het proces, dat in principe een 'batchproces' is, slechts een betrekkelijk klein gedeelte van de benodigde voedingsstoffen. Het grootste deel wordt tijdens de gisting continu toegevoerd. Neemt men een dergelijke voorzorg niet, dan zal de schimmel de suiker zo snel verbranden, dat de zuurstoftoevoer dit niet kan bijhouden, met als gevolg een onderaëratie die fataal is voor de vorming van penicilline.

Uiteraard is deze 'toeloop' steriel, hetzij van te voren gesteriliseerd en aangevoerd via een steriel systeem, hetzij vlak voor de toevoeging gesteriliseerd bij hoge temperatuur in een continusysteem gedurende korte tijd (heatshock).

Een suikertoeloop kan bij de penicillinegisting ook als het ware in de cultuur worden ingebouwd. Dat is namelijk het geval wanneer men de schimmel laat groeien op lactose in plaats van glucose of

saccharose. De schimmel kan lactose op zichzelf niet verademen maar moet hem eerst omzetten tot glucose en galactose. Deze omzetting is de beperkende stap, zodat hetzelfde effect wordt bereikt als met een gedoseerde toeloop van bijvoorbeeld glucose.

Meten en regelen

Het is duidelijk, dat er een en ander moet worden gemeten ten einde regelend te kunnen optreden. Temperatuur en pH worden automatisch geregeld; de waarden van de opgeloste zuurstof leveren gegevens over de aëratie waarop kan worden ingegrepen via de toeloopsnelheid of de hoeveelheid lucht welke wordt ingeleid.

Als gevolg van roeren en lucht doorblazen ontstaat gemakkelijk een grote hoeveelheid schuim. Zou het schuim zo hoog komen dat het de bak via de gasafvoer zou verlaten, dan ontstaan er moeilijkheden. Het betekent verlies van cultuurvloeistof en kans op infectie. Daarom is de bak uitgerust met een inrichting om, als het schuim een bepaalde hoogte heeft bereikt, automatisch een antischuimmiddel toe te voegen. Dit kan zijn een eetbare olie of een siliconenpreparaat. Van het eerste zijn meestal grotere hoeveelheden nodig, maar ze worden door de schimmel verademd en dienen dus als voeding. De siliconenpreparaten zijn erg actief, worden door de schimmel niet verwerkt en kunnen in het eindprodukt terechtkomen.

Het micro-organisme en zijn historie

Behalve de apparatuur is natuurlijk van belang het producerende micro-organisme, in dit geval een stam van *Penicillium chrysogenum*. Het feit, dat bepaalde *Penicillium*-soorten een antibiotische stof afscheiden was reeds bekend door de ontdekking van Sir Alexander Fleming. Lange tijd bleef deze ontdekking zonder gevolgen. Pas tijdens de tweede wereldoorlog werd hierop teruggegrepen en het proces voor de bereiding van penicilline ontwikkeld, een project waaraan door 19 Amerikaanse bedrijven en een aantal instituten werd deelgenomen (Perlman, 1974).

Geruchten over de ontwikkeling bereikten Nederland, onder andere via illegaal beluisterde geallieerde zenders. Hier werd, onafhankelijk, hetzelfde werk ter hand genomen en met succes bekroond. Onmiddellijk na de bevrijding kon in Nederland met de produktie op industriële

schaal worden begonnen (Elema, 1970).

Beschikte men dus in 1945 reeds over een produktief micro-organisme, het is stellig niet hetzelfde wat momenteel wordt gebruikt. Over de gehele wereld is gewerkt aan het opvoeren van het rendement van het proces, zodat per volume-eenheid fermentatiemedium naar schatting ca. 25.000 maal zoveel penicilline verkregen wordt als bij de eerste pogingen (Perlman, 1974). Dit is niet uitsluitend een gevolg van het gebruik van mutanten van de oorspronkelijke stammen. Wij kunnen het vermogen van een schimmel om penicilline te vormen uitdrukken in de vorm van de Q_{pen}, de hoeveelheid antibioticum die per mg mycelium en per uur wordt gevormd, en vermoedelijk is deze factor in de loop der tijden 20 maal zo groot geworden. Dat de cultuurvloeistof aan het eind van het proces niet slechts 20 maal zoveel penicilline bevat als vroeger, is het gevolg van de ontwikkeling van de technologie. Men heeft geleerd in eenzelfde volume veel meer schimmelmycelium onder te brengen door hogere suikerconcentraties, betere beluchting en dergelijke, en men heeft ook geleerd de schimmel gedurende langere tijd op dezelfde Q_{pen} te houden. Soms hebben deze ontwikkelingen alleen kunnen slagen omdat bij het genetische werk een nieuw type stam werd verkregen, bijvoorbeeld een stam die een minder visceuze cultuur oplevert, zodat de efficiëntie van de beluchting kan worden verbeterd.

Het spreekt vanzelf, dat de produktiestammen met veel zorg worden omgeven. De stammen zijn vaak en dus sterk gemuteerd. Van de oorspronkelijke stam was slechts een klein gedeelte van het enzymsysteem tot de biosynthese van het gewenste antibioticum in staat; bij de gemuteerde stammen is het vermogen tot penicillinevorming veel sterker ontwikkeld. De praktijk heeft geleerd, dat dergelijke stammen de eigenschap veel antibioticum te produceren gemakkelijk verliezen. Dit zal als regel tijdens de groei gebeuren en derhalve tracht men onnodig overenten te vermijden en besteedt men veel zorg aan bewaartechnieken. Verder is ook hier het binnendringen van vreemde micro-organismen een potentieel gevaar. Beide zaken, behoud van de stameigenschappen en de steriliteit, zijn typische hoofdbrekens voor de microbioloog in de industrie. In een speciaal laboratorium worden met behulp van de produktiestam entcultures gemaakt welke dienen als zaad voor de grote fermenter; soms worden om economische redenen kleinere fermenters tussengeschakeld. De entcultuur die, uiteraard weer op aseptische wijze, in de fermenter wordt gebracht, vindt daarin

een voedingsbodem waarvan het recept geheel is aangepast aan stam en proces.

Wat vinden we in dit *voedingsmedium?*

- een koolstofbron, bijvoorbeeld saccharose, gedeeltelijk via toeloop
- een of meer stikstofbronnen variërend van ammoniumzouten tot aminozuren en eiwitten zoals in maïsweekwater worden aangetroffen
- een zwavelbron, bijvoorbeeld natriumsulfaat; penicilline bevat zwavel
- zouten, onder andere fosfaten
- de precursor, meestal fenylazijnzuur
- water, als oplos- en dispersiemiddel.

Het begrip *precursor* verlangt enige toelichting. Het penicillinemolekuul is samengesteld uit een kern die in alle penicillines voorkomt (6-aminopenicillaanzuur) en een deel dat de zijketen wordt genoemd (fig. 4). Schimmels zijn in het algemeen niet in staat zo'n zijketen te synthetiseren, althans niet in de vereiste hoeveelheden. De zijketen bepaalt de eigenschappen van de penicilline. 'De' penicilline is penicilline G met een benzylgroep als zijketen. Door deze groep in de vorm van fenylazijnzuur toe te voegen, kan de schimmel de benzyl-

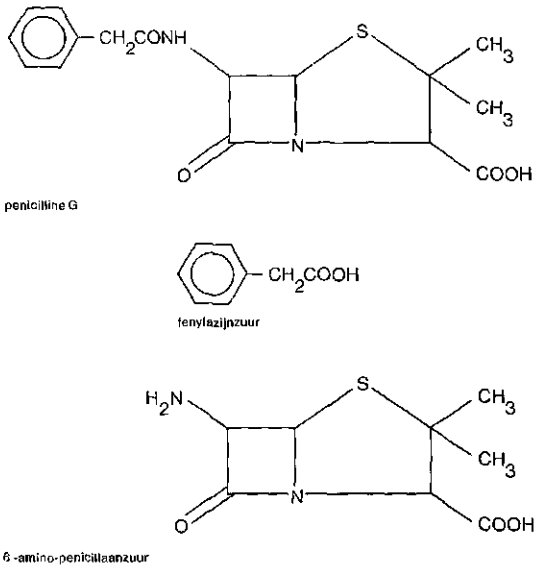


Fig. 4. Penicilline G met precursor en 6-aminopenicillaanzuur.

groep in het door hem zelf gesynthetiseerde aminopenicillaanzuur inbouwen. De vraag komt dan onmiddellijk op of andere zijketens kunnen worden ingebouwd. Het heeft uiteraard niet aan pogingen ontbroken dit te doen. Slechts in één geval met een vergelijkbaar succes, namelijk met fenoxyazijnzuur, dat het penicilline V oplevert (fig. 5). Penicilline V is stabiel bij vrij lage pH, kan daarom de maag passeren en oraal worden toegediend, wat bij penicilline G niet het geval is. Toch kent u allen waarschijnlijk nog andere penicillines; dat zijn semi-synthetische penicillines waarop nog zal worden teruggekomen.

Procesgegevens

Tenslotte de verdere procesomstandigheden als temperatuur, pH, concentratieverhouding van de verschillende ingrediënten van het medium. Hiervoor geldt hetzelfde als voor de mediumsamenstelling; het zijn variabelen waarvoor de waarden zijn verkregen na langdurig ontwikkelingsonderzoek. Al deze factoren moeten leiden tot optimale omstandigheden waarbij we met optimaal bedoelen die omstandigheden welke leiden tot een produkt met minimale kostprijs bij de gegeven apparatuur en de stand van de kennis.

Het fermentatieproces

We hebben nu een fermenter vol voedingsstoffen, de entcultuur is toegevoegd, roerwerk, beluchting en koeling werken, zodat de omstandigheden zijn geschapen voor de vermenigvuldiging van de schimmel. Dit gaat in vrij snel tempo, zodat na ca. 24 uur een dikke cultuur is ontstaan die begint penicilline te produceren. Wij zien dus twee fasen;

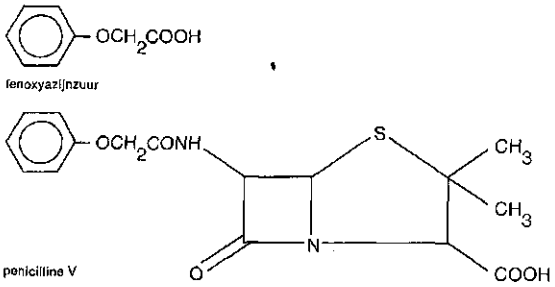


Fig. 5. Penicilline V met precursor.

groeifase en een produktiefase, hoewel in de produktiefase nog steeds groei optreedt en een deel van het mycelium verdwijnt als gevolg van lysis. Zoals reeds opgemerkt, wordt suikeroplossing continu toegevoegd, zodat de bak langzaam maar zeker vol raakt.

Na meer dan een week gisten wordt het proces als geëindigd beschouwd; er bestaat een optimaal tijdstip voor het afbreken van de gisting. De produktiecurve, die vrij steil verloopt, gaat op den duur afvlakken; voortzetting van het proces zal nog wel iets meer produkt opleveren maar niet op optimale wijze. Ruwweg zou men het juiste tijdstip om de gisting te beëindigen kunnen bepalen door construeren van de raaklijn aan de produktiecurve vanuit de oorsprong van de grafiek. Juister is om dit te doen vanuit een punt daarvóór gelegen, zodat men de dode tijd, de tijd benodigd voor leegpompen, vullen, steriliseren van de fermenter erbij betrekt (fig. 6).

Het ligt voor de hand dat er grote behoefte bestaat aan snelle methodieken om vast te stellen hoeveel penicilline in de vloeistof aanwezig is. De concentraties zijn vrij hoog, zodat met succes chemische en fysische methoden gebruikt kunnen worden. Ook langs microbiologische weg kan men de penicillineconcentratie meten. Deze methode is zeer gevoelig. Het is mogelijk hiermee de aanwezigheid van 0,001 E met redelijke nauwkeurigheid aan te tonen. Eén penicilline-eenheid (E) is ca. 0,6 μg.

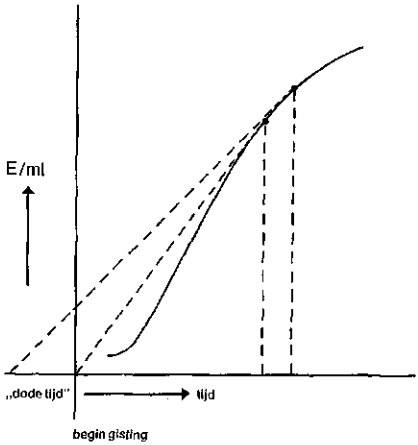


Fig. 6. Grafische bepaling van het tijdstip van het einde van het proces.

Het mycelium wordt afgefiltreerd en uitgewassen en het filtraat geextraheerd met een organisch oplosmiddel waaruit het antibioticum als kalium- of natriumzout kan worden verkregen.

Mogelijkheden van procesontwikkeling

Het proces zoals dat vandaag over de gehele wereld wordt uitgevoerd was er niet zomaar opeens en, wat veel belangrijker is, het zal maar korte tijd zo blijven omdat steeds verbeteringen mogelijk blijken. Er zijn meer microbiologen en anderen bezig met de studie en de ontwikkeling van het proces dan met de eigenlijke bedrijfsvoering. De optimale omstandigheden zijn eigenlijk steeds momentopnamen. Zij veranderen reeds bij in gebruik nemen van een andere stam, zelfs kunnen ze al veranderen als indirect gevolg van verschuivingen in de grondstoffenprijzen.

Hoe kan men een dergelijk proces nu nog verbeteren? Er zijn ruwweg drie gebieden aan te wijzen:
- onderzoek aan stammen (selectie, mutatie, kruisingen, genetisch werk)
- onderzoek van de biosynthese van het produkt leidende tot beter inzicht in het proces en de beperkende factoren
- ontwikkeling van de technologie.

Valt er nog iets te verbeteren aan een proces dat al 30 jaar wordt uitgevoerd? Blijkbaar wel; bij de stamverbetering kan men het zoeken in de richting van een beter gebruik van de toegevoerde energie, dus van de suiker. Een deel hiervan is nodig voor groei en onderhoud van het gevormde mycelium, een ander deel voor de biosynthese van de penicilline. Eigenlijk zou men pas tevreden kunnen zijn als tijdens de groei niet veel anders ontstond dan het enzymsysteem om penicilline te maken en dat daarna de cellen zich gingen gedragen als een, zij het gecompliceerd, enzympreparaat. Dat zal wel nooit geheel worden bereikt, maar er is nog wel ruimte voor verbetering. De ontwikkeling van de technologie gaat uiteraard ook voort. De knelpunten moeten worden geïdentificeerd en opgeheven.

Reeds is gewezen op het noodzakelijke evenwicht tussen suikertoeloop, beluchting en afvoer van warmte. Beschikt het bedrijf over voldoende capaciteit om meer lucht te kunnen toevoeren, dan is dat alleen mogelijk door tegelijkertijd de koelcapaciteit te verhogen, bijvoorbeeld door toepassing van geforceerde koeling. Nagegaan moet

dan worden of de investeringskosten zullen worden goedgemaakt door de te verwachten hogere opbrengst aan eindprodukt.

De microbiologische processen zouden in verband met de benodigde koeling economischer kunnen worden uitgevoerd als ze bij een hogere temperatuur konden verlopen. In de meeste gevallen vertonen de processen echter een vrij scherp temperatuursoptimum. Dit ontwikkelingsprogramma kan een microbioloog niet alleen bewerken. Het is, zoals zoveel, groepswerk. De geneticus en de biochemicus zijn nodig. Het zijn mensen die nog min of meer dezelfde taal spreken als de als zodanig opgeleide microbioloog. Bij de ontwikkeling van de technologie moeten de chemisch en de fysisch technoloog hulp verlenen. Bij een gegeven stam en kennis van de biosynthese blijken de meeste problemen, waarvan de oplossing nodig is om te komen tot een optimaal resultaat, vooral te liggen op het gebied van warmte- en massaoverdracht, het gebied van de fysisch technoloog.

Geschiedde veel van het ontwikkelingswerk nog niet zoveel jaren geleden op empirische wijze, vandaag kunnen we gebruik maken van mathematische modellen en computersimulatie; een dynamisch ontwikkelingsproces waarvan het eind nog niet te zien is. En dat geldt mutatis mutandis voor alle fermentatieprocessen die zijn genoemd. Zelfs reeds lang uitgevoerde processen als de bereiding van bakkersgist profiteren nog van dit type ontwikkelingswerk.

Semi-synthetische penicillines

Nog een enkel woord over de uitbreiding van de penicilline-industrie door de semi-synthetische penicillines. De meeste produktiestammen vormen, wanneer geen precursor als fenylazijnzuur wordt toegevoegd, een hoeveelheid van de kern, van 6-aminopenicillaanzuur (6-APZ). Wordt deze verbinding geïsoleerd, dan kunnen langs chemische weg gemakkelijk allerlei nieuwe zijketens worden aangehecht. Aldus ontstaan vele nieuwe penicillines. Enkele van deze semi-synthetische penicillines zijn waardevolle geneesmiddelen gebleken (fig. 7). Ze hebben een bredere basis gegeven aan de penicillinebereiding. De vorming van 6-APZ in cultures is vrij gering. Gelukkig is het mogelijk gebleken de 'normale' penicilline met behulp van enzymen van andere micro-organismen als *E. coli*, te splitsen en zo betrekkelijk gemakkelijk 6-APZ te bereiden. Deze omzetting is er een van het derde type. Ook een chemische splitsing is mogelijk gebleken en wordt met hoge

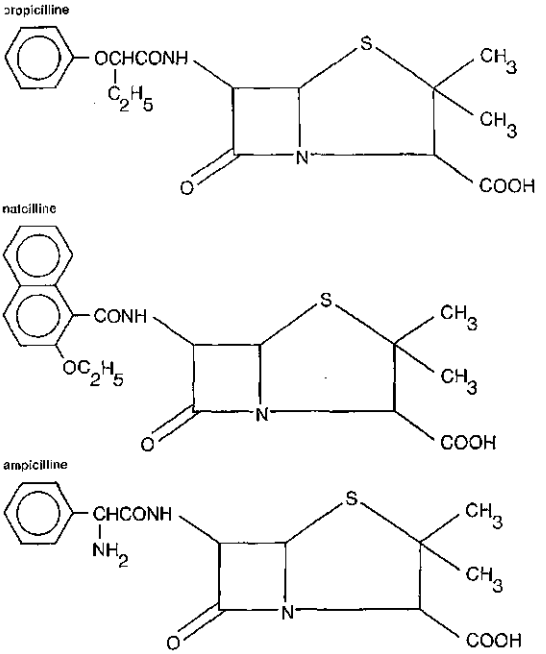


Fig. 7. Semi-synthetische penicillines.

rendementen toegepast. Omdat we bij de omzetting met micro-organismen te maken hebben met slechts één enzym is deze reactie een dankbaar object geworden voor het werken met enzymen op drager.

Toekomst

Het voorgaande beoogt de lezer iets te laten zien van de stand van zaken en de problemen bij het werken met micro-organismen in deze speciale tak van de procesindustrie. Zal de ontwikkeling hiervan doorgaan? De verwachtingen zijn positief. Micro-organismen zijn in staat tot synthese en omzettingen waarvoor de chemische industrie nog geen economische alternatieven heeft. Zijn die er wel, zoals bij ethanol en aceton, dan zullen toch de grondstofproblemen in de toekomst waarschijnlijk tot re-evaluatie van deze processen leiden. We zien weer belangstelling voor de microbiologische bereiding van aceton en butanol, een proces, dat reeds enige decennia geleden niet meer eco-

nomisch uitvoerbaar werd geacht.

Een zeer moeilijke chemische synthese is nu nog die van eiwit. De micro-organismen kunnen net als vele andere organismen anorganische stikstof (ammoniak) tot eiwit omzetten en daarbij uiteenlopende koolstofverbindingen als energiebron gebruiken; suikers, koolwaterstoffen, zelfs methaan en methanol. Het ziet er naar uit, dat in de toekomst veel eiwit langs deze weg zal worden gemaakt, zodat de micro-organismen een grote rol bij de vervaardiging van ons voedselpakket zullen kunnen gaan spelen. Er is voor de microbioloog alle reden deze toekomst met vertrouwen tegemoet te zien.

Plasmiden in bacteriën: enige fundamentele aspecten

W. P. M. HOEKSTRA

Inleiding

Het heeft lang geduurd voordat men, na de ontdekking van de microorganismen, inzicht heeft gekregen in de structuren die de erfelijke eigenschappen van de bacteriën bepalen. Onze inzichten daaromtrent zijn pas na 1945 ontwikkeld. De ontdekking van het verschijnsel *transformatie* bracht het inzicht dat DNA de chemische drager van de erfelijke substantie was. Fundamenteel fysico-chemisch onderzoek leerde vervolgens hoe DNA was gebouwd, terwijl met name de ontwikkeling van de elektronenmicroscopie inzicht gaf hoe het DNA in de cel gestructureerd is.

Een gangbare illustratie van een bacteriecel was een rechthoek, waarvan de zijden de cel-enveloppe voorstellen, en waarbinnen een in elkaar gedraaid kluwen DNA als 'kern'. Op dit, in zijn eenvoud bedrieglijke beeld bestaat een variant, waarbij het DNA-kluwen gehecht is aan een van de rechthoekzijden. De daarmee gesuggereerde associatie van 'kern' en cel-enveloppe heeft mogelijk fundamentele betekenis, zoals we zullen zien. Er wordt momenteel veel onderzoek gedaan dat ongetwijfeld zal leiden tot verfijning van het structurele beeld voor 'kern'-DNA en ook meer zal leren over de associatie van DNA met de cel-enveloppe.

Hoe het uiteindelijke beeld ook moge worden, het geschetste beeld geeft in ieder geval geen volledige weergave van de genetische structuur van elke bacteriecel, omdat niet is voorzien in de aanwezigheid van buiten de 'kern' gelegen genetische elementen, de zogenaamde plasmiden. Plasmiden zijn pas betrekkelijk recent ontdekt in de microbiologie. Het onderzoek naar aard en betekenis van bacteriële plasmiden is een van de hoekstenen der molekulaire biologie en heeft grote betekenis voor de microbiële ecologie.

Typen plasmide

F-factor

Een twintigtal jaren geleden reeds postuleerde de Engelse bacteriegeneticus Dr. Hayes dat de mannelijke variant van de stam *Escherichia coli* K12 zich zou onderscheiden van de vrouwelijke verschijningsvorm, doordat eerstgenoemde naast het 'kern'-DNA nog extra DNA, met zeer bijzondere eigenschappen zou bezitten. De briljante hypothese van Hayes diende om de verwarring die na de ontdekking van het verschijnsel conjugatie was ontstaan, op te lossen. Lederberg had ontdekt dat sommige stammen van de darmbacterie *E. coli* K12 genetische informatie met elkaar uitwisselden via contacten tussen twee cellen (*conjugatie*). De genetische analyses van recombinanten, uit dergelijke conjugatie-experimenten ontstaan, werden geïnterpreteerd in het licht van 'klassieke' genetische inzichten. De interpretaties bleken uitzichtloos complex. Hayes bracht licht in de zaak door aan te tonen dat er in het conjugatieproces sprake was van een donor-acceptor rolverdeling. De acceptorbacteriën zouden, zo veronderstelde hij, een ongecompliceerde genetische structuur bezitten. De donorbacteriën echter zouden extra aanwezige genetische informatie bezitten, die bepalend was voor het donorgedrag. De extra aanwezige informatie, genoemd sexfactor of F(ertiliteits)-factor zou volgens Hayes:

- in het algemeen aanwezig zijn in een van het chromosoom onafhankelijke vorm;
- soms ook in een, in het chromosoom, geïntegreerde vorm voorkomen;
- vanuit de onafhankelijke maar ook vanuit de geïntegreerde toestand overdraagbaar zijn. Overdracht zou geschieden via cel-celcontact met geschikte acceptorbacteriën.

Het is hier niet de plaats om uit te diepen hoe, met behulp van een genetisch element dat aan bovenvermelde drie condities voldoet, het conjugatieproces van *E. coli* en de daaruit voortvloeiende recombinatiegebeurtenissen globaal zeer bevredigend geïnterpreteerd kunnen worden. Laat ons volstaan met de vermelding dat het begrip *plasmide*, zoals de buiten het chromosoom gelegen genetische elementen weldra genoemd zouden worden, geboren was.

R-factor

De ontdekking van een ander type plasmide, het resistentie-plasmide, verdient een iets uitvoeriger bespreking. Weer gold dat de ontdekking van bepaalde microbiologische verschijnselen, in dit geval in de sfeer van de medische microbiologie, nieuwe inzichten bracht. Aan het einde van de vijftiger jaren werden de bacteriologen, met name in Japan, opgeschrikt door het feit dat bepaalde verwekkers van de dysenterie (*Shigella*-stammen) resistent bleken te zijn tegen meerdere antibiotica tegelijkertijd. Deze veelvoudig resistente stammen bleken zich zeer snel te verspreiden. Opvallend was voorts dat bij een patiënt soms, naast veelvoudig resistente *Shigella*-bacteriën, volledig antibioticum-gevoelige *Shigella*-bacteriën aanwezig bleken, en dat bij bepaalde patiënten soms ook *E. coli*-stammen met eenzelfde resistentiepatroon tegen antibiotica als dat van de *Shigella*'s aanwezig waren. Zeer verdienstelijk inspelend op de genetische kennis over microorganismen zoals die er toen was, verklaarde een aantal Japanse onderzoekers de gevonden verschijnselen door aan te nemen dat er een element in de veelvoudig resistente *Shigella*-stammen voorkomt:
- dat de genetische informatie voor resistentie tegen meerdere antibiotica bevat;
- dat onafhankelijk van het bacteriechromosoom voorkomt in de cel;
- dat door overdracht in dezelfde zin als bij de conjugatie, gekoppeld aan een replicatieronde, in staat is zichzelf te verspreiden.

Het moge duidelijk zijn dat met name de laatste veronderstelling een snelle verspreiding kan verklaren. Immers bij cel-celcontact tussen een resistente en een sensitieve cel wordt, door de koppeling tussen conjugatie en replicatie, vanuit de donor een kopie overgedragen en blijft de originele informatie toch behouden. Legt men voorts voor de overdracht geen soort-barrières aan – en tot op zekere hoogte kan dat – dan lijkt ook verspreiding tussen verschillende bacteriesoorten mogelijk. Tenslotte maken deze veronderstellingen plausibel dat naast elkaar voorkomen volledig gevoelige en veelvoudig resistente bacteriën, zonder noodzakelijke tussenvormen. Het postulaat dat sommige bacteriën beschikken over bijzondere genetische informatie die onafhankelijk van het 'kern'-DNA voorkomt en overdraagbaar is, kon opnieuw veel verklaren.

Overige plasmiden

Het is in de loop der jaren duidelijk geworden dat plasmiden, waarvan tot nu toe twee markante voorbeelden, de F-factor en de Resistentiefactor, zijn genoemd, vrij algemeen voorkomen. In tabel 1 is een indeling in plasmidesoorten gemaakt. Deze indeling is betrekkelijk willekeurig, maar heeft enige praktische waarde. De indeling is gebaseerd op herkenbare en uit praktisch oogpunt markante fenotypische eigenschappen van de plasmiden en daardoor weinig fundamenteel. Het feit dat, zoals we zullen zien, interacties tussen plasmiden mogelijk zijn

Tabel 1. Bacteriële plasmiden.
Men neemt vrij algemeen in de lijst van plasmiden volledigheidshalve ook een aantal defecte bacterievirussen op, die hun karakter als virus verloren hebben, maar nog steeds als replicon-DNA in een cel kunnen voorkomen. Dat is in deze tabel niet gedaan.

Typen	Markante eigenschappen
Conjugatie- of sexfactoren	coderen voor een overdrachtsysteem waarbij contact tussen twee cellen (voorbeeld F-factor)
Resistentiefactoren	coderen voor resistenties tegen antibiotica, soms ook tegen zware-metaalionen
Factoren voor de produktie van antibiotica, de zogenaamde bacteriocinogene factoren	coderen voor de produktie van eiwitten die toxisch zijn voor bepaalde microorganismen
Metabole of anabole factoren	coderen voor bijzondere metabole of anabole functies
Virulentiefactoren	coderen voor de produktie van eiwitten die toxisch zijn voor mens of dier
Mutatorfactoren	beïnvloeden de genetische stabiliteit van de cel
Gastheerspecificiteitsfactoren	beïnvloeden het herkenningsgedrag van de gastheercel ten opzichte van DNA dat, afkomstig van andere bacteriën, aan de gastheer wordt overgedragen
Cryptische plasmiden	al die plasmiden waarvan het bestaan als fysisch element vaststaat maar waarvan de eigenschappen niet bekend zijn

waardoor mengvormen kunnen ontstaan, bepaalt eens te meer het weinig fundamentele en willekeurige karakter van deze indeling.

Plasmide-gastheren

Plasmiden zijn ontdekt bij darmbacteriën, hun voorkomen is echter zeer algemeen. In tabel 2 is opgenomen een reeks van bacteriegeslachten waarin plasmiden zijn aangetroffen, of waarin plasmiden zich kunnen handhaven. Deze lijst is door R. Curtiss opgemaakt en rondgezonden in 1974 en zal ongetwijfeld in de toekomst worden uitgebreid (R. Curtiss III, 1974. Memorandum. Potential biohazards of recombinant DNA molecules).

Gelet op deze betrekkelijk algemene mogelijkheid voor plasmiden om zich in uiteenlopende gastheren te kunnen handhaven en gelet op de markante uiteenlopende eigenschappen die op plasmiden worden aangetroffen (tabel 1), zal het duidelijk zijn dat plasmiden in de microbiologie een grote betekenis toekomt.

Aantonen van plasmiden

Hoe kan men de aanwezigheid van een plasmide experimenteel aantonen wanneer men, op basis van bepaalde verschijnselen, de aanwezigheid van een buiten het chromosoom gelegen element vermoedt?

In principe bestaan daartoe twee nogal verschillende methoden: een directe, fysische, methode en een indirecte, genetische, methode. Bij de directe methode gaat men steeds over tot isolatie van DNA uit de cel en bepaalt men vervolgens of er, naast 'kern'-DNA nog ander DNA aantoonbaar is. Men gaat dus, in het algemeen langs fysico-

Tabel 2. Genera waarin plasmiden zijn gevonden of waarin plasmiden kunnen voorkomen.

Achromobacter	*Bacillus*	*Hafnia*	*Rhizobium*
Aerobacter	*Bartonella*	*Klebsiella*	*Salmonella*
Aeromonas	*Chromobacterium*	*Micrococcus*	*Serratia*
Agrobacterium	*Citrobacter*	*Neisseria*	*Shigella*
Alkalescens	*Clostridium*	*Paracolobactrum*	*Staphylococcus*
Arthrobacter	*Enterobacter*	*Proteus*	*Streptococcus*
Bacteroides	*Erwinia*	*Providencia*	*Streptomyces*
Bacterium	*Escherichia*	*Pseudomonas*	*Vibrio*
			Yersinia

chemische weg, de aanwezigheid van een fysisch autonoom element bewijzen. Bij de indirecte methode maakt men gebruik van de replicatie-autonomie van het plasmide. De mogelijkheid tot zelfstandige replicatie is een wezenlijk kenmerk van een plasmide; een plasmide is in feite een replicon (eenheid van replicatie). Doordat ieder plasmide een zelfstandig replicerende structuur is, kan men plasmide-DNA genetisch onderscheiden van andere replicons (zoals de 'kern') of van niet-replicerende DNA-fragmenten. Langs de genetische weg, meer indirect, kan men soms bewijzen dat een aantal genetische kenmerken op een plasmide ligt, of in ieder geval sterke aanwijzingen daarvoor verkrijgen.

Bij de directe bewijsmethode zijn verschillende experimentele varianten: (1) Isolatie van DNA uit cellen zonder speciale voorzorgen, waarna vervolgens met behulp van een geschikte gradiëntcentrifugatie wordt bekeken of er naast het chromosomale DNA nog een satelliet-DNA band aanwezig is. Een satelliet-DNA band is alleen dan in een gradiënt aantoonbaar wanneer de cel plasmide-DNA bezit en dit DNA in bruto-samenstelling voldoende verschilt van het 'kern'-DNA. Om aan die laatste voorwaarde te voldoen moet men soms, als kunstgreep, het plasmide overdragen naar een nieuwe gastheer met 'kern'-DNA dat in bruto-samenstelling voldoende verschilt van het plasmide-DNA. Deze oudste methode is op de achtergrond geraakt en heeft plaats gemaakt voor een aantal meer geavanceerde technieken, waarvan genoemd moet worden: (2) de DNA-isolatie uit de cel, zodanig voorzichtig dat het plasmide-DNA in haar natieve vorm, als dubbeldradig circulair DNA, geïsoleerd wordt. Het, in vergelijking met het plasmide-DNA, reusachtig grote molekuul 'kern'-DNA breekt bij de gangbare methodieken en wordt niet meer als circulair DNA teruggevonden. Na deze verfijnde DNA-isolatie kan men plasmide-DNA betrekkelijk eenvoudig, na alkalische denaturatie van het gebroken DNA of na toevoeging van ethidiumbromide, scheiden van het 'kern'-DNA in een ultracentrifuge. Deze methode vereist dus geen verschil in samenstelling tussen DNA-molekulen, maar lijkt minder goed toepasbaar voor grotere plasmidemolekulen.

Na de isolatie van het plasmide-DNA is dit DNA steeds gekarakteriseerd als dubbeldradig circulair DNA met een molekulair gewicht dat varieert van ruim 10^6 tot 10^8 daltons. Plasmidemolekulen zijn dus in vergelijking met 'kern'-DNA-molekulen als zeer klein tot betrekkelijk klein te karakteriseren.

Alvorens enige van de gangbare indirecte methoden om plasmiden aan te tonen, te beschrijven, is het gewenst enkele facetten van de plasmide-replicatie te vermelden. Allereerst, zoals we later nog zullen toelichten: plasmiden repliceren zelfstandig, zij het niet geheel onafhankelijk van de replicatiemachinerie die iedere cel bezit. Er is dus een zekere replicatie-autonomie. Op de tweede plaats, na de replicatie van het plasmide-DNA, vindt de segregatie van dit plasmide-DNA plaats. Met uitzondering misschien voor de zeer kleine plasmiden, vindt plasmide-segregatie plaats in coördinatie met de segregatie van het 'kern'-DNA, zodat iedere dochtercel gelijkwaardig erft. Dit strakke coördinatieschema faalt wel eens, waardoor in die gevallen waar slechts één à twee plasmidemolekulen per chromosoom aanwezig zijn, in een populatie af en toe dochtercellen worden afgeworpen zonder plasmide. Er zijn een aantal agentia bekend (zogenaamde curing-agents) die, doordat ze interfereren met de plasmide-replicatie, het afwerpen van plasmideloze dochters stimuleren.

Het terugvinden nu van vitale dochtercellen, al dan niet na 'curing', die eigenschappen missen die gedacht worden gelegen te zijn op een plasmide, is een sterke aanwijzing dat deze eigenschappen inderdaad op een plasmide zijn gelegen. Zeker wanneer het gaat om het verlies van een serie eigenschappen in één stap, lijkt het welhaast zeker dat een plasmide de drager was van de verschillende eigenschappen. Immers irreversibel verlies van een reeks chromosomale eigenschappen kan niet anders dan door een deletie (ontbreken) in het chromosoom. Deleties treden in het algemeen weinig frequent op en geven vrijwel steeds, zeker als het gedeleteerde gebied een zekere omvang heeft (meerdere genen omvat), aanleiding tot verlies van vitaliteit.

De zelfstandige replicatie van de plasmiden opent in principe de mogelijkheid om de replicatie van het plasmide te beïnvloeden zonder de chromosomale replicatie te treffen. In feite gebeurt zoiets in de 'curing'-experimenten, terwijl ook op genetische basis iets dergelijks mogelijk blijkt. Er zijn bacteriemutanten bekend die, bij een verhoogde kweektemperatuur bijvoorbeeld, dochtercellen afwerpen waarin bepaalde eigenschappen, waarvan werd vermoed dat ze op een plasmide waren gelegen, ontbreken. Het gaat hier om mutanten waarbij de plasmidereplicatie bij verhoogde temperatuur specifiek wordt geremd. Isolatie van mutanten met gestoorde plasmidereplicatie is een uniek hulpmiddel, niet alleen voor het bestuderen van de plasmidereplicatie, maar ook voor de bewijsvoering dat bepaalde eigenschap-

pen gelegen zijn op een plasmidemolekuul.

Na overdracht van genetische kenmerken (door conjugatie, transductie òf transformatie) is het lot van de overgedragen kenmerken sterk afhankelijk van het feit of zij deel uitmaken van een plasmide dan wel van een 'kern'-DNA-fragment. Op deze basis zijn ook een aantal genetische methodieken geënt, waarmee is uit te maken of er een plasmide aanwezig is.

Wanneer genetische eigenschappen die gelegen zijn op het chromosoom, worden overgedragen naar een andere cel, dan ontstaat daardoor een partieel diploïde cel met een toegevoegd DNA-fragment. Dit DNA-fragment is geen replicon en kan zich in de cel alleen maar handhaven nadat het ingebouwd is in het chromosoom van de ontvangende cel. Ook overdracht van een plasmide levert een partieel diploïde cel, waarin echter het overgedragen DNA, een replicon immers, zich kan handhaven. Door nu ontvangende cellen te kiezen waarin inbouw in het bacteriechromosoom niet mogelijk is (zogenaamde recombinatie-deficiënte ontvangende cellen) zullen alleen de eigenschappen die op een plasmide zijn gelegen zich na overdracht kunnen handhaven. Door te beschikken over overdrachtsystemen en over recombinatie-deficiënte acceptorstammen kan men snel uitmaken of bepaalde genetische eigenschappen op een plasmide dan wel op het chromosoom liggen.

Wanneer men genetische overdrachtsystemen voor plasmide-DNA en chromosomaal DNA kent, wordt ook wel een radiobiologische methode gebruikt om tot bovengenoemd onderscheid te komen. Men bestraalt het over te dragen DNA, chromosomaal dan wel plasmidaal van aard, met ultraviolet licht. Chromosoom-DNA en ook plasmide-DNA lopen daarbij stralingsschade op. Het plasmide-DNA verliest daarbij gedeeltelijk zijn biologische activiteit, hetgeen na overdracht blijkt. Het beschadigde chromosoom-DNA wordt echter door, een nu zelfs verhoogde, integratie in het chromosoom van de (onbeschadigde) acceptorcel gered als biologisch actief materiaal. Men heeft deze grotere stralingsgevoeligheid van over te dragen plasmide-DNA in vergelijking met de gevoeligheid van over te dragen chromosomaal DNA, voldoende vaak waargenomen om dit verschijnsel als onderscheidend criterium te kunnen gebruiken.

Tenslotte wat betreft de indirecte genetische methoden: sommige plasmiden kunnen niet in een en dezelfde gastheer coëxisteren. Beschikt men over overdrachtstechnieken en over ontvangende cellen

die plasmidedrager zijn, dan kan men uit een optredende incompatibiliteit van bepaalde overgedragen kenmerken in een bepaalde acceptorcel, aanwijzingen putten dat deze kenmerken op een plasmide zijn gelegen.

Een bijzonder elegante combinatie van genetische en fysische technieken is de aantoning van plasmiden via de minicellen. Er zijn mutanten bekend bij de darmbacterie *E. coli* die niet normaal delen. Deze mutanten werpen bij iedere deling 'kern'loze dochters af. Deze 'kern'loze cellen zijn kleiner dan de volwaardige cellen en als minicellen betrekkelijk eenvoudig in een centrifugaal veld te scheiden van de grotere volwaardige dochters. Wanneer deze delingsmutanten plasmiden dragen, kan het voorkomen dat we bij de abnormale celdeling in de 'kern'loze dochtercellen wel een plasmide-replica krijgen. Het grote voordeel van het minicelsysteem, (dat niet in alle gevallen even effectief werkt) is zonder meer duidelijk: langs genetische weg wordt plasmide-DNA gescheiden van chromosoom-DNA, waardoor het fysisch (en ook fysiologisch) karakteriseren van het plasmide sterk wordt vereenvoudigd.

Verspreiding van plasmiden

Cellen die plasmiden bezitten zullen bij deling de plasmiden nauwkeurig doorgeven aan de dochtercellen, behoudens zeldzaam voorkomende afwijkingen in de coördinatie van de segregatie tussen 'kern'-DNA en plasmide-DNA. We hebben al gezien dat de oudst bekende plasmiden, de F-factor en bepaalde R-factoren, opvielen doordat ze zich bovendien konden verspreiden door overdracht via een conjugatieproces. Er zijn nogal wat plasmiden bekend die in staat zijn overdracht via conjugatie te regelen. Die plasmiden bezitten in ieder geval de informatie voor de synthese van sex-pili (haarvormige oppervlakteorganellen die een belangrijke rol spelen bij het paringsproces tussen twee cellen). Wanneer cel-celcontacten gevormd zijn, zijn ze bovendien in staat om te reageren op een, nog onbekende, prikkel, waardoor ze overgaan tot een zogenaamde *conjugatieve replicatieronde*. Bij de conjugatieve replicatieronde wordt een kopie van het plasmide, tijdens de replicatie, doorgestuurd naar de acceptorcel, terwijl de andere replica in de donorcel aanwezig blijft (zie figuur 1). Uiteenlopende plasmiden kunnen naast andere markante eigenschappen een conjugatie- of sexfactor bezitten. Zo zijn er overdraagbare R-factoren,

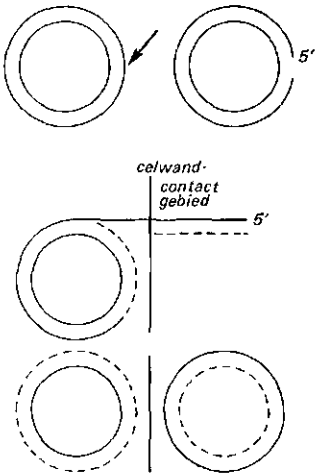


Fig. 1. Plasmide-replicatie tijdens de conjugatie. Nadat donor en acceptorcel contact zijn aangegaan, wordt het DNA van het overdraagbare plasmide door een nuclease op een speciale plek in een van de beide strengen doorgeknipt (aangegeven met pijl). Vervolgens wordt het plasmide, zeer waarschijnlijk in de nabijheid van het celwandgebied waar donor en acceptorcel met elkaar in contact staan, gerepliceerd. Daarbij wordt de doorgeknipte streng donor-DNA, met een 5'-OH-uiteinde voorop, al afrollende doorgestuurd naar de ontvangende cel. In de ontvangende cel wordt dan, naar men aanneemt, de complementaire streng gesynthetiseerd. Het resultaat van de conjugatieve replicatie is dus een donor met nog steeds een plasmidemolekuul en een ontvangende cel, verrijkt met een plasmide.

overdraagbare bacteriocinogene factoren, overdraagbare plasmiden met informatie voor suikervergistingen etc. Betekent dit dat alle plasmiden die geen sexfactor bezitten zich alleen maar via een oudernakomelingproces handhaven en verspreiden? Geenszins. Sommige niet-overdraagbare plasmiden kunnen door een tijdelijke associatie met een onafhankelijke sexfactor worden overgedragen. Andere plasmiden kunnen door een transducerende faag worden opgenomen en via transductie een andere gastheer bereiken. Tenslotte is het mogelijk dat plasmiden, in een vrije vorm als plasmide-DNA, in een transformatieproces worden opgenomen door nieuwe gastheren. Juist omdat transformatie een markante techniek vormt in de laboratoriumgenetica, is men mogelijk geneigd de betekenis van de transformatie in de biosfeer te onderschatten. Overdracht door transformatie is echter

ook in de natuur, buiten het laboratorium, een realiteit.

Een vraag die zich onmiddellijk voordoet ten aanzien van de plasmiden met een sexfactor, is die naar de grenzen in deze overdrachtwijze. Immers, na overdracht blijft een donorcel een donorcel en wordt een acceptorcel omgevormd tot een donorcel. Het vinden van cellen zonder conjugatieplasmide zou dus langzamerhand een zeldzaamheid moeten zijn. Nu is het weliswaar zo dat steeds vaker plasmidedragende cellen worden geïsoleerd, maar cellen zonder plasmide zijn nog steeds dominant. Een sleutel tot de oplossing van deze contradictie is wellicht dat het bezit van een plasmide zonder meer, voor de cel een overdreven luxe is. Een luxe waarvoor energetisch betaald moet worden. Cellen zonder plasmide zouden daarom een voorsprong kunnen hebben en houden. Deze situatie verandert natuurlijk drastisch wanneer het plasmide geen plasmide is zonder meer, maar bepaalde eigenschappen bezit die de cel een hogere overlevingskans geven. De cellen die een R-factor dragen zijn zeer snel dominant ten opzichte van de gevoelige cellen zonder plasmide in een situatie waarin door de aanwezigheid van antibiotica in het leefmilieu selectiedruk bestaat (zie Guinée, p. 196 en volgende).

Plasmidereplicatie

Een inventarisatie die voor verschillende plasmiden werd gemaakt over de afhankelijkheid van plasmidereplicatie van algemene cellulaire activiteiten (DNA-polymeraseactiviteit, DNA-initiatie, elongatiefactoren, eiwitsynthese etc.) heeft al duidelijk gemaakt dat er nogal wat verschillen in plasmidereplicatie bestaan. Beschouwen we de bacteriocinogene plasmiden, een groep waarvan vooral de colicinogene factoren goed zijn bestudeerd, dan zijn er toch, ondanks de verscheidenheid, wel enige betrekkelijk algemeen geldige conclusies mogelijk. We moeten daartoe onderscheid maken tussen de grote plasmiden (mol.gew. 60–100 $\times$ 10^6 dalton) en de kleine plasmiden (mol.gew. 1–10 $\times$ 10^6 dalton). De grote plasmiden bezitten, behalve informatie voor produktie van antibiotica, ook informatie voor een eigen overdrachtsysteem. De kleine plasmiden missen dit laatste. Voor zover bekend, hebben de grote plasmiden een andere reeks gastheer-factoren nodig dan de kleine. Bovendien bezit een gastheercel meestal slechts één à twee molekulen van het grote type plasmide per 'kern', terwijl er van de kleine plasmiden dikwijls 10 of meer kopieën per 'kern'

voorkomen. Er lijkt dus ook een karakteristiek verschil in de regulering van de replicatie tussen de grote en kleine plasmiden. We hebben er al eerder op gewezen dat voor de grote plasmiden, met het kleine aantal kopieën per 'kern', een zeer nauwkeurig strak gecoördineerd segregatieproces nodig is om iedere dochtercel een plasmide te laten erven. Voor de kleine plasmiden met het grote aantal kopieën lijkt er wat dat betreft geen probleem.

Voor de regulatie van de plasmide-replicatie, met name voor die plasmiden waarvan slechts één à twee exemplaren per chromosoom voorkomen, bestaan twee geheel verschillende modellen. Er is een model van Jacob et al. (1963), waarin gesteld wordt dat ieder replicon om te kunnen repliceren een associatie met het membraan aangaat. In de inleiding vermeldden we reeds het suggestieve beeld van de cel met daarin een kluwen-DNA gehecht aan de cel-enveloppe. Er zijn nogal wat experimentele aanwijzingen dat DNA-associatie met het celmembraan mogelijk is en dat deze complexen van DNA en membraan voor de replicatie van het DNA belangrijk zijn. Volgens het model van Jacob et al. zijn er slechts een beperkt aantal aanhechtingsplaatsen voor de replicons. Plasmiden van een en dezelfde soort of verwante plasmiden bedienen zich van een zelfde aanhechtingsplek. Tijdens de celcyclus verdubbelt de cel, zo veronderstelt men, de aanhechtingsplaats en wordt tegelijkertijd het aangehechte replicon gerepliceerd. Bij de deling, door het aanhechtingsvlak, wordt zodoende aanhechtingsplaats plus plasmidekopie verdeeld over beide dochters. In dit model is de vermelde incompatibiliteit van verwante of identieke plasmiden fraai te verklaren. Identieke of verwante plasmiden behoeven immers dezelfde aanhechtingsplaats, zij zullen elkaar dus verdringen.

Een ander model voor de replicatie-regulatie is afkomstig van Pritchard et al. (1969). Daarbij wordt gesteld dat de replicatie gereguleerd wordt door een plasmide-specifieke cytoplasmatische repressor. Tijdens de cel-cyclus zou, door de optredende volumeverandering, de concentratie aan repressor regelmatig toe- en afnemen. Op die basis zou regelmatig de replicatie uit- en ingeschakeld kunnen worden. Onmiddellijk na de replicatie is er betrekkelijk veel remstof. Men neemt namelijk aan dat de remstof onmiddellijk na de plasmide-replicatie wordt gesynthetiseerd. Daardoor staat na een replicatieronde de replicatie stil. Uitgroei van de cel doet de remstofconcentratie dalen, waardoor een nieuwe replicatie optreedt etc. etc. Het is ook via dit model te verklaren dat er van identieke of verwante plasmiden niet te veel

in een cel kunnen. Er zou daardoor immers een grote concentratie van dezelfde remstof optreden, waardoor replicatie lange tijd geremd wordt. Pas na, willekeurige, segregatie is een toestand denkbaar, waarin de remstofconcentratie daalt beneden de grensconcentratie voor de replicatie.

We mogen voor de naaste toekomst verwachten dat het inzicht in de replicatie van plasmiden zal toenemen. Deze verwachting is gebaseerd op de betrekkelijk recente isolatie van plasmide-mutanten die in vergelijking met het oudertype excessief veel kopieën per 'kern' vormen. Deze mutanten met afwijkende replicatie-regulatie zullen bij nadere analyse bijdragen tot meer inzicht.

Om te illustreren hoe onzeker toch onze uitspraken over de plasmidereplicatie, haar regulatie en haar samenhang met het membraan, zijn, vermeld ik de zeer recente vondst van Klint en Miller (1975). Deze auteurs vonden bij zeer voorzichtige DNA-isolaties het DNA van de sexfactor gebonden aan het 'kern'-DNA van *E. coli,* los van het bacteriemembraan. Dit resultaat werpt toch weer een ander licht op de kwestie van replicatie-autonomie, replicatie-regulatie en de relatie van de sexfactor van *E. coli* met de membraan.

Interactie tussen plasmiden

Op verschillende plaatsen is er al op gewezen dat plasmiden elkaar in de cel kunnen verdringen. Zeker wanneer het gaat om identieke of verwante plasmiden is dat het geval. Behalve deze negatieve divergerende interactie tussen twee replicons, waarvan men voor het clasificeren van plasmiden wel gebruik maakt, kennen we ook een meer associatieve reactiemogelijkheid tussen twee replicons.

Een voorbeeld daarvan is, min of meer impliciet, al genoemd toen de F-factor besproken werd. Vermeld werd daar dat de F-factor, behalve als autonoom plasmide, ook geïntegreerd in het gastheerchromosoom kon voorkomen. Integratie van plasmiden in het chromosoom, meestal daar waar mogelijk DNA-homologie met delen van het plasmide-DNA bestaat, maakt het plasmide minder autonoom. De replicatie van het plasmide is dan absoluut afhankelijk geworden van de replicatie van de gastheer. Toch is van de andere kant, bijvoorbeeld in het geval van de geïntegreerde sexfactor, expressie van een deel van de plasmide-eigenschappen mogelijk. Een geïntegreerde sex-

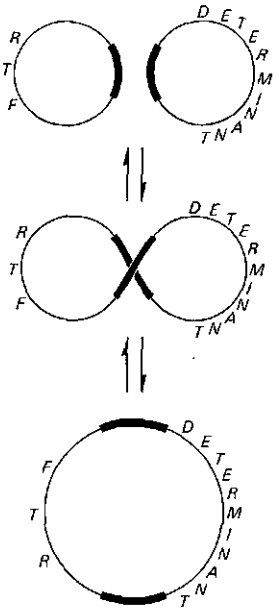


Fig. 2. Recombinatie tussen replicons. Twee replicons kunnen, op basis van homologieën in de DNA-molekulen, met elkaar recombineren in het gebied waar de homologie bestaat (in de figuur dik aangegeven). Deze recombinatie is reversibel (zoals de dubbele pijlen aanduiden). Het voorbeeld in deze figuur is dat van een recombinatie tussen een resistentietransferfactor (RTF) zonder resistentiedeterminanten, en een replicon dat niet overdraagbaar is, maar wel resistentiedeterminanten draagt. Een dergelijke recombinatie leidt tot het ontstaan van een overdraagbaar resistentieplasmide. Dit is een van de vormen van plasmide-mobilisatie (zie ook Guinée, p. 196 en volgende).

factor stuurt nog steeds een genetische overdracht, waarbij nu echter, als gevolg van de associatie met het chromosoom, chromosomaal DNA wordt meegenomen bij de overdracht. De associatie tussen replicons, ontstaan door een recombinatiegebeurtenis als geïllustreerd in figuur 2, is niet altijd zeer stabiel. De associatie kwam tot stand door homologie. De homologie in de structuur van de recombinant biedt de mogelijkheid om weer terug te vallen in de oorspronkelijke gedissocieerde situatie.

Soms vindt de dissociatie niet plaats op de legale manier, dat wil zeggen niet volgens de 'wet' van homologieën. Illegale paring, bijvoor-

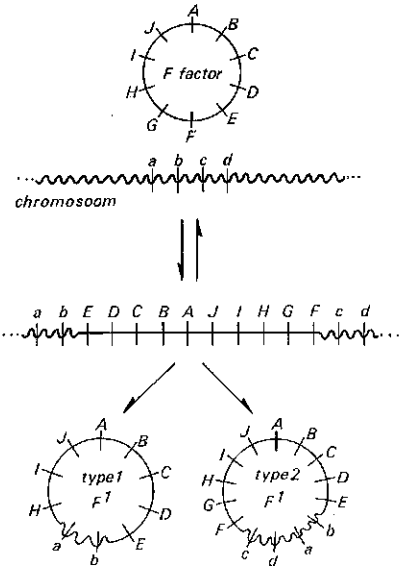


Fig. 3. Vorming van nieuwe plasmiden. Interactie tussen een F-factor en het bacteriechromosoom kan leiden tot integratie van de F-factor in het bacteriechromosoom. De integratie is een reversibel proces. Soms echter vindt het uittreden van de geïntegreerde sexfactor op een illegale manier plaats en wordt een nieuwe F-factor gevormd, voorzien van bacterieel chromosomaal DNA en F'-factor genoemd. In principe zijn er twee soorten F'-factoren: één waarbij de F-factor alleen maar verrijkt wordt na uittreding (type 2), en één waarbij verlies van F-factor-DNA naast winst aan chromosomaal DNA optreedt (type 1).

beeld in een chromosoom met een geïntegreerde sexfactor, kan leiden tot dissociatie van een sexfactor uit het chromosoom met meenemen van een deel van het chromosoom. Soms verliest de sexfactor daarbij een deel van zijn DNA, soms ook verrijkt de sexfactor zich enkel met chromosomaal DNA. Sexfactoren met chromosoom-DNA verrijkt, worden F-primefactoren genoemd en het ontstaan van verschillende typen F-primes is geïllustreerd in fig. 3.

Het moge duidelijk zijn dat de associatie en 'illegale' dissociatie tussen verschillende plasmiden de weg opent tot het ontstaan van nieuwe soorten plasmiden. Sommige auteurs menen dan ook dat uitgaande van een oerplasmide, een elementair virusdeeltje misschien, door interactie met chromosomen allerlei genetische eigenschappen,

die oorspronkelijk van chromosomale aard waren, op een plasmide zijn terecht gekomen. In hoeverre dit beeld juist is als enig beeld voor de evolutie van plasmiden, laten we onbesproken. De eigenschappen van de plasmiden zoals we ze nu kennen, laten een dergelijke theorie echter wel toe.

Slotopmerkingen

De ontdekking van plasmiden in micro-organismen een twintigtal jaren geleden heeft geleid tot vrij uitgebreide studies over de buiten het chromosoom gelegen genetische informatie. De redenen daartoe zijn steeds enigermate ambivalent geweest. Enerzijds was dat het grote ecologische of in bepaalde gevallen grote epidemiologische belang van de plasmiden. Anderzijds is in molekulair-biologische kringen het plasmide, als voorbeeld van een betrekkelijk klein DNA-molekuul snel populair geworden. Plasmiden zijn reeds in vele bacteriële genera aangetoond (zie tabel 2) en hun voorkomen bij bacteriën zou eerder regel dan uitzondering kunnen zijn. Het lijkt dus gewenst om in alle takken van de microbiologie, en niet uitsluitend in de microbiële genetica, attent te zijn op de aanwezigheid van plasmiden. Het is vanuit die overtuiging dat in het voorafgaande, weliswaar in kort bestek, de fundamentele eigenschappen van de plasmiden zijn beschreven.

Praktische betekenis van resistentie- en virulentieplasmiden bij Enterobacteriaceae

P. GUINÉE

Enterobacteriaceae

De familie der Enterobacteriaceae omvat een aantal bacteriegeslachten, die vooral in de darm bij mens en dier voorkomen. De drie genera die in dit hoofdstuk aan de orde komen zijn *Salmonella*, *Shigella* en *Escherichia coli* (*E. coli*) (tabel 1).

Het genus *Salmonella* omvat ongeveer 1500 zogenaamde serotypen, die door middel van serologische methoden van elkaar kunnen worden onderscheiden. Ieder serotype heeft op zijn celwand en zweepdraden één of meer antigene componenten die specifiek zijn voor dat serotype. De antigene componenten op de zweepdraden noemt men H-antigenen, die op de celwand O-antigenen. Een enkele maal wordt het O-antigeen omgeven door een soort kapselantigeen, dat wordt aangeduid met de term K-antigeen.

Ofschoon alle (sero)typen in principe ziekteverwekkend zijn voor mens of dier, treden enkele typen in dit opzicht duidelijk op de voor-

Tabel 1. Een gedeelte van de familie van de Enterobacteriaceae (darmbacteriën).

Genus	Serotypen	Ziektebeeld
Salmonella	*S. typhi,*	buiktyfus
1500 serotypen	*S. paratyphi B,*	paratyfus
	S. typhimurium	
	en vele andere	diarree
Shigella		dysenterie
Escherichia	pathogene colistammen	diarree
	niet-pathogene stammen (normale darmbewoners)	geen

grond, met name *S. typhi* en *S. typhimurium*. *S. typhi* is de verwekker van tyfus bij de mens. Deze ziekte komt in de laatste decennia in West-Europa minder voor dan vroeger. Het ziektebeeld dat hierop enigszins gelijkt heet paratyfus en wordt veroorzaakt door de serotypen *S. paratyphi A, B* en *C*. De overige *Salmonella*-serotypen veroorzaken bij de mens in principe alleen maag-darmstoornissen, welke worden aangeduid met de term 'andere salmonellosen', doch in de niet-wetenschappelijke pers ten onrechte vaak eveneens paratyfus worden genoemd.

Het serotype dat in Nederland het meest frequent als oorzaak van andere salmonellosen wordt geïsoleerd is: *S. typhimurium*.

Shigella veroorzaakt eveneens darmontsteking en wel bij dé mens. Shigellose komt in West-Europa betrekkelijk weinig voor, wel in Oost-Europa, Azië, Zuid- en Midden-Amerika.

E. coli omvat een groot aantal serotypen, waarvan sommige ziekten verwekken bij de mens, andere bij diverse diersoorten en de overige als commensalen voorkomen in de normale bacteriële darmflora bij mens en dier.

Darmstoornissen als gevolg van de infectie met een der bovengenoemde bacteriën komen in het algemeen het meest frequent voor bij kinderen en bejaarden.

Overdraagbare resistentie

In principe zijn infecties door genoemde Enterobacteriaceae goed te genezen door middel van antibiotica. Het feit dat deze bacteriën resistentiekenmerken tegen antibiotica kunnen dragen en soms ook kunnen overdragen, is daarom van grote praktische betekenis.

Ofschoon de overdraagbare resistentie tegen antibiotica (R-factoren) voor het eerst bij *Shigella* werd ontdekt en wel door Japanse onderzoekers, zullen wij ons verder beperken tot *Salmonella* en *E. coli*.

Resistentie tegen antibiotica bij *Salmonella* en *E. coli* wordt als regel teweeggebracht door R-factoren. Dit is gebleken uit de waarneming dat de resistenties kunnen worden overgedragen, dan wel gemobiliseerd kunnen worden met behulp van overdraagbare plasmiden (zie Hoekstra, dit boek).

Een uitzondering op deze regel vormt in een aantal gevallen de resistentie tegen streptomycine en sulfonamiden. Wanneer wij dus een overzicht geven over de resistentie bij *Salmonella* en *E. coli*, duiden

wij in feite op de verbreiding en daarmee op de praktische betekenis van R-factoren bij deze bacteriegeslachten.

Resistentieplasmiden bij E. coli

Zoals reeds eerder gezegd, is *E. coli* enerzijds een normale darmbewoner bij mens en dier, terwijl bepaalde serotypen van *E. coli* ziekten kunnen veroorzaken bij mens en dier.

Ontwikkeling van resistentie

Het zogenaamde niet-medisch gebruik van antibiotica verdient enige bespreking, omdat dit gebruik grote invloed heeft op de commensaal *E. coli.*

De antibiotica en chemotherapeutica werden primair ontwikkeld ter bestrijding van infectieziekten bij de mens en bij het dier. Min of meer bij toeval ontdekte men in 1946 dat kleine hoeveelheden antibiotica, in de orde van 5–20 mg per kg voer, in staat waren de groei van dieren te bevorderen, dat wil zeggen dat door middel van minder kilo's voer in kortere tijd meer kilo's vlees konden worden geproduceerd. Aangezien de vraag naar dierlijk eiwit in die tijd sterk toenam, nam deze vorm van gebruik van antibiotica in het voer een zeer grote vlucht, hetgeen mede geleid heeft tot de huidige vorm van dierlijke eiwitproduktie in de bio-industrie. Tegelijkertijd werd de veehouderij intensiever, dat wil zeggen: op een kleiner oppervlak werden meer dieren bijeengebracht, wat gepaard ging met een groter gevaar voor ziekte en slechte hygiëne. Deze besmettingsproblemen konden op hun beurt weer uitstekend met antibiotica worden bestreden, in profylactische dosering en veelal massaal toegediend.

Betrekkelijk kort na de invoering op grote schaal van het gebruik van antibiotica voor voederdoeleinden, met name tetracycline, bleek dat de *E. coli*-flora snel résistent werd. Varkens enige tijd gevoerd met 20–100 mg tetracycline per kg voer, scheidden alle een hoog percentage tetracycline-resistente *E. coli* uit. Naarmate het gebruik van antibiotica in veehouderij en bio-industrie intensiever en geschakeerder werd, waarbij de grenzen tussen nutritief, profylactisch en therapeutisch niet altijd even scherp afgetekend waren, nam het aantal dieren dat multiresistente *E. coli* uitscheidde, steeds verder toe. Momenteel is het zo, dat vrijwel alle dieren, met name varkens en kal-

veren, tetracycline-resistente *E. coli* dragen en uitscheiden en veel dieren multiresistente *E. coli* bezitten.

Deze ontwikkeling dateert vanaf de vroege vijftiger jaren. In de zestiger jaren werd duidelijk dat R-factoren voorkomen bij *Shigella* en *Salmonella*, en al gauw bleek, dat ook de resistentie van *E. coli* die bij dieren in de normale flora werd geselecteerd, eveneens door R-plasmiden werd gecodeerd.

Ook bij de mens is een toename van resistente *E. coli* in de normale darmflora geconstateerd, deels wellicht als gevolg van de selectie van resistente *E. coli* bij vleesproducerende dieren, deels als gevolg van het therapeutisch gebruik van antibiotica bij patiënten. Men dient hierbij te bedenken dat R-plasmiden veelal voor meer dan één resistentie coderen, of met andere woorden dat bijvoorbeeld zes verschillende resistentie-determinanten op één R-factor gelegen kunnen zijn. Behandeling of toepassing van één antibioticum zal in dit geval resulteren in de selectie van resistentie tegen zes verschillende antibiotica.

Nu komen vrijwel alle menselijke en dierlijke fecaliën, al of niet na zuivering in afvalwaterreinigingsinstallaties, uiteindelijk in het milieu, met name het oppervlaktewater, terecht. Het is dus niet verwonderlijk, dat men *E. coli* in grote aantallen uit water kan isoleren en dat een wisselend percentage ervan R-plasmiden bezit. Deze ontwikkeling heeft zich niet beperkt tot de *E. coli* als normale darmbewoner, doch ook de pathogene *E. coli* heeft een sterke resistentietoename getoond.

Overdraagbaarheid van resistentie

Resistentieplasmiden kunnen in het laboratorium, in vitro, betrekkelijk gemakkelijk worden overgedragen van R-factordragende donorstammen naar gevoelige acceptorstammen, zowel binnen als buiten de soort. R-plasmiden kunnen dus niet alleen van *E. coli* naar *E. coli* worden overgedragen doch ook naar *Salmonella* en *Shigella*, en omgekeerd van *Salmonella* naar *E. coli*.

Belangrijk in deze is de vraag in hoeverre deze overdracht ook mogelijk is in vivo, dus bijvoorbeeld in de darm van de mens of het dier, in hoeverre R-factoren door de resistente normale *E. coli*-flora kunnen worden overgedragen naar pathogene micro-organismen zoals *Salmonella* en *Shigella*. Indien een kiemvrij dier wordt besmet met een donor- en acceptorbacterie, is de overdrachtsefficiëntie bijna net zo hoog als die bij een kruising in vitro. Bij gewone dieren, die

dus zelf reeds een gecompliceerde darmflora bezitten, is R-overdracht eigenlijk alleen mogelijk indien door middel van antibiotica de aanwezige flora wordt teruggedrongen, waardoor tegelijkertijd de resistente donorstam wordt geselecteerd. De indruk bestaat, dat overdracht van resistentieplasmiden van *E. coli* naar pathogene *E. coli* in vivo wel optreedt, met name bij dieren, doch dat R-overdracht van *E. coli* naar *Salmonella* in vivo slechts incidenteel gebeurt. De bewijzen voor deze stelling ontbreken echter.

Resistentieplasmiden bij Salmonella

De resistentie tegen antibiotica bij *Salmonella* is in Nederland sinds 1959 bestudeerd. Alle op het Nationaal Salmonella Centrum ontvangen *Salmonella*-stammen werden onderzocht op hun gevoeligheid voor tetracycline, chloramfenicol en ampicilline, en indien daartoe aanleiding bestond, ook op de gevoeligheid voor kanamycine, streptomycine en sulfapreparaten.

Ongeveer 60% der onderzochte stammen behoort tot het serotype *S. typhimurium* en juist bij dit type trad de meest opvallende resistentieverandering op. *Salmonella* wordt serologisch getypeerd ter ondersteuning van de diagnose doch vooral om inzicht te krijgen in de wijze van verspreiding van *Salmonella*. In verband hiermee is het van belang de *Salmonella* zo goed mogelijk te karakteriseren. *S. typhimurium*, het serotype dat 60% der isolaties omvat, is verder onder te verdelen door middel van faagtypering. Door middel van een bepaald stel bacteriofagen kunnen reproduceerbare verschillen in faaggevoeligheid bij *S. typhimurium* worden aangetoond, op grond waarvan men deze indeelt bij een bepaald faagtype. Een bepaald faagtype van *S. typhimurium*, type 505, blijkt sinds een aantal jaren sterk te domineren bij de mens, in levensmiddelen van dierlijke oorsprong en bij slachtdieren. Dit faagtype wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een plasmide dat resistentie tegen tetracycline en soms tegen ampicilline veroorzaakt. Nu is tetracycline niet het meest geëigende middel voor de therapie van salmonellose. Een van de meest geeigende middelen is chloramfenicol. Voor dit middel blijkt ongeveer 98% der stammen gevoelig te zijn. Enerzijds moet men dus concluderen, dat R-factoren bij *Salmonella* sterk verbreid zijn, anderzijds, dat hun praktische betekenis echter niet zo erg groot is.

Dat in Nederland de situatie niet zo stabiel-gunstig is als zojuist

Tabel 2. Aantal geïsoleerde stammen van Salmonella typhimurium *faagtype 201 in Nederland. Tussen haakjes het percentage ten opzichte van het totaal aantal uit die bron en gedurende dat jaar geïsoleerde stammen van* S. typhimurium.

	1971	1972	1973	1974
Kalf en rund	1 (0,5%)	5 (3%)	89 (45,6%)	281 (71,9%)
Paard/pony	–		9	36
Varken	–		13 (2,2%)	33 (1,7%)
Overige dieren	–		12	43
Afvalwater	–		8	12
Mens	–		45 (0,9%)	37 (0,6%)

aangegeven, moge blijken uit het feit dat een bepaald faagtype van *S. typhimurium*, type 201, gekenmerkt door resistentie tegen tetracycline, chloramfenicol, kanamycine, ampicilline, streptomycine, sulfonamide en furazolidon sterk toegenomen is bij kalveren gedurende de laatste jaren (tabel 2). De infectie verloopt bijna steeds letaal, enerzijds omdat dit type zeer virulent blijkt te zijn, anderzijds omdat behandeling met medicamenten nauwelijks mogelijk is.

Bij *S. typhi* werden tot dusver nog geen R-plasmiden gevonden in Nederland. Dit is niet overal zo op de wereld. In Zuid- en Midden-Amerika komt reeds enkele jaren een groot aantal gevallen van tyfus voor die worden veroorzaakt door een multiresistente *S. typhi*-stam.

Virulentieplasmiden bij E. coli

Ontdekking

Bepaalde stammen van *E. coli* kunnen de oorzaak zijn van diverse ziektebeelden bij mens en dier. Een daarvan is een maagdarmstoornis, die gepaard gaat met hevige diarree en die dodelijk kan zijn doordat de patiënt teveel vocht verliest. Dit ziektebeeld komt onder andere voor bij het jonge varken en zal, als voorbeeld, wat uitvoeriger worden behandeld.

De meest uitgesproken vorm komt voor bij 1–2 dagen oude biggen en heeft vaak een letaal verloop. Tot het reeds lang bekende ziektebeeld van neonatale diarree behoren een waterdunne ontlasting en darminhoud. Bij gestorven dieren kunnen na autopsie grote aantallen *E. coli* uit het voorste deel der dunne darm gekweekt worden. Nor-

Tabel 3. Serotypen van Escherichia coli *geassocieerd met enterotoxemie bij biggen.*

Internationale benaming		Codering volgens Weybridge
O 138	K 81	E 57
O 138	K 81, K 88	G 491
O 139	K 82	E 4
O 141	K 85 ab.	E 68 type II
O 141	K 85 ab., K 88	E 68 type I
O 141	K 85 ac	E 145
O 147	K 89	
O 147	K 89, K 88	G 1253
O 149	K 91	
O 149	K 91, K 88	'Abbotstown'
O 8	K 87	G 7 (L−)
O 8	K 87, K 88	G 7 (L+), G 205
O 45 K?	K 88	
O 9	K 9	

maliter is dit deel der darm zeer arm aan *E. coli*. Vele van deze *E. coli*-bacteriën geven bij kweek op bloedbevattende voedingsbodems een β-hemolyse.

Serologisch onderzoek leerde dat de *E. coli*-bacteriën in deze kweken tot verschillende serotypen (OK-groepen, zie inleiding van dit hoofdstuk) behoorden, doch wel een thermolabiel kapselantigeen gemeenschappelijk hadden (K88) (tabel 3).

Deze twee eigenschappen, hemolyse en het bezit van K88, werden geruime tijd gebruikt om bij verdachte gevallen de diagnose te kunnen stellen, zonder dat de wijze waarop deze *E. coli*-stammen tot ziekte leiden, bekend was.

Hierin kwam verbetering toen men de beschikking kreeg over de 'ligated gut test' (L.G.T.) (onderzoek in afgebonden darmdelen). Bij deze test wordt het varken na 24 uur vasten onder narcose gebracht en wordt de buikwand chirurgisch geopend. De dunne darm wordt om de 10 cm afgebonden, waarbij de bloedvoorziening volledig in tact blijft. In de eerste lis wordt een verdachte cultuur gespoten, de tweede dient ter controle, in de derde wordt weer een cultuur gespoten, enz. De buikwand wordt gehecht. Na ongeveer 24 uur wordt het dier gedood en de dunne darm wordt losgemaakt van het darmscheil. In lissen ingespoten met pathogene stammen is een sterke ophoping van vocht ontstaan, dat qua samenstelling vrijwel identiek is met het vocht

dat ontstaat bij cholera bij de mens. De samenstelling ervan is gelijk aan die van bloedplasma, echter zonder eiwitten. Verder onderzoek leerde, dat een dergelijk effect niet alleen werd verkregen indien een levende bacteriecultuur werd ingespoten, doch ook indien een bacterievrij cultuurfiltraat werd ingespoten. Op deze wijze werd vastgesteld dat *E. coli* een toxinecomplex vormt dat, vanwege zijn werking op de darm (enteron), enterotoxine wordt genoemd.

Het enterotoxine bestaat uit twee componenten:

– een exotoxine, dat is een toxine afgescheiden buiten de bacteriecel, met een zekere mate van thermostabiliteit, een laag molekulair gewicht en niet immunogeen (ST)

– een endotoxine, een toxine dat binnen de bacteriecel blijft, thermolabiel, met hoog molekulair gewicht en immunogeen (LT).

Het LT is sterk verwant met cholerageen, dat is het door *Vibrio cholerae* gevormde enterotoxine dat verantwoordelijk is voor cholera bij de mens.

Uit recent onderzoek is gebleken dat het toxine zich hecht aan de gangliosiden in het darmepitheel en vervolgens op een nog onbekende wijze het enzym adenyl-cyclase stimuleert. Daardoor wordt adenosinetrifosfaat (ATP) omgezet in cyclisch adenosinemonofosfaat (c-AMP), met het gevolg dat elektrolyten en water uit de bloedbaan naar de darm worden afgescheiden.

Overdracht van de Ent-factor

De produktie van LT en ST bij de *E. coli* die bij varkens darmaandoeningen veroorzaakt, blijkt te worden gecodeerd door een plasmide, Ent genaamd. Het aantonen van de overdraagbaarheid van Ent nu stuit op het praktische bezwaar, dat geen directe selectie mogelijk is van acceptorcellen die de Ent-factor door conjugatie hebben ontvangen. De tot dusver gebruikte procedure is globaal als volgt. Als acceptor wordt een stam gebruikt die resistent is tegen een antibioticum, bijvoorbeeld nalidixinezuur, terwijl de donor er gevoelig voor is. Beide culturen worden gemengd onder omstandigheden die optimaal zijn voor conjugatie, en vervolgens enkele malen overgeënt in een medium met nalidixinezuur, waardoor de donor wordt geëlimineerd. Het resterende mengsel van acceptorcellen, Ent^+ of Ent^- van aard, wordt onderzocht op enterotoxine-vorming. Indien de uitslag positief is, worden individuele acceptorcellen (kolonies) op Ent^+-karakter getest.

Acceptorstammen die op deze wijze Ent$^+$ werden, waren weliswaar in staat een positieve reactie in de L.G.T. op te roepen, maar orale besmetting bij het levende proefdier resulteerde lang niet altijd in het opwekken van diarree. De Ent$^+$-bacteriën bleken niet in staat zich in voldoende mate te vermenigvuldigen in de dunne darm. Een belangrijke rol in deze blijkt te worden gespeeld door het K88-antigeen. Het K88-antigeen is een eiwit dat als fimbriae (haarvormige uitsteeksels van de bacterie) de celwand omkapselt en de bacterie in staat stelt zich aan de darmepitheellaag te hechten en zich te vermenigvuldigen ondanks de darmperistaltiek. Het enterotoxine kan dan eveneens voldoende adsorberen met de eerder beschreven gevolgen. De vorming van K88-antigeen wordt eveneens bepaald door een plasmide, waarvan de overdraagbaarheid op soortgelijke wijze werd aangetoond als die van de Ent-factor. Tenslotte bleek het hemolyserend vermogen (= de aanwezigheid van hemolysine) ook te worden gecodeerd door een plasmide (Hly). *E. coli*-stammen die het Hly-plasmide door overdracht hebben verkregen, zijn toxischer voor muizen dan Hly$^-$-stammen. Het is echter nog niet duidelijk welke rol het Hly-plasmide speelt bij de pathogenese van enterotoxemie bij het varken.

Het feit dat de virulentiekenmerken op plasmiden gelegen zijn, doet vermoeden dat men ze ook zal vinden bij stammen die niet behoren tot de eerdergenoemde 'klassieke enteropathogene serotypen'. Dit is inderdaad het geval, zoals is gebleken uit een onderzoek bij *E. coli*-stammen, die niet tot de klassieke typen behoorden, doch wel waren geïsoleerd bij biggen met enterotoxemie.

Volledigheidshalve dient te worden vermeld dat enterotoxische *E. coli*-stammen ook zijn ontdekt bij kalveren en bij de volwassen mens. In India, Vietnam, Bangladesh, en in toenemende mate in de Verenigde Staten zouden ze bij de mens voorkomen.

Het naast elkaar voorkomen van virulentie- en resistentieplasmiden

Een belangrijke vraag is die naar de wijze, waarop en de mate waarin plasmiden in het algemeen en resistentieplasmiden en virulentieplasmiden in het bijzonder binnen een bacterie(stam) naast elkaar kunnen bestaan.

Indien deze plasmiden tot verschillende compatibiliteitsklassen (vgl. Hoekstra, p. 180 e.v.) behoren, zullen zij zich naast elkaar binnen één bacteriecel kunnen handhaven. Indien de plasmiden tot dezelfde compatibiliteits-klassen behoren, zal wederzijdse uitsluiting optreden en één der plasmiden uit de cel verdwijnen, tenzij recombinatie optreedt zodat beide plasmiden tot één structuur worden. Men stelt zich voor, dat resistentieplasmiden die multiresistentie veroorzaken, door recombinatie zijn ontstaan uit kleinere monoresistentie-plasmiden. Momenteel zijn er geen gegevens over de compatibiliteit van resistentie- en virulentieplasmiden en over de mogelijkheid van recombinatie. Indien echter recombinatie zou optreden, zou het wapen der antibiotica geheel tegen zichzelf gekeerd worden, immers antibiotica in welke vorm dan ook, zouden dan (multi)resistente virulente bacteriën selecteren in plaats van elimineren.

Er is momenteel een duidelijke tendens waar te nemen tot matiging van gebruik van antibiotica in het algemeen, doch met name in veevoer als groeibevorderaars en voorkomers van ziekte. Economische motieven pleiten tegen deze matiging, microbiologisch-toxicologische motieven ervoor.

De microbiologische motieven ten gunste van deze matiging zouden aan kracht winnen indien langs microbieel-genetische weg aangetoond zou worden, dat recombinatie tussen resistentie- en virulentieplasmiden in vitro mogelijk, en in vivo te verwachten is.

Microbiologie in de toekomst

A. RÖRSCH

Futurologie

Het nut van vooruitzien zal niemand bestrijden. Het is in verscheidene spreekwoorden en gezegden vastgelegd. In het algemeen tonen wetenschapsbeoefenaars echter grote weerstand om een toekomstverwachting te geven. Sommige onderzoekers, in het bijzonder zij die op fundamenteel niveau werkzaam zijn, maken zelfs nog wel bezwaar tegen de voorschriften van de stichtingen van de Nederlandse Organisatie voor Zuiverwetenschappelijk Onderzoek (ZWO). Deze bepaalden dat de stichtingen in december 1974 een werkplan moesten opstellen dat pas in januari 1976 zou worden uitgevoerd. Hoewel een dergelijke recalcitrantie in deze tijd, gekenmerkt door een schaarste aan financiële middelen, maar ook door nog schier onbegrensde mogelijkheden om de wetenschap vooruit te brengen, niet meer wordt gewaardeerd, is er voor de scepsis, die er uit spreekt, wel de nodige aanleiding.

Wanneer Arthur Kornberg in 1956 uit *Escherichia coli* een enzym isoleert dat desoxyribonucleoside-trifosfaten met DNA als matrijs tot een polynucleotide aaneen breit, denkt men dat de ontsluiering van het geheim van de DNA-replicatie voor het grijpen ligt. Terecht wordt hem enige jaren later de Nobelprijs uitgereikt. Toch blijft de voortgang van het onderzoek in de daaropvolgende tien jaren beneden de verwachting. Het Kornberg-enzym raakt tegen het eind van de jaren '60 zelfs weer geheel uit de gratie. De Lucia & Cairns (1969) isoleren dan van *E. coli* een mutant die dit enzym mist en niettemin vlijtig en nauwkeurig zijn DNA repliceert. Het tijdschrift Nature gaat zo ver dat het Kornbergs enzym een 'red herring' (loos alarm) noemt. Nu denken wij daar toch weer anders over. Het proces van DNA-replicatie blijkt veel gecompliceerder te zijn dan aanvankelijk werd verwacht en nauw samen te hangen met andere macromolekulaire processen zoals recombinatie en herstel van stralingsschade. De tijd is nu weer

rijp voor de herwaardering van het Kornberg-enzym. Niemand zou deze gang van zaken in 1956 hebben kunnen voorspellen. De wetenschap schrijdt voort door een accumulatie van kennis, op basis waarvan periodiek een nieuwe conceptie voor een deelgebied wordt opgesteld, die dan weer als leidraad geldt voor het daarop volgende experimentele werk.

In de wetenschapsfilosofie noemt men dit een paradigma. Nieuwe paradigma's hebben soms het karakter van ware revoluties (Kuhn, 1971). Aangezien revoluties en de gevolgen daarvan op lange termijn per definitie niet zijn te voorspellen, blijft de waarde van iedere futurologische beschouwing voor een wetenschapsgebied beperkt (Rörsch, 1972).

De argwanende lezer zal deze laatste opmerking wellicht interpreteren als een verontschuldiging op voorhand; de auteur zoekt dekking voor het geval over enige jaren zou blijken dat zijn visie van dit moment onjuist was. Het is waar dat ik mij niet het bezit van een vooruitziende blik, zoals bijvoorbeeld die van Jules Verne, wil aanmatigen. Ik zou mij zeker niet op het gladde ijs van de toekomstverwachting begeven, wanneer er op dit moment geen sprake was van een heel bijzondere ontwikkeling in de microbiologie, waarvoor alle beoefenaars van de levenswetenschappen belangstelling moeten hebben en waarvoor onlangs ook de belangstelling van het grote publiek is gevraagd. Ik doel op het embargo op bepaalde genetische experimenten met bacteriën, dat in 1974 door een commissie van de National Academy of Science USA, is voorgesteld (Anonymus, 1974).

Dit houdt de gemoederen nog steeds bezig, want naast gevaarlijke mogelijkheden bieden de betreffende experimenten, zoals wij in het navolgende zullen zien, vele nuttige toepassingen.

Ik hoop tevens de betekenis van een futurologische beschouwing over een wetenschapsgebied duidelijk te maken. Zo'n beschouwing heeft zin omdat de discrepantie tussen wat wetenschappelijk en wat financieel mogelijk is, steeds groter wordt. Daardoor worden we meer en meer geconfronteerd met situaties waarin een keuze moet worden gemaakt, prioriteiten moeten worden gesteld. Een andere belangrijke keuzefactor is van ethische aard: moeten we wel alles doen wat experimenteel en financieel mogelijk is?

De rol van de microbiologie in de levenswetenschappen

In de voorgaande hoofdstukken hebben de auteurs, ieder wat betreft hun eigen onderwerp, reeds een indruk gegeven van de stand van zaken in elk der deelgebieden en welke vooruitzichten daarvan het resultaat zijn.

Het is wellicht verstandig om, met een scheef oog naar de heren die in Nederland de geldbuidel van het wetenschappelijk onderzoek beheren, op te merken dat de microbiologie een springlevende wetenschap is.

Het is echter niet uitsluitend om zichzelf dat ik de microbiologie als belangrijke wetenschap wens aan te prijzen. Het belang van medische bacteriologie en virologie is voor een ieder duidelijk. Het begrip voor de betekenis van micro-organismen in de ecologie en de milieuchemie is nog steeds groeiende. De industriële betekenis behoeft ook geen betoog. Het is echter opmerkelijk dat sommige biologen de microbiologie nog steeds niet op de juiste waarde schatten. En toch is het de microbiologie die de biologie in de laatste decennia met sprongen vooruit heeft gebracht. Onze huidige opvatting van de chemische basis van de opslag van de genetische informatie zou er niet zijn, wanneer de genetica van micro-organismen zich de laatste decennia niet zo snel had ontwikkeld. Wat voor het onderzoek van dit proces geldt, gaat in feite op voor vele andere biologische processen, met vooral de nadruk op alles wat met stofwisseling heeft te maken. Toch zijn de processen die bij micro-organismen, in het bijzonder bacteriën en bacteriofagen, ontrafeld zijn, belangrijk als model (als werkhypothese) bij het overeenkomstige onderzoek aan hogere organismen.

De grens aan de 'eenheid in de natuur'

Voor de rechtgeaarde microbioloog, opgevoed in een Kluyveriaanse traditie, is de analogie tussen de organismen vanzelfsprekend. Toch zijn er natuurlijke beperkingen aan het microbiële model voor het leven. Allereerst moeten we opmerken dat van bepaalde belangrijke processen die zich bij hogere organismen afspelen, het equivalent in micro-organismen ontbreekt. Het is zinloos bij een wetenschap als de neurochemie aan micro-organismen als proefobject te denken. Ook vele andere fundamentele processen verlopen in plantaardige of dierlijke cellen net iets anders dan bij micro-organismen. Dit is op zich

van grote praktische betekenis. Indien in dierlijke cellen een overeenkomstig peptidoglycaan zou voorkomen als in bacteriën, zou het penicilline als antibacterieel agens van weinig waarde zijn. De grote diversiteit die de natuur aan de dag legt, naast de overduidelijke eenheid, doet ons beseffen dat we er, voor het vinden van verklaringen voor verschijnselen in dieren en planten, met de chemische microbiologie alléén niet komen.

Van prokaryoot naar eukaryoot: de nieuwe trend

Het is natuurlijk niet toevallig dat een verschuiving van de aandacht van grote groepen onderzoekers voor bacteriën als proefobject naar cellen van hogere organismen, samenvalt met een toenemend streven naar het stimuleren van zogenaamd maatschappelijk relevant onderzoek. Gedurende de laatste vijf jaren hebben zeer vele molekulairbiologen in de Verenigde Staten de micro-organismen gelaten voor wat zij zijn en zich op de bestudering van de dierlijke cel geworpen. De sterkte van deze trend is in Europa aanmerkelijk minder gemakkelijk kwantitatief te bepalen, omdat men aan deze zijde van de oceaan nog niet zo bedreven is in projectgewijze financiering van het wetenschappelijk onderzoek. Men krijgt daardoor in Europa minder gemakkelijk dan in de VS een overzicht van de besteding van de fondsen. Illustratief is echter dat 10 jaar geleden in het 'workshop'- en cursusprogramma van de Europese Organisatie voor Moleculaire Biologie (EMBO) slechts een enkele van de onderwerpen betrekking had op onderzoek aan eukaryotische cellen en thans meer dan de helft.

Om inzicht te verwerven in de oncogenese bij mens en dier, kunnen we niet volstaan met het bestuderen van de regeling van de stofwisseling bij bacteriën, schimmels en gisten en het onderzoeken van de levenscyclus van bacteriofagen. Dat juist nu de synthese van macromolekulen bij hogere dieren en diervirussen zoveel aandacht trekt, is dus niet verwonderlijk. Het behoeft ook geen betoog, dat de ervaring opgedaan met microbiële systemen daarbij van groot nut is. De waarde daarvan blijkt echter nog al eens minder te zijn dan men enige jaren geleden verwachtte. Menige molekulair-bioloog die van bacteriën op dierlijke cellen is overgeschakeld, heeft teleurstellingen moeten verwerken. Zijn door ambitie gekenmerkt ongeduld, is daaraan overigens niet vreemd. De voor molekulair-biologisch onderzoek favoriete bacteriën zoals *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis* en ook de

eukaryotische micro-organismen zoals *Aspergillus niger* en *Saccharomyces cerevisiae*, groeien nu eenmaal sneller dan plantaardige en dierlijke cellen.

De teleurstelling over te hoog gespannen verwachtingen ten aanzien van de eenheid in de natuur, gaat echter dieper dan dat. Het fraaie en beroemde model van Jacob en Monod uit de jaren '50 voor de regeling van de expressie van genetische informatie bij bacteriën (dat tot op de dag van heden nog steeds verder wordt verfijnd), heeft weinig uitgangspunten geboden voor het overeenkomstig onderzoek naar de regeling van de stofwisseling bij dierlijke en plantaardige cellen. Het allosterisch enzym is weliswaar in alle levende systemen aangetoond als belangrijke cytoplasmatische regelaar, en ook uit het cytologisch onderzoek aan dierlijke cellen blijkt dat we van zogenaamde actieve en niet actieve genen (in een bepaalde fase van de celcyclus of celdifferentiatie) kunnen spreken, doch omtrent de specifieke interactie tussen een regulerend eiwit (van het type repressor) en een regulator-gen van het eukaryotisch genoom tasten we nog in het duister. Dit zal ook de meest aan bacteriën verknochte molekulair bioloog doen twijfelen aan het belang van microbiële systemen voor het onderzoek op hoger niveau.

Nogmaals de rol van de microbiologie

Men kan echter ook de vraag stellen of we bij het volgen van de modieuze neiging niet te veel ineens willen. Zijn de kennelijk veel ingewikkelder dierlijke en plantaardige systemen eigenlijk al wel rijp voor een molekulaire benadering? Zijn we niet een beetje te vlug van bacteriën op dierlijke cellen in vitro aan het overschakelen? Ik geloof van niet; de molekulaire basis van de differentiatie bij hogere organismen bijvoorbeeld is een te belangrijk onderwerp om nog lang aan voorbij te gaan. De ontregeling van die differentiatie (de oncogenese) en de vorming van cellen die specifieke antilichamen produceren, zijn uit het oogpunt van volksgezondheid uiterst belangrijke onderwerpen.

Om het één te doen, hoeft men echter het ander niet te laten. Ook als we de noodzaak van molekulair biologisch (en celbiologisch) onderzoek aan hogere organismen erkennen, hoeven we de chemische microbioloog nog niet geheel aan de kant te zetten. In feite mogen we hopen dat de vergelijkende biochemie van bacteriën en dierlijke cellen belangrijke resultaten zal opleveren, in het bijzonder in verband

met de nieuwe experimentele benaderingen, die hierna zullen worden toegelicht.

Uiterst belangrijk lijkt het onderzoek aan eukaryotische micro-organismen zoals schimmels en gisten, die bepaalde experimentele voordelen met bacteriën gemeen hebben, maar niettemin wat betreft organisatie gelijkenis met dierlijke en plantaardige cellen vertonen.

Hoewel de micro-organismen lang niet zo gecompliceerd gedifferentieerd zijn als dierlijke en plantaardige systemen, bieden bacteriën en schimmels overeenkomstige processen om te bestuderen (zoals bijvoorbeeld de vorming van sporen), die waarschijnlijk sneller ontrafeld zullen kunnen worden en daarmee een belangrijke bijdrage zullen leveren voor een beter begrip van het differentiatieproces bij plant en dier.

De bacteriofaag Mu, die in *E. coli* mutaties induceert, heeft enige gelijkenis met een dierlijk tumorvirus. De wonderlijke recombinatieprocessen die deze faag induceert, zijn ongetwijfeld van belang om ook zogenaamde illegale recombinatieprocessen in hogere cellen te leren begrijpen, zoals translocatie en genduplicatie.

Het is ook niet toevallig dat juist op dit moment de cel-enveloppe van bacteriën in het middelpunt van de belangstelling staat. Want ook membranen, en celwanden, spelen bij plant en dier een belangrijke rol bij de regeling van processen. Er kan weinig twijfel over bestaan dat de opheldering van de structuur (en de correlatie met de functie) van deze bacteriële organellen, consequenties zal hebben voor het onderzoek op hogere biologische niveaus. De meest directe weg naar de ontrafeling van eerder genoemde processen bij eukaryoten, is waarschijnlijk niet de snelste en de meest economische.

De alternatieve genetica (genetic engineering)

Na de door Beyerinck en Kluyver sterk gestimuleerde benaderingswijze, is in het bijzonder de 'nieuwe' genetica van de haploïde bacteriën van Lederberg een enorme stimulans geweest voor de ontwikkeling van de microbiologie en daarmede voor de biologie als geheel. Verbazingwekkende processen zoals bacterie-conjugatie en de overdracht van genetisch materiaal van de ene op de andere bacterie door virussen (transductie), hebben zeker niet alleen hun bijdrage geleverd aan de genetica als zodanig; zij zijn ook niet meer weg te denken uit het moderne stofwisselingsonderzoek.

Tot de meest curieuze genetische processen bij bacteriën hoort ongetwijfeld de bacterie-transformatie. Bacteriën zoals *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* (en vele andere, waaronder, zoals onlangs bekend werd, ook *E. coli*) zijn in staat onder bepaalde condities DNA uit het medium op te nemen en in hun genoom te incorporeren. Daarbij worden de erfelijke eigenschappen die door het toegevoegd DNA worden gedragen, ook die van de receptor-bacteriën. Aangezien voor de inbouw in het genoom een grote homologie tussen het donor-DNA en het DNA van de receptor-bacterie nodig is, zijn de mogelijkheden voor transformatie tussen soorten zeer beperkt. Men maakt uit een *B. subtilis* geen *E. coli* door het DNA van laatstgenoemde aan de eerste te voeren. Wanneer geen inbouw van het toegevoegde DNA in het genoom nodig is om de erfelijke eigenschappen van de receptorcel te veranderen, zoals bijvoorbeeld het geval is met plasmide-DNA van het type van de resistentiefactoren (zie Hoekstra, p. 180 en Guinée, p. 196, dit boek), is overdracht van soortvreemd DNA zeer wel mogelijk. Hierbij is een voorwaarde dat het toegevoegde DNA zelf een zogenaamd replicon is, dat wil zeggen dat het zich in de bacterie onafhankelijk van het chromosomale DNA kan repliceren. Het replicon-karakter van dit plasmide-DNA wordt bepaald door een aantal specifieke genfuncties. Met dit plasmide-DNA, dat behalve een resistentiefactor ook een bacteriofaag-DNA kan zijn, kan in vitro in belangrijke mate enzymatisch worden gemanipuleerd. Er kunnen breuken in worden aangebracht met behulp van specifieke nucleasen, die weer kunnen worden geheeld met het enzym polynucleotideligase. Op deze wijze kunnen ook twee soortvreemde DNA-molekulen aan elkaar worden gekoppeld door beide oorspronkelijke DNA-molekulen eerst met hetzelfde specifieke nuclease te bewerken, de brokstukken daarna bij elkaar te brengen en vervolgens met behulp van het ligase te koppelen. Op deze wijze werden bijvoorbeeld in vitro twee verschillende resistentiefactoren aanééngekoppeld (Chang & Cohen, 1974) en vervolgens door transformatie in een *E. coli*-cel gebracht, maar ook werd het DNA van een dierlijk virus aan dat van de *E. coli*-bacteriofaag lambda gesmeed. De consequentie hiervan is ingrijpend. De techniek biedt *in principe* de mogelijkheid het DNA (of althans brokstukken daarvan) van elk ander organisme naar een transformeerbare bacterie over te brengen. Reeds werd door Morrow et al. (1974) een brokstuk DNA van de pad *Xenopus* aan het plasmide SC101 gekoppeld en naar *E. coli* overgebracht.

Het embargo

Het zal duidelijk zijn dat de overdracht van dierlijke (waaronder menselijke) en plantaardige genen naar bacteriën enorme experimentele mogelijkheden biedt om bepaalde processen die zich in plant en dier afspelen te bestuderen. De moeilijkheden die wij ondervinden bij het onderzoek met dierlijk en plantaardig materiaal zouden op deze wijze (tenminste gedeeltelijk) kunnen worden overwonnen.

Hoewel deze overdracht van soort-vreemde genen naar bacteriën experimenteel reeds enige jaren mogelijk is, was er toch sprake van een zeer sterke aarzeling de mogelijkheden (althans openlijk) uit te diepen. De groep van Paul Berg te Stanford die voor het eerst een dierlijk-virus-DNA aan dat van de bacteriofaag lambda koppelde, realiseerde zich ook spoedig de mogelijk akelige gevolgen van dit experiment. Wanneer deze combinatie tumorvirus-lambda-DNA in *E. coli* zou worden gebracht en deze bacterie zou uit het laboratorium 'ontsnappen', dan is het theoretisch niet uitgesloten dat ook mens en dier met deze *E. coli* zouden worden besmet. Deze besmetting zou zeer lange tijd onopgemerkt kunnen blijven, want het aantonen van een stukje DNA van een tumorvirus in een bacterie is geen eenvoudige zaak. Dit was aanleiding voor de groep in Stanford om alle collega's op te roepen een dergelijk experiment vooralsnog niet uit te voeren (Rörsch et al., 1973; Anonymus, 1974). Als voorbeeld gold hierbij de ervaring met de verspreiding van de resistentiefactoren sedert het einde van de tweede wereldoorlog, die een wezenlijke belemmering inhouden voor de therapie met behulp van antibiotica. Het één en ander leidde tot een intentieverklaring die uit twee delen bestaat:

1. men zal geen combinaties van resistentiefactoren langs deze weg tot stand brengen die niet al reeds in de natuur voorkomen,
2. men zal geen tumorvirus-DNA in bacteriën brengen.

Dit embargo behoefde ons er in eerste aanleg niet van te weerhouden andere stukjes DNA van dierlijke of menselijke oorsprong naar bacteriën over te brengen; er is echter een voetangel die zeker de virus-deskundigen onder de microbiologen zal aanspreken. Wanneer een soort-vreemd DNA met behulp van een nuclease in stukjes wordt geknipt, dan zijn wij daarmede nog niet in staat uitsluitend het meest gewenste brokstukje te selecteren. Bij daaropvolgende koppeling aan een bacterieel replicon zal er een heel scala van uitgebreide replicons

bestaan, waarin allerhand soorten brokstukjes soort-vreemde DNA zijn ingebouwd. Wanneer nu in het 'normale' dierlijke of menselijke genoom, DNA-stukken voorkomen van latente virussen, zoals wij die bij bacteriën kennen, dan is het niet uitgesloten dat wij per ongeluk een genoom van een diervirus in onze bacterie brengen. Dit bijprodukt zou hetzelfde effect kunnen hebben als de eerder genoemde combinatie van tumorvirus- en lambda-DNA. Dat dit experiment dus toch uit de hand zou lopen, kon, door de mogelijke aanwezigheid van latente virussen, niet a priori worden uitgesloten.

De omvang van het gevaar

Het embargo hield de gemoederen enige tijd ernstig bezig, omdat het een algemene discussie induceerde of bepaalde experimenten nu wel of niet moeten worden uitgevoerd. De discussie kreeg daarbij natuurlijk een bijzonder gewicht, omdat men langs de beschreven weg ook opzettelijk gevaarlijke organismen kan gaan construeren die in een biologische wapen zijn te gebruiken. Toch was er de nodige scepsis onder de molekulair biologen over het embargo. Allereerst geeft een vrijwillig afzien van een bepaalde ontwikkeling bij de huidige politieke constellatie van de wereld geen enkele garantie dat een ander, en in het bijzonder een politieke tegenstander, dat ook doet. In tegendeel, men stelt dat het verstandiger is het onderzoek voort te zetten teneinde bijtijds te weten waartoe mogelijk misbruik zou kunnen leiden.

Een tweede belangrijk element in de discussie is het buitengewoon grote nuttig gebruik dat van deze techniek kan worden gemaakt. Daarover straks meer.

Ten derde wordt door velen gesteld, dat de gevaren aanmerkelijk minder groot zijn dan aanvankelijk werd voorzien. Welke kans maakt in de natuur eigenlijk een bacterie die een stukje vreemd DNA, bijvoorbeeld van een tumorvirus draagt? De epidemiologen zullen het er over eens zijn dat deze kans klein is, zolang er geen selectiedruk is. Als voorbeeld kunnen weer de resistentiefactoren worden aangehaald die zich over de wereld hebben verspreid, niet omdat ze in de laboratoria werden geconstrueerd, doch omdat voor hen een nieuwe nis werd geschapen door de overmatige toepassing van antibiotica in de ziekenhuizen en vooral in de bio-industrie (Anderson, 1974). Een dergelijke nieuwe nis wordt voor onze nieuwe bacteriën met tumorvirus-DNA niet zonder meer geschapen. De kans op onopzettelijke ver-

spreiding kan men verder verkleinen door als receptorbacteriën voor vreemd DNA bacteriemutanten te kiezen die zich in de natuur zeker niet kunnen handhaven. Aldus is men vrij algemeen van mening dat de nieuwe techniek vooral ten goede zal kunnen worden toegepast, mits de nodige voorzorgsmaatregelen worden genomen.

Bij het publiek bestaat nog al wat misverstand over de omvang van dergelijke veiligheidsmaatregelen en over de kosten die daaraan verbonden zijn. We moeten hierbij echter duidelijk onderscheid maken tussen laboratoriumwerk en eventuele industriële toepassing. Het hanteren van ziekteverwekkende bacteriën in het laboratorium vergt in het algemeen niet zulke ingrijpende maatregelen. Het gebruik van een eenvoudige (gesloten) 'glove-box', een steriele werkplaats voor de handen, waarin overdruk heerst, zou voldoende zijn en veiliger dan de technisch veel verfijnder 'laminar flow box', die door een ingewikkeld stelsel van filters vanuit de omgeving steriele lucht krijgt aangevoerd. Als er ergens geldt dat eenvoud belangrijk is, dan is dat hier. Sluizen, douches, ingewikkelde luchtfilterinstallaties geven aan het laboratorium wel een gewichtig aanzien, doch dragen nauwelijks bij tot de veiligheid, althans in een laboratorium waar uitsluitend met microorganismen wordt gewerkt.

Indien het noodzakelijk is ook een experimentele besmetting van proefdieren uit te voeren, wordt de situatie aanmerkelijk gecompliceerder en zijn deze voorzieningen een noodzaak. Het is hierbij zeer de vraag of het nodig, en uit psychologisch oogpunt wel zo nuttig is, dat in het laboratorium voor molekulaire biologie het potentiële gevaar van de te construeren organismen wordt onderzocht. Het is wellicht wel zo gunstig om, gezien het mogelijk optreden van onvoorziene effecten, een waterdicht (of liever luchtdicht) systeem van veiligheidsvoorzieningen te blijven handhaven, ook wanneer op korte termijn zou blijken dat het met de gevaren wel meevalt. Overigens zijn er in de wereld meerdere centra waar experimenten met pathogene bacteriën en proefdieren kunnen worden uitgevoerd. Dit zijn het Microbial Research Establishment te Porton, Engeland, en het onlangs door het National Institute of Health (NIH) van het Army Chemical Corps overgenomen instituut te Detrick, VS. Een test op besmettelijkheid zal ongetwijfeld noodzakelijk zijn indien een nieuw geconstrueerd organisme in de gistingsketel van een fermentatieindustrie toepassing gaat vinden. De veiligheidsmaatregelen die bij het kweken van grote hoeveelheden organismen moeten worden aange-

houden, zijn zeer ingewikkeld en kostbaar. Wanneer in theorie een geconstrueerd organisme een commercieel belangrijk produkt zou kunnen opleveren doch dit organisme zou een potentieel besmettingsgevaar opleveren, dan zullen hoogstwaarschijnlijk de kosten van de veiligheidsmaatregelen het in produktie nemen onmogelijk maken.

Praktische toepassingen

De industriële toepassingen waaraan men in dit verband denkt, bestaan uit produktie van natuurstoffen die thans nog uit plantedelen of organen van dieren moeten worden gewonnen. De genen voor deze stoffen zouden naar gemakkelijk te kweken bacteriën kunnen worden overgebracht. Met behulp van reeds bekende technieken zou het aantal van elk der betrokken genen in elke bacterie verveelvoudigd kunnen worden, waardoor een grote produktiviteitsverhoging zou worden bereikt. Als voorbeelden noemen we in dit verband het voor suikerpatiënten onontbeerlijke insuline (thans geproduceerd uit de alvleesklier van varkens) en het voor de behandeling van hartziekten gebruikte digitaline (uit *Digitalis* of vingerhoedskruid). Belangrijker wellicht nog zijn stoffen die in de geneeskunde toepassing vinden, en die slechts bij de mens zelve kunnen worden gewonnen, zoals bijvoorbeeld bepaalde geslachtshormonen die tijdens de zwangerschap worden geproduceerd.

Wetenschappelijke aspecten

Hoe worden deze toepassingen technisch realiseerbaar? Hoe worden de bacteriën geïsoleerd die de gewenste genen van andere organismen hebben ontvangen? We krijgen te maken met problemen van selectie en detectie, problemen die de chemisch microbioloog en in het bijzonder de bacterie-geneticus niet vreemd zijn. Vaak moeten we uit een populatie van 10^9 tot 10^{10} cellen één enkele gewenste mutant afzonderen. Vaak dient voor het selecteren van elke nieuwe soort mutant met een nieuwe genfunctie een nieuwe selectie- en detectietechniek te worden ontwikkeld. Het zou te ver voeren een overzicht van de bestaande mogelijkheden te geven, doch ter illustratie dat ook het toegenomen enzymatisch manipulatievermogen hierbij een belangrijke rol kan spelen, het volgende.

Een dierlijke cel bevat in het DNA de informatie voor ongeveer

tien miljoen eiwitten. De selectie van de verlangde genetische informatie in de vorm van een brokstuk DNA is dus geen eenvoudige opgave, temeer omdat deze informatie per diploïde cel slechts in tweevoud aanwezig is. Een gedifferentieerde cel produceert slechts een fractie van alle eiwitten waarvoor in het genoom de informatie aanwezig is. Voor de eiwitten die door de cel wel worden geproduceerd is de informatie echter in veelvoud aanwezig in de vorm van boodschapper RNA. De isolering van dit RNA is daarom eenvoudiger dan de isolering van een brokstuk DNA. Met behulp van het geïsoleerde RNA kan het verlangde genetische materiaal worden geproduceerd. Dit geschiedt hetzij door, na hybridisatie met het cel-DNA, het gewenste DNA-brokstuk af te zonderen, hetzij door het RNA als matrijs te gebruiken voor een enzym dat hiermede een DNA-kopie kan produceren (RNA-afhankelijk DNA-polymerase of -transcriptase, te isoleren uit bepaalde RNA-tumorvirussen).

De rol van de alternatieve genetica in de biologie

Keren we thans terug tot ons uitgangspunt: welke bijdrage, van verderstrekkende betekenis dan voor onze eigen sub-discipline alleen, kan de microbiologie, en in dit bestek in het bijzonder de bacteriologie, in dit stadium van de wetenschappelijke ontwikkeling leveren aan de vermeerdering van onze biologische kennis?

Een enkel voorbeeld: in het voorafgaande hebben we met name genoemd de ontwikkelingsbiologie, het proces van celdifferentiatie, waarbij wij bij het onderzoek aan hogere organismen op molekulair niveau de nodige experimentele moeilijkheden tegenkomen. Een belangrijke bijdrage tot de opheldering van de processen die aan differentiatie ten grondslag liggen, kan worden geleverd door de betreffende genfuncties af te zonderen, in de nu eenmaal biochemisch gemakkelijker te hanteren bacteriën te brengen en daarin hun fenotypische expressie te bestuderen. In het bijzonder wordt hierbij thans gedacht aan de overdracht van menselijke genfuncties voor de synthese van antilichamen. De immunologie is vanouds een wetenschap waarmee in het bijzonder de medische microbioloog een grote betrokkenheid heeft. In verband met de bestrijding van infectieziekten (op dit moment vooral die welke door virussen worden veroorzaakt), is dit aspect van de immunologie nog steeds van grote wetenschappelijke en van economische betekenis. De immunologie staat thans ook op

een kruispunt van vele andere sub-disciplines en daarmede in het middelpunt van de belangstelling. Zowel de verlaagde activiteit als gevolg van stralingsziekte als de ontspoorde immuun-respons bij auto-immuunziekten zijn belangrijke onderwerpen van onderzoek. De relatie tussen immunologische reacties en verschijnselen van allergie wordt steeds duidelijker; de rol van de immunologie in de transplantatiebiologie is van groot belang en ook bij het kankeronderzoek is zij van nog steeds toenemende betekenis.

De tijd dat microbiologie en immunologie in één adem konden worden genoemd, is definitief voorbij. De huidige immunoloog voelt zich eerder celbioloog dan microbioloog. Wanneer het echter gelukt menselijke genfuncties, betrokken bij de immuun-response, in bacteriën tot expressie te brengen, zal ook de moderne microbioloog weer een bijdrage kunnen leveren aan de ontrafeling van dit voor ons voortbestaan zo belangrijke proces.

De noodzaak van multidisciplinaire en internationale samenwerking

Ik heb mij in dit betoog over een toekomstverwachting voor de microbiologie beperkt tot een bepaald aspect daarvan, niet in het minst omdat we juist op het terrein van de genetische manipulatie op de drempel staan van een geheel nieuwe ontwikkeling, maar vooral ook omdat die van universele betekenis kan zijn. Zij kan echter onmogelijk het gevolg zijn van een benadering vanuit één enkele discipline. Als er ergens een multidisciplinaire samenwerking gewenst is, dan is het hier. Zulks vooral ook omdat de genetische manipulatie enige bedenkelijke kanten heeft. Zowel de sceptici die de gevaren bagatelliseren, als zij die menen deze gevaren uit de weg te kunnen gaan door een onderzoekstop te propageren, bewijzen daarmede mijns inziens de samenleving geen goede dienst. Men kan mij hierbij aanrekenen dat ik een eerder gedane uitspraak afzwak waar ik mede verantwoordelijk voor ben (Rörsch et al., 1973), waarbij een onderzoekstop voor de inbouw van tumorvirus-DNA in *E. coli* werd voorgesteld. Ik herzie mijn mening, niet omdat ik tot de overtuiging ben geraakt dat iedere biochemicus die een enzym en een preparatieve ultracentrifuge kan hanteren, nu zijn gang maar moet gaan, doch omdat uit de internationale discussie is gebleken, dat de mogelijke gevaren in principe betrekkelijk eenvoudig te bestrijden zijn (C. G. Brownlee, 1974; J. H. Edwards, 1974; E. S. Anderson, 1974; K. Murray, 1974). Voorts is

mij duidelijk geworden dat het embargo dat vorig jaar in de Verenigde Staten werd voorgesteld (Anonymus, 1974) een averechts effect kan hebben. Onderzoekers die de gewraakte experimenten toch uitvoerden, dreigden deze thans, onder de druk van de publieke opinie niet te publiceren. Er ontstaat zo een ondergrondse wetenschapsbeoefening.

Door het onderzoek eenzijdig te stoppen en onwetend te blijven, worden problemen die in werkelijkheid op het internationale politieke vlak liggen, niet opgelost. Ongetwijfeld heeft het initiatief van Berg et al. het resultaat gehad dat de aandacht van de gehele wereld op de 'genetic engineering' is gevestigd. Als dit nu maar het resultaat heeft dat de politieke leiders in de wereld gaan beseffen, dat het even belangrijk is om tot internationale afspraken inzake de biologische wetenschappen te komen, als met betrekking tot de bewapening met strategische raketten.

Ook wanneer er geen sprake zou zijn van bewust misbruik van de te verwerven kennis, dient men zich de betrekkelijke waarde van landsgrenzen te realiseren als mogelijke barrières voor werkelijk gevaarlijke micro-organismen. Misschien is de kans dat zulke organismen bij de in het voorgaande beschreven experimenten ontstaan en aan onze controle ontsnappen, niet groot. Er is niettemin zowel op internationaal als op nationaal niveau behoefte aan een uitbreiding (en aanpassing) van de wetgeving inzake het voorkómen van ongelukken bij het hanteren van potentieel gevaarlijk biologisch materiaal (Ford, 1974).

Of de 'nieuwe' microbiologie een florissante toekomst tegemoet gaat, hangt mede daarvan af.

Literatuur[1]

Antoni van Leeuwenhoek, zijn 'kleijne diertgens' en zijn opvattingen over het ontstaan van het leven
(P. Smit)

Alle de Brieven van Antoni van Leeuwenhoek. 9 Delen. Swets & Zeitlinger, Amsterdam.

* Schierbeek, A., 1959. Measuring the invisible world: the life and works of Antoni van Leeuwenhoek F.R.S. Schuman, New York.

Smit, P. & J. Heniger, 1975. Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) and the discovery of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 41 (3):* 217–228.

Het zichtbaar maken van micro-organismen
(N. Nanninga)

Dobell, C., 1932. Antoni van Leeuwenhoek and his 'little animals'. NV Swets & Zeitlinger, Amsterdam, 435 p.

* Frey-Wyssling, A., 1953. Submicroscopic morphology of protoplasm. 2nd English Edn. Elsevier, Amsterdam, 411 p.

Gool, A. van & N. Nanninga, 1971. Fracture faces in the cell envelope of *Escherichia coli. J. Bacteriol. 108:* 474.

Houwink, A. L., 1953. A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum* spec. *Biochim. biophys. Acta 10:* 369.

Iterson, W. van, 1951. De betekenis van de electronenmicroscoop voor de arts. *Ned. Tijdschr. Geneesk. 95:* 3924.

Iterson, W. van, 1966. Het grote in het kleine. Openbare les, Universiteit van Amsterdam.

* Iterson, W. van, 1970. De ultrastructuur van de bacteriecel. *Vakbl. Biol., januari.*

* James, J., 1974. Prokaryoten en eukaryoten, structuur en organisatie. In: P. van Duyn (ed.), Celbiologie. Pudoc, Wageningen.

1. De met * aangegeven referenties geven een algemeen overzicht.

Leeuwenhoek, A. van, 1683. Letter No. 76, September 17th (The collected letters of Antoni van Leeuwenhoek, Vol. 4, p. 129. NV Swets & Zeitlinger, Amsterdam, 1952).
Mason, D. J. & D. M. Powelson, 1956. Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. *J. Bacteriol. 71:* 474.
Moor, H., K. Mühlethaler, H. Waldner & A. Frey-Wyssling, 1961. A new freezing-ultramicrotome. *J. biophys. biochem. Cytol. 10:* 1.
Murray, R. G. E., 1960. The internal structure of the cell. In: I. C. Gunsalus & R. Y. Stanier (eds), The bacteria 1. Academic Press, New York & London, p. 35–96.
Nanninga, N., 1973. Freeze-fracturing of microorganisms. Physical and chemical fixation of *Bacillus subtilis*. In: E. L. Benedetti & P. Favard (eds), Freeze-etching, techniques and applications. Société Française de Microscopie Electronique, Paris, p. 151–179.
Robinow, C. F., 1956. The chromatin bodies of bacteria. *Bacteriol. Rev. 20:* 207.
Robinow, C. F., 1960. Outline of the visible organization of bacteria. In: J. Brachet & A. E. Mirsky (eds), The cell 4. Academic Press, New York & London, p. 45–108.
Robinow, C. F. & R. G. E. Murray, 1953. The differentiation of cell wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of gram positive bacteria by selective staining. *Exp. Cell Res. 4:* 390.
Ryter, A. & E. Kellenberger, 1958. Etude au microscope électronique de plasma contenant de l'acide désoxyribonucléique. 1. Les nucléoides des bactéries en croissance active. *Z. Naturforsch. 13B:* 597.
Sabatini, D. D., K. Bensch & R. J. Barrnett, 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol. 17:* 19.
Woldringh, C. L., 1974. The nucleoplasm of *Escherichia coli*. Proefschrift Universiteit van Amsterdam.
Worcel, A. & E. Burgi, 1972. On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. mol. Biol. 71:* 127.

De identificatie van bacteriën: van fenotype naar genotype
(J. De Ley)

Barnett, J. A. & R. J. Pankhurst, 1974. A new key to the yeasts. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, 273 p.
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edn, 1974. R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1246 p.
* Gibbs, B. M. & D. A. Shapton (eds), 1968. Identification methods for microbiologists. Part B. Academic Press, London, 212 p.
* Gibbs, B. M. & F. A. Skinner (eds), 1966. Identification methods for microbiologists. Part A. Academic Press, London, 145 p.

* Kerstens, K. & J. De Ley, 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein pattern. *J. gen. Microbiol. 87:* 333–342.
Krassilnikow, N. A., 1959. Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten. G. Fischer Verlag, Jena, 813 p.
Prévot, A. R., 1961. Traité de Systématique bactérienne. Vol. 2. Dunod, Paris, 771 p.
Prévot, A., 1966. Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria. Lea & Febiger, Philadelphia, 402 p.
* Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal, 1973. Numerical taxonomy. Freeman and Co., San Francisco, 573 p.
* Steel, K. J., 1962. The practice of bacterial identification. In: G. C. Ainsworth & P. H. A. Sneath (eds), Microbial Classification. Cambridge University Press, p. 405–432.

Prebiotische evolutie

(A. W. Schwartz)

Aller, L. H., 1963. Astrophysics. The atmospheres of the sun and stars. Ronald Press, New York, 650 p.
Barghoorn, E. S. & S. A. Tyler, 1965. Microorganisms from the Gunflint Chert. *Science 147:* 563–577.
Bungenberg de Jong, H. G., 1949. Complex colloid systems. In: H. R. Kruyt (ed.), Colloid Science. Volume 2. Elsevier, Amsterdam.
Engel, A. E. J., B. Nagy, L. A. Nagy, C. G. Engel, G. O. Kremp & C. M. Drew, 1968. Alga-like forms in Onverwacht Series, South Africa: oldest recognized lifelike forms on Earth. *Science 161:* 1005–1008.
* Fox, S. W. & K. Dose, 1972. Molecular evolution and the origin of life. W. H. Freeman & Co., San Francisco, 359 p.
Harada, K. & S. W. Fox, 1975. Characterization of functional groups of acidic thermal polymers of α-amino acids. *BioSystems 7 (2).* In druk.
Hayes, J. M., 1967. Organic constituents in meteorites – a review. *Geochim.cosmochim. Acta 31:* 1395–1440.
* Kenyon, D. H. & G. Steinman, 1969. Biochemical predestination. McGraw-Hill, London, 301 p.
Lawless, J. G. & E. Peterson, 1975. Amino acids in carbonaceous chondrites. *Origins Life 6:* 3–8.
Miller, S. L. & H. C. Urey, 1959. Organic compound synthesis on the primitive Earth. *Science 130:* 245–251.
Miller, S. L., 1953. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science 117:* 528–529.
Oparin, A. I., 1957. The origin of life on Earth, 3rd edn (translated by A. Synge). Academic Press, New York.
Oparin, A. I., 1965. History of the subject matter: In: S. W. Fox (ed.), The origins of prebiological systems and of their molecular matrices. Academic Press, London, 482 p.

Pflug, H. D., 1967. Strukturierte organische Reste aus über 3 millarden Jahre alten Gesteine Südafrikas. *Naturwissenschaften 54:* 236–241.
* Rutten, M. G., 1971. The origin of life by natural causes. Elsevier, Amsterdam, 420 p.
Schopf, J. W. & E. S. Barghoorn, 1967. Alga-like fossils from the early Precambrian of South Africa. *Science 156:* 508–512.
Schwartz, A. W., 1972. Prebiotic phosphorylation-nucleotide synthesis with apatite. *Biochim. biophys. Acta 281:* 477–480.
Tyler, S. A. & E. S. Barghoorn, 1954. Occurrence of structurally preserved plants in the pre-Cambrian rocks of the Canadian Shield. *Science 119:* 606–608.
Urey, H. C., 1952. The Planets: their origin and development. Yale University Press, New Haven.
Wald, G., 1974. Fitness in the universe: choices and necessities. *Origins Life 5:* 7–27.

De rol van microben in het evolutieproces
(Lynn Margulis)

Ainsworth, G. C., G. C. Frederick, K. Sparrow & A. S. Sussman, 1973. The fungi: An advanced treatise. Vol. 4A. Academic Press, New York and London.
Allen, R. D., 1969. The morphogenesis of basal bodies and accessory structures of the cortex of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol. 40:* 716–733.
Allsopp, A., 1969. Phylogenetic relationships of the procaryotes and the origin of the eukaryotic cell. *New Phytol. 68:* 591–612.
Atema, J., 1973. Microtubule theory of sensory transduction. *J. theor. Biol. 38:* 181–190.
Awramik, S., L. Margulis & E. S. Barghoorn, 1975. Evolutionary processes in the formation of stromatolites. In: M. Walter (ed.), Stromatolites, Ch. 4. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, Netherlands. In druk.
Banerjee, S. & L. Margulis, 1973. Mitotic arrest by melatonin. *Exp. Cell Res. 78:* 413–418.
Banerjee, S., L. Margulis & J. K. Kelleher, 1975. The herbicide trifluralin is active against microtubule-based oral morphogenesis in *Stentor coeruleus.* Aangeboden voor publikatie.
* Barghoorn, E. S., 1971. The oldest fossils. *Sci. Am. 224:* 30–42.
Barghoorn, E., 1974. Two billion years of prokaryotic cells and the emergence of eukaryotes. *Taxon 23:* 259.
Beale, G. H., A. Jurand & J. R. Preer, 1969. The classes of endosymbionts of *Paramecium aurelia. J. Cell Sci. 5:* 65–91.
Bloodgood, R. A., 1974. Ultrastructural, biochemical and physiological studies of axostyle motility. Ph.D. Thesis, University of Colorado, Boulder.

Bloodgood, R. A., K. R. Miller, T. P. Fitzharris & J. R. McIntosh, 1974. The ultrastructure of *Pyrsonympha* and its associated microorganisms. *J. Morphol. 143:* 77–106.

Brock, T., 1970. Biology of microorganisms. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

* Cloud, P. E., Jr, 1974. Evolution of ecosystems. *Am. Sci. 62:* 54–66.

Cohen, S. S., 1970. Are/were mitochondria and chloroplasts microorganisms? *Am. Sci. 58:* 281–289.

Cohen, S. S., 1973. Mitochondria and chloroplasts revisited. *Am. Sci. 61:* 437–445.

Dippell, R. V., 1968. The development of basal bodies in *Paramecium. Proc. Nat. Acad. Sci. 61:* 461–468.

Dippell, R., 1975. In voorbereiding. Geciteerd in Sonneborn, 1974.

Dose, K., S. W. Fox, G. A. Deborin & T. E. Pavlovskaya, 1974. The origin of life and evolutionary biochemistry. Plenum Press, N.Y.

Ebringer, L., 1972. Are plastids derived from prokaryotic microorganisms? Action of antibiotics in chloroplasts of *Euglena gracilis. J. gen. Microbiol. 71:* 35–52.

Frankel, J., 1974. Positional information in unicellular organisms. *J. theor. Biol. 47:* 439–481.

Golubic, S., 1973. The relationship between blue green algae and carbonate deposits. In: N. Carr & B. A. Whitton (eds), The biology of the blue-green algae. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 434–472.

Golubic, S. & H. Hofmann, 1975. In voorbereiding.

Hall, J. B., 1973. The nature of the host in the origin of the eukaryotic cell. *J. theor. Biol. 38:* 413–418.

Hartman, S., J. P. Puma & T. Gurney, 1974. Evidence for the association of RNA with the ciliary basal bodies of *Tetrahymena. J. Cell Sci. 16:* 241–259.

Jacobson, B. S., C. G. Kannangara & P. K. Stumpf, 1973. The elongation of medium chain trienoic acids to α-linolenic acid by a spinach chloroplast stroma system. *Biochem. biophys. Res. Commun. 52:* 1190–1198.

Jeon, K. W., 1972. Development of cellular dependence in infective organisms: Microsurgical studies in amoebas. *Science 176:* 1122–1123.

Jeon, K. W. & I. J. Lorch, 1967. Unusual intracellular bacterial infection in large free living amoebae. *Exp. Cell Res. 48:* 236.

John, P. & F. R. Whatley, 1975a. *Paracoccus denitrificans* Davis (*Micrococcus denitrificans* Beijerinck) as a mitochondrion. *Adv. bot. Res.* In druk.

John, P. & F. R. Whatley, 1975b. *Paracoccus denitrificans* and the ancestor to the mitochondria. *Nature.* In druk.

Kluyver, A. J. & C. B. van Niel, 1956. The microbes' contribution to biology. The Prather Lectures, Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Leedale, G. F., 1974. How many are the kingdoms of organisms? *Taxon 23:* 261–270.

Lipmann, F., 1974. The search for remnants of early evolution in present-day metabolism. In: K. Dose, S. W. Fox, G. A. Deborin & T. E. Pavlovskaya (eds), The origin of life and evolutionary biochemistry. Plenum Publishing Corp., New York, p. 321–330.

Lovelock, J. E. & L. Margulis, 1974a. Homeostatic tendencies of the earth's atmosphere. *Origins Life 5:* 93–103.

Lovelock, J. E. & L. Margulis, 1974b. Atmospheric homeostasis, by and for the biosphere: The Gaia hypothesis. *Tellus 26:* 1–10.

Lwoff, A., 1950. Problems of morphogenesis in ciliates. John Wiley & Sons, N.Y.

Margulis, L., 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven.

Margulis, L., 1971a. Origins of animal and plant cells. *Am. Sci. 59:* 230–235.

Margulis, L., 1971b. Early cellular evolution. In: C. Ponnamperuma (ed.), Exobiology, Vol. 1, Ch. 10. North Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 342–368.

* Margulis, L., 1972a. Symbiosis and evolution. *Sci. Am. 224:* 48–57.

Margulis, L., 1972b. Symbiose en evolutie. *Nat. Tech. 40:* 395–407.

Margulis, L., 1972c. The Precambrian: age of prokaryote microbes. (Abstract). 24th International Geological Congress Proceedings, Montreal.

Margulis, L., 1973. Colchicine sensitive microtubules. *Int. Rev. Cytol. 34:* 333–361.

Margulis, L., 1974a. Classification and evolution of prokaryotes and eukaryotes. In: R. King (ed.), *Handbook of genetics,* Vol. 1. Plenum Publ Co., New York, p. 1–41.

Margulis, L., 1974b. On the origin and possible mechanism of colchicine sensitive mitotic movement. *BioSystems 6:* 16–36.

Margulis, L., 1974c. The five kingdom classification and the origin and evolution of cells. *Evol. Biol. 7:* 45–78.

Margulis, L., 1975a. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles: Criteria for proof. *Symp. Soc. exp. Biol.,* Symposium 29, Bristol, England.

Margulis, L., 1975b. Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. Review. *Exp. Parasitol.* In druk.

Margulis, L. & J. E. Lovelock, 1974. Biological modulation of the earth's atmosphere. *Icarus 21:* 471–489.

Nass, M. M. K., 1969. Mitochondrial DNA: advances, problems and goals. *Science 165:* 1128–1131.

Nass, M. M. K., 1971. Properties and biological significance of mitochondrial DNA. In: P. J. Harris (ed.), Biological ultrastructure: the origin of cell organelles. Oregon State University Press, Corvallis.

Nass, S., 1969. The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria. *Int. Rev. Cytol. 25:* 55–129.

Perlman, P. S. & H. R. Mahler, 1970. Formation of yeast mitochondria. 3. Biochemical properties of mitochondria isolated from a cytoplasmic petite mutant. *Bioenergetics 1:* 113–138.

Pickett-Heaps, J., 1974. The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. *BioSystems 6:* 37–46.

Pigott, G. H. & N. G. Carr, 1972. Homology between nucleic acids of blue-green algae and chloroplasts of *Euglena gracilis. Science 175:* 1259–1261.

Ponnamperuma, C., 1971. Exobiology. North Holland Publ. Co., Amsterdam.

Ponnamperuma, C. & R. Buvet (eds), 1971. Molecular Evolution, Vol. 1. North Holland Publ. Co., Amsterdam.

Preer, J., L. Preer & A. Jurand, 1974. Kappa and other symbionts in *Paramecium aurelia. Bacteriol. Rev. 38:* 113–163.

Raff, R. A. & H. R. Mahler, 1972. The non-symbiotic origin of mitochondria. *Science 177:* 575–582.

Raff, R., 1975. The symbiont that never was. *Symp. Soc. exp. Biol.,* Symposium 29, Bristol, England. In druk.

Raikov, I. B., 1974. Etude ultrastructural des bacteries epizoiques et endozoiques de *Kentrophorus latum* Raikov, Cilie Holotriche mesopsammique. *Cah. Biol. mar. 15:* 379–393.

Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *J. theor. Biol. 14:* 225–275.

Schnepf, E. & R. M. Brown, 1971. On relationships between endosymbiosis and the origin of plastids and mitochondria. In: J. Reinert & H. Ursprung (eds), Origin and continuity of cell organelles. (Results and problems in cell differentiation Vol. 2). Springer-Verlag, Heidelberg, p. 299–322.

Schopf, J. W., 1974. Paleobiology of the Precambrian: the age of blue-green algae. In: T. Dobzhansky, M. K. Hecht & W. C. Steere (eds), Evolutionary biology Vol. 7. Plenum Publ. Corp. N.Y., p. 1–43.

Smith, H. E. & H. J. Arnott, 1974. Epi- and endobiotic bacteria associated with *Pyrsonympha vertens,* a symbiotic protozoan of the termite *Reticulitermes flavipes. Trans. Am. Microsc. Soc. 93:* 180–194.

Sonneborn, T. M., 1959. Kappa and related particles in *Paramecium. Adv. Vir. Res. 6:* 229–338.

Stanier, R. Y., 1970. Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. In: H. P. Charles & B. D. Knight (eds), Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells Vol. 20. 20th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.

* Stanier, R. Y., E. Adelberg & M. Doudoroff, 1957. The microbial world. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.

Stanier, R. Y. & C. B. van Niel, 1962. The concept of a bacterium. *Arch. Mikrobiol. 42:* 17.

Starr, M. P., 1975. The *Bdellovibrio* association. In: *Symp. Soc. exp. Biol.,* Symposium 29, Bristol, England. In druk.

Starr, M. P. & R. J. Seidler, 1971. The Bdellovibrios. *Ann. Rev. Microbiol. 25:* 649–678.

Taylor, F. J. R., 1974. Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes. *Taxon 23:* 229–258.
Taylor, F. J. R., 1975. International Botanical Congress, Leningrad. In druk.
Uzzell, T. & C. Spolsky, 1974. Mitochondria and plastids as endosymbionts: A revival of special creation? *Am. Sci. 62:* 334–343.
Walker, J. C. G., 1975. Evolution of the earth's atmosphere. Macmillan, N.Y. In druk.
Walters, M., 1975. Stromatolites. Elsevier Publ. Co., Amsterdam. In druk.
Whittaker, R. H., 1959. On the broad classification of organisms. *Quart. Rev. Biol. 34:* 210–226.
* Whittaker, R. H., 1969. New concepts of the kingdoms of organisms. *Science 163:* 150–159.
Whittaker, R. H., 1975. Protists in the overall classification of living things. In druk.
Younger, K. B., S. Banerjee, J. K. Kelleher, M. Winston & L. Margulis, 1972. Evidence that synchronized production of new basal bodies is not associated with DNA synthesis in *Stentor coeruleus. J. Cell Sci. 11:* 621–637.

De betekenis van de microben voor het leven op aarde

(J. W. M. la Rivière)

Belloc, Hilaire, 1955. In: K. V. Thimann, The life of bacteria. MacMillan Cy, New York, p. 99.
Bengoa, J. M., 1969. Malnutrition and infectious diseases – the 'surviving child'. In: Proc. 2nd Conf. Global impacts of applied microbiology. Biotechnology and bioengineering symposium no. 1. Wiley, New York.
* Bolin, B., 1970. The carbon cycle. *Sci. Am. 223:* 125–132.
* Borgstrom, G., 1964. The human biosphere and its biological and chemical limitations. Proc. 1st Conf. Global impacts of applied microbiology. Wiley, New York.
Broecker, W. S., 1970. Man's Oxygen reserves. *Science 168:* 1537–1538.
Coursey, D. G., 1972. Biodeteriorative losses in tropical horticultural produce. In: A. H. Walters & E. H. Hueck-van der Plas (eds), Biodeterioration of materials, Vol. 2. Applied Science Publishers Ltd., London.
* Delwiche, C. C., 1970. The nitrogen cycle. *Sci. Am. 223:* 136–147.
Fair, G. M., J. C. Geyer & D. A. Okun, 1968. Water and wastewater engineering, Vol. 2. Wiley and Sons, New York.
Gordon, L., 1974. Population trends and prospects. In: Th. W. Wilson (ed.), World population and a global emergency. Aspen Institute for Humanistic Studies, Aspen (Colorado).
Haeckel, E., 1866. Generelle Morphologie der Organismen Bd. 1. Allgemeine Anatomie der Organismen. Georg Reimer, Berlin.

Hall, D. W., 1969. Food storage in the developing countries. *Trop. Sci. 11:* 298–318.
* Hare, R., 1970. The birth of penicillin and the disarming of microbes. Allen and Unwin Ltd., London.
Murray, R. G. E., 1974. A place for bacteria in the living world. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. Williams and Wilkins Cy., Baltimore, p. 4–9.
Postgate, J., 1975. New nitrogen-fixing symbioses in vitro. *Nature 253:* 305.
Schlegel, H. G., 1974. Production, modification and consumption of atmospheric trace gases by micro-organisms. *Tellus 26:* 11–20.
Stanier, R. Y., R. Kumisawa, M. Mandel & G. Cohen-Bazire, 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bact. Rev. 35:* 171.
* Whittaker, R. H., 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science 163:* 150–160.
* Woodwell, G. M. & E. V. Pecan (eds), 1973. Carbon and the biosphere. Proc. 24th Brookhaven Symp. in Biology. Technical Information Centre, Office of Information Services, U.S. Atomic Energy Commission, Washington.
* Zinsser, H., 1967. Rats, lice and history, Bantam Science and Mathematics Edition, New York.

Microbiologische afbraak van synthetische verbindingen

(G. J. E. Thijsse)

* Alexander, M., 1973. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng. 15:* 611–647.
Britton, L. N., J. M. Brand & A. J. Markovetz, 1974. Source of oxygen in the conversion of 2-Tridecanon to undecylacetate by *Ps. cepacia* and *Nocardia* sp. *Biochim. biophys. Acta 369:* 45–49.
Chao-Min Liu & M. J. Johnson, 1971. Alkane oxidation by a particulate preparation from *Candida. J. Bacteriol. 106:* 830–834.
Cripps, R. E., 1975. The microbial degradation of acetophenon. *Biochem. J. 152:* 233–241.
Department of the Environment, 1974. 15th Progress report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents. Appendix G. Her Majesty's Stationary Office, Great Britain.
Dutton, P. L. & W. C. Evans, 1969. The metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris.* A new reductive method of aromatic ring metabolism. *Biochem. J. 113:* 525–536.
Forney, F. W. & A. J. Markovetz, 1968. Oxidative degradation of methylketones. *J. Bacteriol. 96:* 1055–1064.
* Gladhill, W. E., 1974. Linear alkylbenzene sulfonate: Biodegradation and aquatic interaction. *Adv. appl. Microbiol. 17:* 265–289.

Guyer, M. & G. Hegeman, 1969. Evidence for the reductive pathway for anaerobic metabolism of benzoate. *J. Bacteriol. 99:* 906–907.
* Hayaishi, Osamu, 1974. Molecular mechanism of oxygen activity. Academic Press, New York and London.
Heydeman, M. T., 1974. Growth of soil bacteria on diethylether. *J. gen. Microbiol. 81:* ix–x.
Hitz, H. R., G. Plichta, Judith E. P. Young & J. M. Shewan, 1975. Primary developments of air-borne bacteria in the O.E.C.D. activated sludge system. *Int. Biodeterior. Bull. 11:* 31–35.
Izuka, H. M., H. Iizuka, M. Iida, Y. Unami & Y. Hoshino, 1968. n-Decane dehydrogenation by a cell free extract of *Candida rugosa. Z. allg. Mikrobiol. 8:* 145–168.
Klerk, H. de & A. C. van der Linden, 1974. Bacterial degradation of cyclohexane. Participation of a co-oxidation reaction. *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 40:* 7–15.
Lijmbach, G. W. M. & E. Brinkhuis, 1973. Degradation of secondary n-alkylsulfates and secondary alkanols. *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 39:* 415–423.
* Painter, H. A., 1974. Biodegradability. In: A discussion on the assessment of the environmental impact of chemical substances. *Proc. R. Soc. London, Ser. B. 185:* 149–158.
* Patterson, S. J., C. C. Scott & K. B. E. Tucker, 1970. Nonionic detergent degradation; initial mechanism of the degradation. *J. Am. Oil Chem. Soc. 47:* 37–41.
Ravenswaay Claasen, J. C. van & A. C. van der Linden, 1971. Substrate specificity of the paraffin hydroxylase of *Pseudomonas aeruginosa. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 37:* 339–353.
* Swisher, R. D., 1970. Surfactant biodegradation. Marcel Dekker Inc., New York.
Taylor, B. F., W. L. Campbell & Ira Chinoy, 1970. Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. *J. Bacteriol. 102:* 430–437.
Thijsse, G. J. E. & T. H. Wanders, 1974. Initial steps in the degradation of *n*-alkane-1-sulphonates by *Pseudomonas. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 40:* 25–37.
* Willets, A. J., 1973. Microbial aspects of the biodegradation of synthetic detergents: A review. *Int. Biodeterior. Bull. 9:* 3–10.

Residenten en passanten

(F. Wensinck)

Amonette, R. R. & E. W. Rosenberg, 1973. Infection of toe webs by Gram negative bacteria. *Arch. Dermatol. 107:* 71–73.
* Brock, T. D., 1966. Principles of microbial ecology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 306 p.

* Champion, R. H., T. Gillman, A. J. Rook & R. T. Sims, 1970. An introduction to the biology of the skin. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 450 p.
Da Costa, L. R., 1971. Protein loss from the normal human small intestinal mucosa. *J. Nutr. 101:* 431–436.
Da Costa, L. R., D. N. Croft & B. Creamer, 1971. Protein loss and cell loss from the small-intestinal mucosa. *Gut 12:* 179–183.
* Drasar, B. S. & M. J. Hill, 1974. Human intestinal flora. Academic Press, London, New York, San Francisco, 263 p.
* Encyclopaedia Britannica, 1970. Vol. 7. Ecology. Encyclopaedia Britannica, Inc., William Benton Publ., Chicago, p. 912–924.
* Heneghan, J. B., 1973. Germfree research. Academic Press, New York, London, 673 p.
* Herrmann, F., H. Ippen, H. Schaefer & G. Stüttgen, 1973. Biochemie der Haut. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 243 p.
Kligman, A. M., 1965. The bacteriology of normal skin. In: H. I. Maibach & G. Hildick-Smith (eds), Skin bacteria and their role in infection. McGraw-Hill, New York.
Leodolter, I., 1971. Gas im Gastrointestinaltrakt. *Wien. klin. Wochenschr. 83:* 670–677.
* Marples, M. J., 1965. The ecology of the human skin. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 970 p.
Marples, M. J., 1974. The normal microbial flora of the skin. In: F. A. Skinner & J. G. Carr (eds), The normal microbial flora of man. Academic Press, London, New York, 264 p.
Price, P. B., 1938. The bacteriology of normal skin: a new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing. *J. infect. Dis. 63:* 301–318.
Reynders, L., 1975. Cosmetica in Nederland. Van Gennep, Amsterdam, 104 p.
* Skinner, F. A. & J. G. Carr (eds), 1974. The normal microbial flora of man. Academic Press, London, New York, 264 p.
* Stüttgen, G., 1965. Die normale und pathologische Physiologie der Haut. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 577 p.
Taplin, D., 1972. The use of antibiotics in dermatology. *Adv. Biol. Skin 12:* 315–323.
Woodruffe, R. C. S. & D. A. Shaw, 1974. Natural control and ecology of microbial populations on skin and hair. In: F. A. Skinner & J. G. Carr (eds), The normal microbial flora of man. Academic Press, London, New York, 264 p.

Aan het grensvlak mens-microbe

(K. C. Winkler)

Almeida, J. D., F. Brown & A. P. Waterson, 1967. The morphologic characteristics of 19S antibody. *J. Immunol. 98:* 186–193.

Brown, J. H. & L. Brenn, 1931. A method for the differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. *Bull. John Hopkins Hosp. 48:* 69–73.

Clark, R. P., 1974. Skin scales among airborne particles. *J. Hyg., Camb. 72:* 47–52. Voor figuur zie p. 50.

Collier, A. M., W. A. Clyde & F. W. Denny, 1971. *Mycoplasma pneumoniae* in hamster tracheal organ culture: Immunofluorescent and electron microscopic studies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136:* 569–573.

Costerton, J. W., J. M. Ingram & K. J. Cheng, 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol. Rev. 38:* 87–110.

Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg & W. B. Wood, 1973. Microbiology. Hoeber Medical Division. Harper & Row, Publishers, New York, Evanston and London.

Duguid, J. P., 1959. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J. gen. Microbiol. 21:* 271–286.

Foley, M. J. & W. B. Wood, 1959. Studies on the pathogenicity of group A streptococci. 2. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. *J. exp. Med. 110:* 617–628.

Fox, E. N., 1974. M proteins of group A streptococci. *Bacteriol. Rev. 38:* 57–86.

Frank, R. M. & A. Brendel, 1966. Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel. *Arch. oral Biol. 11:* 883–912.

Gibbons, R. J. & J. van Houte, 1971. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infect. Immun. 3:* 567–573.

Goodman, J. R., R. E. Moore & R. F. Baker, 1956. Electron microscopic study of phagocytosis of Staphylococcus by human leukocytes. 2. Virulent and non-virulent staphylococci. *J. Bacteriol. 72:* 736–745.

James-Holmquest, Ann N., J. Swanson, T. M. Buchanan, R. D. Wende & R. P. Williams, 1974. Differential attachment by piliated and non-piliated *Neisseria gonorrhoeae* to human sperm. *Infect. Immun. 9:* 900.

Jerne, N. K., 1973. The immune system. *Sci. Am. 229 (January):* 52–60.

Jones, T. C., S. Yeh & J. G. Hirsch, 1972. The interaction between toxoplasma gondii and mammalian cells. 1. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. exp. Med. 136:* 1157–1172.

Keyes, P. H., 1960. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch. oral Biol. 1:* 304–320.

* Marples, M. J., 1969. Life on human skin. *Sci. Am. 220 (January):* 108–115.

* Mayer, M. M., 1973. The complement system. *Sci. Am. 229 (November):* 54–66.

Oss, C. J. van, C. F. Gillman & R. J. Good, 1972. Phagocytosis as a surface phenomenon. *J. reticuloendothel. Soc. 12:* 283–292, 497–502.

Reid, L., 1973. The landing site. In: J. F. Ph. Hers & K. C. Winkler (eds), Airborne transmission and airborne infection. Oosthoek, Utrecht, p. 166.
* Roitt, I., 1971. Essential immunology. Blackwell, London.
* Savage, D. C., 1972. Survival on mucosal epithelia. In: Smith & Pearce (eds), *Microbial pathogenicity. 22nd Symposium of the Society of* General Microbiology. Cambridge University Press.
Savage, D. C. & R. V. H. Blumershine, 1974. Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastrointestinal ecosystem: scanning electron microscopy. *Infect. Immun. 10:* 240–250.
Shedden, W. I. H., 1962. Fimbriae and haemagglutinating activity in strains of *Proteus hauseri. J. gen. Microbiol. 28:* 1–9.
Smith, M. R. & W. B. Wood, 1947. Studies on the mechanism of recovery in pneumonia due to Friedländer's bacillus. 3. The rôle of 'surface phagocytosis' in the destruction of the microorganisms in the lung. *J. exp. Med. 86:* 257–266.
Staub, A. M. & O. Westphal, 1964. Étude chimique et biochimique de la spécificité immunologique des polyosides bactériens. *Bull. Soc. Chim. Biol. 46:* 1647–1684.
Stoppelaar, J. D. de, K. G. König, A. J. M. Plasschaert & J. S. van der Hoeven, 1971. Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans. Arch. oral Biol. 16:* 971–975.
Ward, M. E. & P. J. Watt, 1972. Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to urethral mucosal cells: an electronmicroscopic study of human gonorrhea. *J. infect. Dis. 126:* 601–605.
Ward, M. E., P. J. Watt & J. N. Robertson, 1974. The human fallopian tube: a laboratory model for gonococcal infection. *J. infect. Dis. 129:* 650–659.
Williams, J. L., 1898. On structural changes in human enamel; with special reference to clinical observations on hard and soft enamel. *Dent. Cosmos 40:* 505–537.

De bereiding van penicilline; een voorbeeld van het gebruik van micro-organismen in de procesindustrie

(W. F. van der Waard)

Beukers, R., A. F. Marx & M. H. J. Zuidweg, 1972. Microbial conversion as a tool in the preparation of drugs. In: E. J. Ariëns (ed.), Drug design, 3, 502 p.
Elema, B., 1970. Opkomst, evolutie en betekenis van research gedurende 100 jaren Gistfabriek. Kon. Ned. Gist & Spiritusfabriek, Delft, 115 p.
* Humphrey, A. E., 1974. Current developments in fermentation. *Chem. Eng. 9:* 98.

Kluyver, A. J. & L. H. C. Perquin, 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. *Biochem. Z. 266:* 68.
* Perlman, D., 1974. Evolution of the antibiotics industry, 1940–1975. *ASM News 40:* 910.
* Rehm, H. J., 1971. Einführung in die industrielle Mikrobiologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 241 p.
* Simon, P. & R. Meunier, 1970. Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique. Masson et Cie, Paris, 567 p.

Plasmiden in bacteriën: enige fundamentele aspecten
(W. P. M. Hoekstra)

* Achtman, M., 1973. Genetics of the sex factor in Enterobacteriaceae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol. 60:* 79–123.
* Falkow, S., 1975. Infectious multiple drug resistance. Acad. Press, London, New York, San Francisco.
Jacob, F., S. Brenner & F. Cuzin, 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbour Symposium. *Quant. Biol. 28:* 329–343.
Kline, B. C. & J. R. Miller, 1975. Detection of non-integrated plasmid DNA in the folded chromosome of *E. coli*: physico chemical approach to studying the unit of segregation. *J. Bacteriol. 121:* 165–172.
* Novick, R. P., 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bact. Rev. 33:* 210–263.
Pritchard, R. H., P. T. Barth & J. Collins, 1969. Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. gen. Microbiol. 19:* 263–297.

Microbiologie in de toekomst
(A. Rörsch)

Anderson, E. S., 1974. The indiscriminate use of antibiotics has exerted more pressure on the bacterial population than could be wielded by all research workers in the field put together. *Nature 250:* 279–280.
Anonymus, 1974. NAS ban on plasmid engineering. International news. *Nature 250: 175.* (Dit artikel bevat 'Part of the statement of the Committee on recombinant DNA molecules; Paul Berg (Chairman), D. Baltimore, H. W. Boyer, S. N. Cohen, R. W. Davis, D. S. Hogness, D. Nathans, R. Roblin, J. D. Watson, S. Weissman, N. D. Zinder').
* Brownlee, G. G., 1974. Genetic engineering with viruses. *Nature 251:* 463.
Chang, A. C. Y. & S. N. Cohen, 1974. Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:* 1030–1034.
* Cohen, S. N., 1975. The manipulation of genes. *Sci. Am. 233:* 24–33.

De Lucia, P. & J. Cairns, 1969. Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature 224:* 1164–1166.
* Edwards, J. H., 1974. Bacterial engineering. *Nature 252:* 341.
Ford, B. J., 1974. Call for biohazard legislation. *Nature 250:* 364–365.
Kuhn, T. S., 1971. The structure of scientific revolutions. In: International Encyclopedia of unified science, II.2. The University of Chicago Press, third impression.
* Morrow, J. F., S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, H. M. Goodman & R. B. Helling, 1974. Replication and transcription of eukaryotic DNA in *E. coli. Proc. Nat. Ac. Sci. USA 71:* 1743–1747.
Murray, K., 1974. Alternative experiments? *Nature 250:* 279.
* Rörsch, A., P. H. Pouwels & P. v. d. Putte, 1973. De inbouw van tumorvirussen in bacteriën. *Nat. Tech. 41:* 3–13.
Rörsch, A., 1972. De sturing van de toekomst van de natuurwetenschappen. *Univ. Hogesch. 19:* 95–110.

Register

afvalstoffen
- als grondstof 117
mineralisatie van - 108
Agrobacterium
DNA-homologie van - 54
numerieke analyse van - 50, 51
Agrobacterium gypsophilae, geïdentificeerd als *Erwinia* 56
algen
- als eiwitbron 114, 115
fossiele - 62
- als producenten van organische stof 101
alkaanhydroxylase 125, 126
n-alkaan-1-sulfonaat
microbiologische afbraak van - 131, 132
zie ook detergenten, microbiologische afbraak van -
alcoholen, secundaire
microbiologische afbraak van - 129
zie ook detergenten, microbiologische afbraak van -
alkylbenzeensulfonaten
microbiologische afbraak van - 122–128
zie ook detergenten, microbiologische afbraak van -
n-alkylsulfaten, secundaire
microbiologische afbraak van - 128–130
zie ook detergenten, microbiologische afbraak van -
aminozuren, in chondrieten (meteorieten) 65
amoeben, symbiontische microorganismen in 80, 81
animalculisten 19
antibiotica
-gebruik voor voederdoeleinden 198 e.v., 205
resistentie tegen - 197 e.v.
specifiek effect op bacteriële eiwitsynthese van - 82
zie ook penicillines
antigenen
H- 196
K- 196
O- 196, 204
oppervlakte- 49
antilichamen 157 e.v.
aromatische verbindingen
aërobe ringsplitsingen van - 120, 121
anaërobe afbraak van - 134, 135
'Auto-Bac', zie identificatie
azijnaaltje 15

Bacillus subtilis, ultrastructuur van 27 e.v.
bacteriën
aanhechting aan protisten van - 93, 94, 95
- als ziekteverwekkers 48, 148
'hogere' - 47
identificatie van - 46 e.v.
identificatiesleutels van - 56
produktie in menselijke darm van - 147
ultrastructuur van - 26 e.v.
zie ook afzonderlijke soorten

zie ook micro-organismen
bacteriofaag
–typering 49
–DNA 212
bacteriocinen 147, 183
balansen, nationale zuurstof– 109
basale lichaampjes 75, 93
Bdellovibrio 75
Bergey's Manual 56, 99
Beyerinck 73, 104
bio-industrie, toepassing van antibiotica in – 198, 214
biologische klok 84
biomassa microbenrijk 102, 103
biosynthesewegen in chloroplasten, redundante – 83
blauwwieren
– als bacteriën opgevat 99
– als voedselbron 114, 115
opname door heterotrofe eukaryoten van – 76, 83
blauwzuur
– als produkt in atmosferisch model 64
– in interstellaire ruimte 66
vorming van aminozuren uit – 67
'broeikaseffect' 100

Candida tropicalis, als voedselbron 115
celbegrip
(poly-)monade als – 76, 85
(poly-)diade als – 76, 85
(poly-)triade als – 76, 85
celenvelop 30 e.v.
zie ook celwand en celmembraan
celmembraan 27 e.v.
selectieve kleuring van – 31
celoppervlak, adsorptie van microorganismen aan 151, 154
celwand, bacteriële 27 e.v.
– van gram-positieve bacteriën 28, 30, 31
– van gram-negatieve bacteriën 29, 30, 159
centriolen 93
chloroplasten, oorsprong van 79, 83, 84, 86, e.v.
chondrieten
zie meteorieten
ciliën, ontstaan volgens endosymbiose-theorie van 75, 83, 93
classificatie der levende natuur
zie Haeckel
zie Taylor
zie Whittaker
complementaire-replicatechniek 36
conjugatie 181
contactum vitalum 19
convergentie, in evolutie van microorganismen 86, 88, 93
coupe-techniek 27 e.v., 30, 32

darmflora, residente 145 e.v.
betekenis voor gastheer van – 148
nutriënten voor – 146
samenstelling van – 146
zie ook afzonderlijke geslachten
darminfecties 105, 196, 197
Delftse School 73
deodoranten 144
detergenten, microbiologische afbraak van 122 e.v.
anaërobe – 132 e.v.
co-metabolisme bij – 135–137
invloed van vertakkingen in het molekuul op – 124 e.v.
zie ook groepen van detergenten
detergenten, microbiologische afbraak van niet-ionogene 130
diade, zie celbegrip
dieren, kiemvrije 18, 151, 199
DNA
associatie met cel-envelop van – 180, 192
base-verhouding van – 52, 53
– en 'genetic engineering' 212 e.v.
–homologie 54
hybridisatie met DNA van – 54
hybridisatie met RNA van – 55
zie ook nucleoied
zie ook plasmiden

drinkwaterzuivering, effect op sterfte aan tyfus van 105

ecologie, omschrijving van 140
eiwitverlies, intern 147
elektroferogram, identificatie met behulp van 50, 51
elektronenmicroscopie 25 e.v.
oplossend vermogen bij – 43
prepareermethoden voor – 25 e.v.
scanning– 44, 45
endosymbiose-theorie van Taylor 72, 74 e.v.
samenvatting der – 96
toetsing der – 83
Enterobacteriaceae
celwand van – 159
geslachten van – 196, 197
ziekten veroorzaakt door – 196, 197
zie ook individuele geslachten
enterotoxine
– van *Escherichia coli* 203
– van *Vibrio cholerae* 203
Ent-factor, zie plasmiden
Escherichia coli
– als ziekteverwekker 197, 201
enterotoxine van – 202, 203
F-factor in – 181
– in oppervlaktewater 199
kernloze dochtercellen van – 188
K88-antigenen van – 202, 204
resistentie-plasmiden bij – 198 e.v.
serotypen van – 202
ultrastructuur van – 29 e.v.
virulentieplasmiden bij – 201
Euglena viridis, zie Van Leeuwenhoek
evolutie
(bio-)chemische – 47, 68
biologische – 59
neo-Darwinistische – 73
prebiotische – 59, 62, 67, 70
– van primitieve cellulaire systemen 68
zie ook convergentie
eukaryoten
endogene celorganellen in – 84
fotosynthetische symbionten bij – 90–92
verschijnen van – 82
zie ook endosymbiose-theorie van Taylor
eutrofiëring 103, 111

F-factor, zie plasmiden
fagocytose 156, 157
ontbreken bij prokaryoten van – 75
fermentatie
– bij bereiding penicillines 167, 174 e.v.
– en houdbaarheid van voedsel 116
fermenter 167 e.v.
fimbriae 204
flagellen 31, 93
endosymbiose-theorie en ontstaan van – 74, 83
fosfaat, in prebiotische reactiesystemen 67
fossielen, zie microfossielen
fotosynthese
– en endosymbiose-theorie 74, 75
jaaropbrengst aan gebonden koolstof van – 102
ontwikkeling in eukaryote cel van – 86
water en zwavelwaterstof als elektronendonor bij – 99
Frey-Wyssling, indeling morfologische structuren volgens 26
fungi, als apart rijk 85, 86

'genetic engineering' 211
embargo op – 207, 213 e.v.
genetische code, ontwikkeling van 70, 74
genoom
–grootte 47, 52
– in eukaryoten 75
–verandering door transformatie 180, 189, 212

genotype, zie identificatie
gisten
– als voedselbron 115
identificatiesleutels van – 56
globulen, zie Van Leeuwenhoek
gonokok, hechting aan celoppervlak van 154
Graafse follikels, zie Van Leeuwenhoek
Gunflint Iron Formation, precambrische micro-organismen in 59, 61

Haeckel, indeling levende natuur volgens 98
Haldane, zie Miller
Hayes, en ontdekking van F-factor 181
HLy, zie plasmiden
Holophrya ovum, zie Van Leeuwenhoek
huidflora
invloed op gastheer van – 144
nutriënten voor – 143
residente – 142 e.v., 149, 150
hybridisatie, zie DNA

identificatie 46 e.v.
– door bepaling der eiwitsamenstelling 50, 51
– en Bergey's Manual 56
fysiologische – 48
– m.b.v. 'Auto-bac'
– m.b.v. fenotypische kenmerken 50
– m.b.v. genotype 52
– m.b.v. lineaire-groeimachine
– m.b.v. numerieke analyse 50, 51
morfologische – 47
serologische – 49
immunologie 217, 218
infectieziekten
preventie van – 104
specifieke weerstand tegen – 157 e.v.
sterfte aan – 106
– veroorzaakt door Enterobacteriaceae 196, 197
zie ook afzonderlijke micro-organismen
interstellaire ruimte, molekulen in – 66

Jacob en Monod, model van – 210

kernequivalent, zie nucleoied
Kluyver 73, 119, 208
kooldioxyde, gehalte in atmosfeer aan 100
koolstofkringloop 100 e.v.
Kornberg-enzym 206
kweek van micro-organismen
– in oppervlaktecultuur 166
submerse – 165

Lederberg 211
Van Leeuwenhoek
brieven van – 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 162
tekeningen van bacteriën van – 24
tekeningen van spermatozoën van – 17
– en azijnaaltjes 15
– en bevruchting 22
– en *Euglena viridis* 10
– en globulen 9
– en Graafse follikels 19
– en *Holophrya ovum* 13
– en *Mesodynium rubrum* 89
– en mondbacteriën 11, 151
– en Protozoa 9
– en Royal Society 13
– en *Spirogyra* 9
– en *Spirillum* 12
– en *Vorticella* 10, 13
ligated gut test 202 e.v.
lineaire-groeimachine
zie identificatie
luchtwegen
hechting van micro-organismen in – 153

verwijdering van micro-organismen uit – 154

maag-darminfecties, kindersterfte aan 106
Mesodynium rubrum 86 e.v.
mesosoom 27, 28
meteorieten, organische verbindingen in 64, 65
methaanproduktie
– in darmkanaal 141, 146
industriële – 112, 117
microbiologie
betekenis voor levenswetenschappen der – 208, 210, 211
evolutionaire – 73
toekomst der – 206 e.v.
microfossielen, in Precambrium 59, 82
micro-organismen (microben)
– als eiwitbron 114, 179
– als voedselbron 113 e.v.
biomassa der – 102, 103
fossiele – 59, 82
omschrijving van – 99
pathogene – 104
zie ook procesindustrie
microtubuli 75, 82, 93
milieukenmerken, selecterende
zie selectie
Miller, en vonkontlading in atmosferisch model 62–64
mineralisatie 101 e.v.
mitochondriën
ontwikkeling uit aërobe bacteriën van – 75, 79, 83, 84
proto– 74
Mixotricha, symbiose met spirocheten van 96
M-proteïne, bij streptokokken 156
monade
zie celbegrip
zie Whittaker
mondflora 151 e.v.
moneren 85
mutanten
'kernloze' – 188
– met remming van plasmidereplicatie 186
Mycoplasma 74, 154

Van Niel 73
nucleoied
isolatie van – 41, 42
ultrastructuur van – 27 e.v.
zichtbaar maken van – 36 e.v.
zie ook DNA
numerieke analyse 50, 51

Oparin, zie Miller
organellen
symbiotische oorsprong in eukaryoten van – 77 e.v.
theorieën over niet-symbiotisch ontstaan van – 84, 85
organische verbindingen, spontane vorming op sterren van 65
overdraagbare resistentie, zie resistentie
ovisten 19–21
oxygenasen 120 e.v.
ozonlaag 100

pantoffeldiertje
fotosynthetiserend – 86
zie ook *Paramecium aurelia*
Paracoccus denitrificans
elektronentransportketen van – 75
Paramecium aurelia
bacteriële symbionten in – 78, 79
'killer'-fenotype van – 78, 79
Pasteur 97, 118
penicillines
bereiding van – 165 e.v.
'fermentatie' bij bereiding van – 167, 174 e.v.
precursors van – 173, 174
produktiestammen van – 172
semi-synthetische – 177, 178
verbeteringen in produktieproces van – 176, 177
zie ook antibiotica
peptidoglycaanlaag 28, 36

pinocytose, ontbreken bij prokaryoten van 75
plasmide(n) 180 e.v., 212
aantonen van – 184 e.v.
compatibiliteit van – 187, 205
'curing' van – 186
DNA in – 184, 185
enterotoxine– (Ent-factor) 203
fertiliteit– (F-factor) 181
grote en kleine – 190, 191, 205
HLy– 204
interactie tussen – 192 e.v.
–mutanten 192
overzicht typen en eigenschappen van – 183
replicatie van – 186 e.v.
resistentie– (R-factor) 182, 196 e.v.
verspreiding van – 188
virulentie– 196 e.v.
voorkomen in bacteriegeslachten van – 184
plastiden, ontstaan van 74, 76, 77, 79
pneumokok, en fagocytose 158, 159
polynucleotiden, synthese onder invloed van primitieve polypeptiden van 70, 71
polypeptiden
– en synthese van polynucleotiden 70, 71
thermische synthese van – 70
–vorming op primitieve aarde 66
polysomen, zie ribosomen
Precambrium 74
microfossielen uit – 59, 82
preformatieleer 18, 19
prepareermethoden, voor microscopie 25 e.v.
zie ook elektronenmicroscopie
Procaryotae, rijk der – 99
procesindustrie
microbiologische – 112, 162 e.v.
wereldjaarproduktie der – 162
prokaryoten 85
– als eerste micro-organismen 74
'proteinoids' 68, 69
protisten 85
fylogenie van – 81
rijk der – 98
'protomitochondriën'
zie mitochondriën
Pseudomonas, en afbraak detergenten 120 e.v.

R-factor, zie plasmiden
recombinanten 181
redoxpotentiaal, van darminhoud 145
replicons 185, 187, 212
recombinatie tussen – 193
replicatieronde, conjugatieve 188, 189
residente flora's 139 e.v.
– in de darm 145 e.v.
– in de mond 151 e.v.
– op de huid 142 e.v., 149
resistentie
overdraagbare – 197 e.v.
zie ook antibiotica
zie ook plasmiden
Rhizobium 111
RNA
– en 'genetic engineering' 217
– en hybridisatie met DNA 55
ribosomen 27, 28, 84
Royal Society, zie Van Leeuwenhoek
Ryter-Kellenberger (RK-)procedure 37 e.v.

Salmonella 196
resistentieplasmiden bij – 200, 201
serotypering van – 49, 196
– *typhimurium* 200, 201
– *typhi*, R-plasmiden in 201
ziekten veroorzaakt door – 196, 197
Scenedesmus, als voedselbron 115
selectie 86, 190
– door milieu 140–142
–druk 86, 190

serologische identificatie, zie identificatie
sex
–factor, zie plasmiden
–pili 188
Shigella
R-factor in – 182
ziekten veroorzaakt door – 196, 197
single-cell protein 114, 162
spermatozoën, zie Van Leeuwenhoek
Spirillum
– *serpens*, celwand van – 32
zie ook Van Leeuwenhoek
spirocheten, symbiose met *Mixotricha* van – 96
Spirulina, als voedselbron 114, 115
Spirogyra, zie Van Leeuwenhoek
Stanier 73, 99
Staphylococcus epidermidis 150
steroïden
bacteriële synthese van – 75
omzetting door micro-organismen van – 164
stikstofbinding
– door *Rhizobium* 111
industriële – 111
stikstofkringloop 110, 111
Streptococcus mutans, dextraanproduktie door 151
Streptococcus salivarius 151
symbionten, zie endosymbiosetheorie

taxonomie 46
Taylor
– en classificatie der levende natuur 85
zie ook endosymbiose-theorie
tijdschaal
evolutionaire – 59
geologische – 59
transductie 189, 211
transformatie 180, 189, 212
transiënte flora 139, 140
triade, zie celbegrip

ultrastructuur
– van *Bacillus subtilis* 27 e.v.
– van bacteriën 26 e.v.
– van *Escherichia coli* 29 e.v.
urbanisatie 107
ureumsplitsing, in de darm 148

vetzuren
afbraak van – 126, 128
– op de huid 143
virulentiefactoren, zie plasmiden
voedselbederf, microbieel 106, 107
Vorticella, zie Van Leeuwenhoek

waterzuivering door micro-organismen 108, 117, 122
Whittaker, indeling levende natuur in vijf rijken van 85, 98

zuurkoolbereiding 141
zuurstofkringloop 108 e.v.