Het ontstaan en verdwijnen

van

Waterstof en Methaan

onder den invloed van het

Organische Leven.

HET ONTSTAAN EN VERDWIJNEN

van

WATERSTOF EN METHAAN

onder den invloed van het

ORGANISCHE LEVEN.

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van den graad van

Doctor in de Technische Wetenschap

aan de

Technische Hoogeschool te Delft.

Op gezag van den Rector Magnificus

Dr. S. HOOGEWERFF,

Hoogleeraar in de Afdeeling der Technologie en Mijnbouwkunde.

voor den Senaat te verdedigen

op Vrijdag 6 Juli 1906, des namiddags ten 2½ uren,

door

NICOLAAS LOUIS SÖHNGEN,

geboren te Oirschot.

BIBLIOTHEEK TECHNISCHE UNIVERSITEIT
Prometheusplein 1
2628 ZC
DELFT

DELFT — J. VIS Jr.
1906.

Aan mijne Ouders.

Gedrukt bij van Piggelen & Heuvelink, Arnhem.

VOORWOORD.

De voltooiïng van dit proefschrift is mij een welkome gelegenheid, om mijn dank te betuigen aan alle Hoogleeraren van de Technische Hoogeschool, die tot mijne wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

In het bijzonder aan U, Hooggeleerden HOOGEWERFF, die mij steeds met zooveel bereidwilligheid van Uw groote, veelomvattende kennis mededeelde en ook, waar het niet juist mijne studie gold, met raad en daad ter zijde stond, heb ik zeer veel te danken.

Wees ook gij, Hooggeleerde ARONSTEIN, overtuigd van mijne erkentelijkheid voor het vele, wat ik van U leerde. Uw lessen in de scheikundige technologie vooral zullen voor mij steeds van groote waarde zijn.

De jaren, die ik onder Uw beider leiding als assistent werkzaam was, hebben veel tot mijne ontwikkeling bijgedragen.

Maar vooral aan U, Hooggeleerden BEYERINCK, hooggeschatten Promotor, mijn welgemeenden dank, in het bijzonder voor de groote belangstelling, die gij mij in zoo ruime mate hebt betoond in Uw laboratorium. Dat ik onder iemand van Uwe kunde

en wetenschappelijke vermaardheid dat proefschrift mocht bewerken, was een voorrecht, dat ik niet genoeg kan waardeeren.

Den tijd, dien ik in het Mikrobiologisch Laboratorium heb doorgebracht is voor mijne wetenschappelijke vorming van den grootsten invloed geweest en zal ik mij steeds dankbaar herinneren.

INHOUD.

Geschiedkundig overzicht.

HOOFDSTUK I.

Het voorkomen van methaan en waterstof in de natuur.

		Pag.
§ 1.	Oudste onderzoekingen	1
§ 2.	Bunsen, Hoppe-Seyler, Boussingault en Lévy, Schloesing, Gay-Lussac, Saussure, Muntz en Aubin, Gautier	3
§ 3.	Mijn- en Brongas. Vulkaangassen	9

HOOFDSTUK II.

Onderzoekingen naar de wijze van het ontstaan van methaan en waterstof in de natuur.

§ 1.	Waterstof als produkt van de pektosegisting .	21
§ 2.	Oudere onderzoekingen. Methaan en waterstof als produkten der cellulosegisting	25
§ 3.	Nieuwere onderzoekingen. Methaan en waterstof als produkten der cellulosegisting. Methaangisting in mesthoopen	35
§ 4.	Methaan- en waterstofgisting uit organische zouten, eiwitten en andere verbindingen . . .	46
§ 5.	Andere processen, welke onder waterstofontwikkeling verloopen	51

PAG.

Eigen onderzoekingen.

Inleiding 57

HOOFDSTUK I.

Het ontstaan van methaan door gisting van organische verbindingen.

§ 1. Gisting van calciumacetaat tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat 64
§ 2. Gisting van boterzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat 65
§ 3. Gisting van boterzure kalk en mierenzure kalk te samen tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat 81
§ 4. Gisting van mierenzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat 90
§ 5. Gisting van hoogere vetzure zouten tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat 94
§ 6. Gisting van eiwitten en suikers tot methaan en koolzuur 98
§ 7. Over de mikroben, die de methaangisting veroorzaken 102

HOOFDSTUK II.

Het verdwijnen van de waterstof in de natuur onder den invloed van de mikroben der methaangistingen.

§ 1. Waterstof in de atmospheer 108
§ 2. Waterstofabsorptie in butyraatgistingen . . 109
§ 3. Waterstofabsorptie in formiaatmethaangistingen . 113
§ 4. Methaangisting uit koolzuur en waterstof . . 117
§ 5. De cellulosegistingen 123

PAG.

§ 6. Over de verspreiding van waterstof in natuurlijke gistingsgassen 126

HOOFDSTUK III.

Het verdwijnen van het methaan onder den invloed van het bacteriënleven. Besluit.

Besluit 139

GESCHIEDKUNDIG OVERZICHT.

HOOFDSTUK I.

Het voorkomen van methaan en waterstof in de natuur.

§ 1. Oudste onderzoekingen.

Den 14den November 1776 schreef de groote natuurkundige Alexander Volta [1]) te Como zijnen vriend Pater Campi eenen enthousiasten brief over een door hem juist waargenomen natuurverschijnsel, hetwelk grooten indruk op hem gemaakt had. „Was sagen sie", zoo schreef hij, „wenn ich Ihnen gleich zum Anfang melde, dass ich an verschiedenen Orten, wo ich mich während dem Herbst befand, und auch hier in meiner Wohnung, entzündbare Luft angetroffen und gesammelt habe? Dass, wo ich mich befinde, ich mag mich zur Rechten oder zur Linken wenden, ich nur wenige Schritte dazu zu thun habe, weil mir die Erde und das Wasser ganz zubereitete entzündbare Luft, soviel mir gefällig ist, darbieten. Ja, so ist es, mein lieber Freund; und wenn gleich das lebhafte Aufwallen der entzündbaren Luft durch das Wasser eine äusserst merkwürdige Erscheinung ist, indem sie selten und gleichsam neu zu sein scheint, und uns einen Weg zu anderen wichtigen Untersuchungen öffnet, so kann sie doch nicht mehr als etwas Eigenes von Ihrer entdeckten Quelle gehalten werden, seitdem ich solche Luft an ganz verschiedenen Orten aus Seen, Sümpfen, Brunnen u. s. w. erhalten habe; doch hat Ihre Quelle hierin einen besonderen Vorzug,

[1]) Lettere del Sign. Alessandro Volta, Patrizio Comasco etc. Sull aria inflammabile nature delle paludi, Milano 1777, übersetzt von Köstlin, Strassburg 1778. Citaat volgens Hoppe-Seyler.

dass das Sprudeln freiwillig, in grosser Menge, und beständig geschieht, da man bei den andern nöthig hat, den Grund des Wassers zu bewegen und zu rütteln, damit auf gleiche Art ein Aufwallen der Luft erregt werde. Ich denke mit Vergnügen an den See Verbano, der mich zuerst dieses neue und gar nicht vermuthete Schauspiel beobachten liess. Es entsprach auch unser See Lario nachher meiner Erwartung; aber einige Bächlein und Pfützen übertroffen sie noch weit".

Als oorsprong van de door hem beschreven verschijnselen noemde Volta de afgestorven plantenvegetatie; hij merkte n.l. op, dat de hoeveelheid zich ontwikkelend gas afhankelijk is van de hoeveelheid organische stoffen in den bodem. Hij stelde dus vast, dat de stroom brandbare lucht, slechts zwak bij aanwezigheid van eene geringe hoeveelheid dezer verbindingen, zeer krachtig bevonden werd, zoodra de bodem rijk aan rottende plantendeelen was. Hoewel reeds Plinius melding maakt van stroomingen van brandbare lucht op verscheidene plaatsen der aarde, Libavius in 1600 spreekt van ontplofbare mijngassen en Franklin, Galiazzi e. a. waarnemingen beschreven over de ontwikkeling van brandbare lucht uit meeren, riolen enz., toch moeten we Volta als ontdekker van dit natuurproces huldigen, daar de algemeenheid en de oorsprong daarvan door hem het eerst in 't licht zijn gesteld. Ook was hij het, die voor de eerste maal de ontplofbaarheid van dit algemeen voorkomende gas vaststelde en de verhouding bepaalde, waarin atmospherische lucht, daarmede gemengd, de hevigste ontploffing veroorzaakte.

Het kostte den scheikundigen toen ter tijde groote moeite en volharding, een juist inzicht te verkrijgen in den aard en de samenstelling van gasvormige lichamen. Vooral de verschillende koolwaterstoffen waren met de toenmalige kennis en hulpmiddelen moeilijk te herkennen en van elkaar te scheiden; een chemisch zoo inactief gas als het methaan bood in 't bijzonder groote bezwaren.

Eerst in 1801 bewees Cruikshank [1]), dat het van het kooloxyd

[1]) Gilberts Annalen. 9. 103 1801.

verschillend was, terwijl hij vaststelde, dat in het zuivere „koolwaterstofgas" geen zuurstof aanwezig is.

Intusschen was door Murdoch de lichtgasbereiding uitgevonden; het hierbij verkregen gasmengsel door William Henry [1]) in 1806 onderzocht, bleek voor een groot deel te bestaan uit koolwaterstofgas, dat hij identificeerde met de brandbare lucht van Volta, het tegenwoordige methaan.

§ 2. Bunsen, Hoppe-Seyler, Boussingault en Levy, Schloesing, Gay-Lussac, Saussure, Muntz en Aubin, Gautier.

Bunsen. Het verschijnsel door Volta op zoo karacteristieke wijze beschreven, heeft ook de aandacht getrokken van den grooten scheikundige Bunsen [2]). Hij bepaalde na zijne uitgebreide onderzoekingen over de verschillende bestanddeelen der vulkanische gassen, welke uit de kraters en geysirs op IJsland ontwijken, de samenstelling van het gas van organischen oorsprong, dat zich te Marburg in de modder van den vijver van den Botanischen tuin ontwikkelde. Zeer zeker verdienen de uitkomsten van dezen kundigen onderzoeker, den grondlegger der gasanalyse, groot vertrouwen.

Hieronder volgen enkele cijfers, aan zijn onderzoek ontleend, er zij op gewezen, dat Bunsen geen waterstof in deze gassen vond.

Samenstelling des zomers		des winters
N_2	49.39	18.03
O_2	0.14	—
CO_2	3.10	5.56
CH_4	47.37	76.61

Door denzelfden onderzoeker werden analyses in 't licht gegeven van gassen, die vermoedelijk eveneens van organischen oorsprong zijn, n.l. de gassen, welke zich ontwikkelen bij het oplossen in water van de zouten, gewonnen uit de mijnen te Wieliczka.

[1]) Gilberts Annalen. 22. 58 1806.
[2]) Poggendorfs Annalen. B. 583. 1856.

Een van de vele analyses laat ik hieronder volgen.

N_2	10.35
CO_2	2.00
O_2	2.98
CH_4	84.60

Zooals men ziet, ontbreekt ook hier de waterstof.

Hoppe-Seyler. Korten tijd later werd het ontstaan der bodemgassen door Hoppe-Seyler [1]) aan een grondig onderzoek onderworpen. Hij merkte op, dat het proces, dat met de produktie dezer gassen gepaard gaat, des winters van weinig beteekenis is en zelfs bij een temperatuur van 8°—10° C. nog zoo goed als stilstaat, terwijl des zomers, vooral op warme dagen, het aanhoudend opborrelen van gasbellen de groote snelheid verraadt, waarmede de omzettingen in de modder plaats hebben. Zijne analyses van de gassen uit de modder der Bodensee zijn in onderstaande tabel samengevat.

Tabel der analyses van Hoppe-Seyler.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
CO_2	1.10	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	1,00	4,14
CH_4	69,44	61,17	67,70	41,75	59,88	53,78	66,45	53,17
H_2	9,05	10.67	2,10	2,95	0,00	2,74	9,17	4,44
N_2	20,41	28,16	29,05	54,44	38,61	42,00	23,38	38,25
O_2	0,00	0,00	1,14	0,85	1,51	1,48	0,00	0,00

No. I, II, III zijn monsters, verkregen uit den bodem van een kleine haven bij Wasserburg aan de Bodensee, 11 Sept. 1882.

No. IV, V en VI. uit de Bodensee tusschen Wasserberg en Nonnenhorn op plaatsen, welke dicht met riet waren begroeid.

No. VII en VIII geven de samenstelling van gasmonsters, opgevangen in moerassige gedeelten met veenvorming aan den Wasserberger Bühl 27 Sept. 1884.

Het koolzuurgehalte in deze gassen is zeer gering; veelal kon Hoppe-Seyler in de 20—40 c.c. gas, welke hij analyseerde, in 't geheel geen CO_2 aantoonen. De groote oplosbaarheid van dit gas in water en de ruime gelegenheid tot vorming van bicar-

[1]) Zeitschrift f. Physiol. chemie, Bd 19, S 209, 1886.

bonaten in de modder, waar het gasmengsel geproduceerd wordt, zullen waarschijnlijk hiervan de oorzaak zijn. De kleine hoeveelheden zuurstof, die men in de tabel der analyses vindt opgegeven, zijn, zooals Hoppe-Seyler zelf opmerkt, tijdens het opvangen medegevoerd in de toestellen en behooren niet tot het gasmengsel. In een materiaal toch als gistende modder, rijk aan zwavelwaterstof en andere oxydeerbare verbindingen, is het à priori uitgesloten, dat zuurstof als zoodanig in het donker daarin zou kunnen blijven bestaan.

Het groote gehalte aan waterstof, dat in deze gassen aanwezig is, moet wel in het oog vallen, vooral als men getallen als 9% en 10% (analyse I, II en III) opgegeven vindt, terwijl Bunsen in overeenkomstige gasmengsels, dus eveneens van organischen oorsprong, in 't geheel geen waterstof vond.

Ik zal bij behandeling mijner eigene onderzoekingen gelegenheid hebben, deze verschillende resultaten aan een kritiek te onderwerpen en het zij reeds hier gezegd, dat de vermoedelijke onjuistheid van Hoppe-Seyler's waarnemingen mijns inziens berust op een analysefout en, hoewel Hoppe-Seyler als buitengewoon bekwaam physioloog en scheikundige hoog te schatten is, behoort het niet tot de onmogelijkheden dat er in zijn laboratorium minder nauwkeurige analyses zijn uitgevoerd.

Boussingault en Levy. [1]) Door de onderzoekingen van Bunsen en Hoppe-Seyler, werden Boussingault en Levy tot de onderstelling gebracht, dat het voorkomen van brandbare gassen ook in den vasten bodem een algemeen verschijnsel zou zijn. Zij onderwierpen daarom het bodemgas van verschillende plaatsen aan een onderzoek. Om zich de noodige hoeveelheid bodemlucht te verschaffen, plaatsten zij een buis in een kuil van 30—40 cM. diepte en vulden deze daarna met aarde weder aan; door deze buis zogen zij 5—10 l. bodemlucht ter analyse.

De samenstelling van deze „bodemlucht" kwam over 't geheel overeen met die der atmospherische lucht; ze bevatte echter somtijds een weinig meer koolzuur.

Th. Schloesing, [2]) die zich eveneens met het onderzoek

[1]) Annales de chimie et de physique T. 37, 1853.

[2]) Comptes rendus T. 109, 1889.

der bodemlucht bezighield, maakte de opmerking, dat de resultaten der proeven van Boussingault en Levy weinig waarde kunnen bezitten, aangezien het volume lucht, dat bij zoo geringe diepte uit den bodem werd gezogen, veel te groot is; zooveel lucht kan slechts uit een zeer aanzienlijk volume grond afkomstig zijn en aangezien de lucht bij haren weg door den bodem de wegen met den geringsten weerstand zal kiezen, bestaat er alle reden, aan te nemen, dat een groot deel der 5 à 10 l. direkt uit de atmospheer afkomstig waren, door den grond om de buis heen naar beneden gezogen. Daarom verbeterde Th. Schloesing de proeven, door op één plaats slechts een kleine hoeveelheid bodemlucht aan te zuigen.

Een konische ijzeren buis, diameter buitenwerks 10 m.m., binnenwerks 1 m.m., werd in den grond gedreven, terwijl in het kanaal tijdelijk een ijzerdraad was gestoken. Na verwijdering der draad werd met behulp van een kwikpipet eene kleine hoeveelheid gas ± 15 c.c. uit den bodem gezogen. Bij het onttrekken van zulk eene geringe hoeveelheid gas behoeft men het indringen van atmospherische lucht tot aan de opening der buis niet te vreezen.

Analyses van meerdere monsters op één plaats met dit apparaat genomen, waren geheel gelijk, hetgeen pleit voor de deugdelijke wijze waarop geëxperimenteerd was. Op de samenstelling der lucht in den bodem hebben wind, temperatuur, luchtdruk, diffusie en vooral planten- en mikrobengroei grooten invloed, welke zich in het koolzuurgehalte doet gevoelen. Steeds bleek dat geen brandbare gassen aanwezig waren, het koolzuurgehalte nam vooral in diepere lagen iets toe, terwijl stikstof en zuurstof in dezelfde verhouding als in de atmospheer aanwezig waren.

De onderstelling van Boussingault en Levy is dus gebleken onjuist te zijn. Niettegenstaande het zeer waarschijnlijk is, dat het methaan evengoed in den bodem als in de modder ontstaat, treft men het in de bodemgassen niet in aantoonbare hoeveelheid aan, een feit waarop later zal worden teruggekomen.

Verscheidene scheikundigen hebben getracht de hoeveelheid brandbare gassen, welke in de atmospheer aanwezig zijn, vast te stellen.

Gay-Lussac [1]) onderzocht in het jaar 1810 onzen dampkring op het gehalte aan koolwaterstoffen en waterstof, zonder echter deze met zekerheid te kunnen aantoonen.

Saussure. [2]) Eenige jaren later stelde Th. de Saussure te Genève vast, dat in een gasmengsel van zuivere waterstof en lucht, steeds na de ontploffing sporen koolzuur aanwezig zijn. Hij schreef dit toe aan de aanwezigheid van kooloxyd in de hooge luchtlagen ontstaan tengevolge der ontleding van koolzuur door electrische ontladingen.

Boussingault. [3]) In 1833 toonde J. B. Boussingault waterstof aan tot een bedrag van 4.6 c.c. p. 100 l. in de lucht midden in Parijs.

Muntz en Aubin [4]) bepaalden in 1884 dat de lucht te Vincennes 0,2—0,47 c.c. methaan per 100 l. en in Parijs 6—10 c.c. per 100 l. bevat. Ze leidden de lucht over roodgloeiend koperoxyd, na deze eerst door wasschen door kaliloog van koolzuur te hebben ontdaan.

Gautier. Bij deze verdunningen, zegt Gautier, [5]) werd het koolzuur niet geheel vastgelegd, noch alle koolwaterstoffen geheel verbrand. Slechts met inachtneming der grootste voorzorgen is het mogelijk daaromtrent zekerheid te verkrijgen.

„Enfin, aucune des recherches publiés jusqu'ici ne permet de savoir si l'acide carbonique et l'eau produits dans la combustion de l'air proviennent d'hydrogène libre. Mais la quantité de ces derniers gaz, (oxyde de carbone et hydrocarbures non saturés) extrêmement faible et souvent nulle dans l'air même au centre d'une ville comme Paris, ne modifie en rien les résultats, que nous allons faire connaître".

De oxydatie van kooloxyd en onverzadigde koolwaterstoffen, door joodperoxyd, tot koolzuur, resp. koolzuur en water, onder afscheiding van jodium, volgens de formules:

$$5\ CO + I_2\ O_5 = 5\ CO_2 + I_2$$

$$5\ C_2\ H_4 + 6\ I_2\ O_5 = 10\ CO_2 + 10\ H_2\ O + I_2,$$

zijn processen, die ons in staat stellen met zekerheid verdunningen van $^1/_{20000}$ à $^1/_{30000}$ dezer gassen aan te toonen. [6])

---

[1]) [2]) [3]) Cit. volgens Gautier. (l.c.)
[4]) C. r. T 90, 1884. p. 871.
[5]) C. r. T. CXXVI. T. CXXX. T. CXXXI.
[6]) C. r. T. CXXVI.

Gautier, door wien deze reacties zijn bestudeerd en uitgewerkt, bepaalde de hoeveelheid CO en onverzadigde koolwaterstoffen in een gasmengsel, door weging van de daardoor afgescheiden hoeveelheid jodium in een buisje met gereduceerd koperpoeder, achter het buisje met I_2O_5 geschakeld. De gunstigste temperatuur voor dit proces is ongeveer 100°. Uit onderzoekingen met lucht van verschillenden oorsprong bleek, dat bovengenoemde gassen daarin slechts in de groote steden in sporen voorkomen, daarbuiten echter in hoeveelheden, welke zelfs bij deze wijze van werken niet waarneembaar zijn.

Verder verrichtte Gautier de analyses voor het bepalen van brandbare gassen in de atmospheer met eene uiterste nauwgezetheid; nadat hij de lucht met pijnlijke zorg van koolzuur en water had ontdaan, werd zij door een gloeiende buis, ter lengte van 80 cM., geleid, welke met blaadjes koperoxyd was gevuld en op 800° verhit was, daarna bepaalde hij de gewichtstoename van de absorptie-apparaten, en uit het gevormde water en koolzuur de hoeveelheid methaan en waterstof, welke oorspronkelijk in de lucht aanwezig was.

Zijne onderzoekingen gaven de volgende resultaten.

De lucht der groote steden bevat waterstof, methaan en hoogere koolwaterstoffen. Naarmate de invloed der gasproductie door fermentaties, industriëele bedrijven en processen van het dierlijk leven geringer wordt, neemt de totale hoeveelheid brandbare gassen in de lucht af.

Parijsche lucht bevat per 100 l.	22,6 c.c.	CH_4
Boschlucht	11,3 „	CH_4
De lucht op hooge bergen . .	2,16 „	CH_4
Zeelucht	0,00—0,03 „	CH_4

Zuivere atmospherische lucht bevat 20 c.c. waterstof per 100 l., maar geen methaan. Raleigh [1]) en Leduc [2]) betwijfelden of dit hooge gehalte aan waterstof in den dampkring wel voorkomt. Dewar komt echter tot dezelfde resultaten als Gautier [3]),

[1]) Phil. Mag. VI Ser. Vol. 3. April 1902. pag. 416. Citaat uit Meteor. Zeitschr. 1903. pag. 113.
[2]) C. r. T. CXXXV. p. 860.
[3]) C. r. T. CXXXV. p. 1025.

die zijne cijfers tegenover Raleigh en Leduc handhaaft.

§ 3. Mijn- en Brongas. Vulkaangassen.

De oorsprong der mijngassen is niet met zekerheid bekend; het kan waarschijnlijk geacht worden, dat zij hun ontstaan te danken hebben aan rotting van organisch materiaal. Deze opvatting vindt vooral steun in het feit, dat de samenstelling der mijngassen groote overeenstemming vertoont met die van de gasvormige produkten uit de modder.

Op oudere weinig belangrijke onderzoekingen omtrent de samenstelling der mijngassen van Keller, Davy en Thomson volgen de meer uitgebreide bepalingen van Playfair, [1]) Graham, [2]) Fouqué, [3]) Schondorff [4]) en anderen; eenige van hunne analyses zijn weergegeven in onderstaande tabel:

Plaats van uitstrooming.	Samenstelling in volumeprocenten.					Andere bestanddeelen.	
	CH_4	H_2	CO_2	N_2	O_2		
Walsend	77.5		1.3	21.1		—	Playfair.
Hebburn	91.8		0.70	6.70	0.90	—	„
Analyses op verschillende diepten uit de mijn te Jarrow	83.10		2.10	14.20		—	„
	93.40		1.70	4.90		—	„
	79.80		2.00	15.20	3.00	—	„
	79.70		2.00	15.30	3.00	—	„
Killing Worth	82.50			16.50	1.00	—	Graham.
Gates head	94.20			4.50	1.30	—	„
Anrin, fosse Réussite . .	93.51	2.24	3.97	1.07	0.21	—	Fouqué.

Gelijk men ziet ontbreekt de waterstof steeds, terwijl in enkele monsters, zooals de analyses van Fouqué aangeven, naast methaan, sporen hoogere koolwaterstoffen worden aangetroffen.

Overeenkomstige getallen verkreeg E. von Meyer [5]) door

[1]) Memoirs of the geolog. Survey of Great Brit. T. I. p. 460.
[2]) Philos. Mag. and Journ. Ser. III Nr. 189 p. 437.
[3]) Haton de la Goupillière Annales des mines Sér. VII, Memoires T. XVIII p. 202 1880.
[4]) Zeitschrift für Berg-, Hütten- und Salinenwesen im preussischen Staate Bd. 24. 1876 S. 120.
[5]) Journal für praktische Chemie N. F. Bd. 5 S. 144, 407 en Bd. 6 S. 389.

analyse van gassen, welke vrijkomen bij het uitkoken van steenkolen met water; daaraan zijn onderstaande getallen ontleend:

	CH_4	CO_2	N_2	O_2	100 Gr. kool leveren c.c. gas.
Kohlen der *Grube Gerhard* bei *Louisenthal, Albertschacht.*	91.76	Spur	8.24		188.0
Durham, Low Main Seam 108 fathoms from surface.	84.04	1.15	14.62	0.19	238.0
Harvey Seam Emily Vil., Woodhouse close *Colliery*, 25 fathoms below surface.	50.01	5.31	44.05	0.63	84.0

De waterstof ontbrak dus ook steeds in de gassen door MEYER geanalyseerd.

Van meer recenten datum zijn de uiterst nauwkeurige onderzoekingen van TH. SCHLOESING [1]) over de samenstelling der mijngassen.

Eenige zijner analyses zijn hieronder weergegeven.

	100 volumina gas bevatten:				100 vol. gas geven na ontploffing in den eudiometer eene volume-vermindering van:	bevatten gevormd CO_2
	CO_2	O_2	N_2	brandb. gas.		
1. *Anzin* (fosse Hérin)	0,4	0,5	2,2	96,9	200,4	100,8
2. „ (fosse Renard) étage 546 M.	0,3	0,0	9,5	90,2	200,6	100,4
3. *La Grand-Combe* (mine de la Floret).	4,1	0,0	7,1	88,8	201,0	101,3
4. *Aciéries de France*	1,1	0,3	7,3	91,2	201,7	100,7
5. *Plat de Guz* . . .	1,0	0,2	20,2	78,6	200,9	100,8
6. *Ronchamp*, puis de Chanois	1,2	0,1	8,1	90,6	203,2	102,6
7. *Blanzy*	3,7	0,9	39,8	55,6	203,7	104,3

Volgens de waarnemingen van SCHLOESING blijkt dus het mijngas hoofdzakelijk uit methaan te bestaan, slechts weinig koolzuur en zelden belangrijke hoeveelheden zuurstof te bevatten. De stikstof, die soms in belangrijke hoeveelheden voorkomt (tot

[1]) C. r. T. 122, 1896.

10 %) is volgens de opvatting van SCHLOESING afkomstig uit de atmospherische lucht, wat hij op grond van het overeenkomstige argongehalte van de stikstof uit het mijngas en van die uit de atmospheer besluit.

De gassen onder 3, 6 en 7 bevatten een weinig hoogere koolwaterstoffen, hetgeen blijkt uit de opgaven in de beide laatste kolommen.

„En résumé," zegt SCHLOESING," „on pourra le plus souvent dans la pratique considérer la portion combustible du grisou comme consistant simplement en méthane; il arrive pourtant aussi qu' elle comprenne une proportion faible mais sensible d'hydrocarbures étrangers."

De aandacht dient vooral gevestigd te worden op het feit, dat ook SCHLOESING bij zijne nauwkeurige analyses geen waterstof vond.

Brongas. Door LORIE [1]) werd in 1899 eene verhandeling over het brongas in Nederland geschreven, waaraan de gegevens van het volgende overzicht zijn ontleend.

De brandbare gassen der venen en moerassen hier te lande ontsnappen soms in groote hoeveelheid aan den bodem en trokken reeds in alouden tijd de aandacht der toenmalige bewoners, die er een machtig natuurverschijnsel in zagen, daar het gas door een nog niet verklaarde oorzaak, nu en dan uit zichzelf schijnt te kunnen ontbranden.

In het begin onzer jaartelling, in den zomer van het jaar 4, had aan den voet van het Roode Klif bij Stavoren zulk eene gasuitbarsting plaats, die drie dagen aanhield; de gassen, welke direkt aan de lucht ontbrandden tot geweldige vlammen, brachten schrik en ontsteltenis onder de bijgeloovige bevolking teweeg, die daarin niets meer of minder zag, dan het werk van eenen vuurspuwenden draak.

Het verschijnsel herhaalde zich na anderhalve eeuw op dezelfde plaats en daarna nog eens onder de regeering van koning Titus in 230.

Eerst in 't begin der 18e eeuw wordt weder melding gemaakt van zelfontbrandende gassen, welke in Oostdongeradeel bij het

[1] Het brongas in Nederland. Tijdschr. van het Koninkl. Ned. Aardr.k. Genootsch. Jaargang 1899.

graven van een put te voorschijn kwamen. Daar het water uit de put voor het vee ongezond werd verklaard, en met het oog op „het gevaar, dat er van dezen vulkaan te wachten was", werd de put weder gedempt.

Van meerdere oude verhalen over analoge natuurverschijnselen in Friesland wordt in de geschiedenis melding gemaakt. Merkwaardig is vooral de zelfontbranding der ontwijkende gassen, waarschijnlijk toe te schrijven aan daarin voorkomende phosphorwaterstofverbindingen.

Op vele plaatsen in Holland treft men nog heden in den bodem brongas aan, dat òf langs natuurlijken weg met het bronwater naar boven komt, zooals dit geschiedt te Oosthuizen, tusschen Purmerend en Hoorn (met eene opbrengst van 250 l. gas per uur), bij Avenhorn in de Beemster, in de Wieringerwaard en andere streken in Noord-Holland, òf met het water uit Nortonpompen wordt opgevoerd. Zoo deelt HARTING mede, dat tusschen de jaren 1849 en 1851 in Amsterdam bij het boren van diepe putten onder het Luthersche Weeshuis, op de Lauriergracht, Noordermarkt, Passeerdergracht en Bloemmarkt op een diepte van ± 43 M. brandbare gassen werden aangetroffen; op de drie laatste plaatsen eerst als de boor de diatomeënklei bereikt had.

Op het erf van den landbouwer J. VAN DER KOOY, aan den Rotterdammerweg, bij Delft, steeg den 3den Augustus 1840, bij het slaan van een Nortonbuis, een schuimende waterstraal, modder en zand meevoerend, gedurende 14 uren 14 M. hoog in de lucht. Deze gasstroom, welke allengs in kracht verminderde, hield tot den 19den September aan. Bij het dieper slaan der buis, kwam op 25 M. nog eenig brandbaar gas naar boven, terwijl de pomp op 30 M. goed water gaf. OUDEMANS verrichtte een viertal, beneden opgegeven, analyses van de gassen bij deze boring ontwikkeld.

In 1875 trok de landbouwer WOUTER SLUYS, op Deutzen Hof in de Beemster, het eerst partij van de gassen, die bij duizenden liters uit een op zijn terrein staande Nortonpomp opborrelden. Op initiatief van den fabrikant LANKELMAN te Purmerend werden ze gebruikt voor verlichting en verwarming van huis en stal en bleken zoodoende een groote waarde te bezitten. Zijn voorbeeld

vond navolging en sedert zijn vele boerderijen en woonhuizen op deze wijze verlicht en verwarmd, dank zij vooral ook de toepassing der gloeilichtbranders en de verbeterde methode tot afzondering van het gas uit het water door separators.

De druk, waarmede het water uit de Nortonpompen aan de oppervlakte komt, is zeer gering en doet het gewoonlijk niet hooger stijgen dan 2—3 d.M. boven het niveau van het omringende slootwater; behoudens eene enkele uitzondering blijft het beneden het waterniveau van het boezemwater.

De gasopbrengt van een bron is ongeveer 2 %—6 % van de opgewelde kwantiteit water, hetgeen ongeveer overeenkomt met de oplosbaarheid van het gas bij den druk, waaronder het op die diepte staat. Volgens den heer LANKELMAN echter zou het rendement aan gas tot 18 % kunnen stijgen.

De brongasproduktie is afhankelijk van de weersgesteldheid; bij hoogen barometerstand is ze in 't algemeen gering, bij slecht weer, regen en wind grooter; toch mocht het LORIÉ niet gelukken een direkt verband tusschen den barometerstand en de gasproduktie vast te stellen; andere onbekende faktoren schijnen hierbij hunnen invloed te doen gelden.

De meeste brongaswateren komen van lagen, gelegen op eene diepte van 25 M. tot 32 M. beneden A. P.; als uiterste grenzen kunnen we echter 12 M. tot 80 M. stellen.

Volgens LORIÉ stroomt het boezemwater door den bodem naar de wellen en wordt het op dien weg met gas beladen.

Een 14-tal analyses van brongasmonsters, door LORIÉ verzameld, zijn hieronder weergegeven.

ANALYSES VAN BRONGAS.

No.	CH_4	CO_2	N	O	H	CO	Som.
1	91,8	8,2					Zware koolwaterstoffen. 100
2	83,6	16,4					100
3	79,7	20,3					100
4	88,4	11,6					100
5	86,5	9,1	4,4				100
6	84,6	9,2	6,2				100
7	79,7	10,4	9	0,5	0,4		100
8	57,1	6	36,3	0,4	0.2		100
9	64,2	9,3	18,9	0,3	6,4	0,8	0,1 100
10	74,8	3,4	16,2	0,4	4,6	0,6	100
11	77	8	15				100
12	72,5	8	19,5				100
13	77	8,1	14,9				100
14	82,9	10,8	6,3				100

De analyses 1—4 hebben betrekking op brongas, dat te Delft is opgevangen en door Oudemans werd geanalyseerd; van het eerste monster werd een volledige analyse gemaakt, van de andere drie de samenstelling uit het soortelijk gewicht berekend.

No. 5 geeft de samenstelling van het gas uit een put te Delft afkomstig, 6 en 7 van het gas dat in den tuin van het Mikrobiologisch Laboratorium te Delft, en dat uit eene diepte van 15 M. opborrelde, 6 werd verzameld in December 1896, 7 in September 1898.

No. 8 werd verstrekt door den heer Hoos te Kralingen, 9 door den heer Den Hertog te Oudshoorn, 10 door den heer 't Hooft te Aalsmeer, 11 door den heer Uitentuis te Purmer, 12 is afkomstig van eene bron in de Beemster, 13 van de kaasfabriek te Midden-Beemster en 14 van Boven-Karspel bij Enkhuizen.

De monsters 5, 6 en 14 werden door de heer M. van Breukeleveen te Delft geanalyseerd,

11 door Dr. J. E. Rombouts te Haarlem,

12 en 13 door Dr. J. D. Boeke te Alkmaar,

terwijl 7, 8, 9 en 10 op het Scheik. Lab. der Amsterd. Universiteit onder toezicht van Prof. H. W. Bakhuis-Rooseboom werden onderzocht.

Aanstonds valt in het oog, dat in de vier eerste analyses

geen stikstof is gevonden. Wellicht heeft Oudemans er niet naar gezocht.

De overige analyses vertoonen, zooals begrijpelijk is, geen volledige overeenstemming; bij de analyses 7—10 bijvoorbeeld vindt men niet onbelangrijke hoeveelheden waterstof opgegeven benevens een weinig kooloxyde. Bij de bespreking mijner eigen onderzoekingen zal ik aantoonen, dat het zeer onwaarschijnlijk is, dat deze twee gassen in het brongas kunnen voorkomen.

Het water, dat met het brongas opwelt, bevat vrij aanzienlijke hoeveelheden NaCl. (somtijds ± 700 mG. per l.) en Na_2CO_3.

Eenige analyses van zulke bronwateren volgen hieronder. De getallen geven milligrammen per liter aan.

No.	Vaste stof	gegloeid	K_2CO_3	KCl	NaCl	Na_2CO_3	$CaH_2C_2O_6$	$Ca_3P_2O_8$	$MgH_2C_2O_6$	$FeH_2C_2O_6$	$Al_2O_3 + SiO_2$
1	1973	1845		25,5	707	548	233	176	346		21
2	492	456			53		514		36,5	149	32
3	2890	2718	338		1560	456	66		311		21

No. 1 is verricht door Dr. Boeke te Alkmaar en bevat 652 c.M³ koolzuur per liter opgelost.

No. 2 door den heer N. van der Sleen te Haarlem van het water onder het veen in het Zwarteveld-kanaal bij Vogelenzang. 't Monster werd verstrekt door den ingenieur D. Drost. Het water bevatte een spoor NH_3, 56 m.G. $CaSO_4$, geen HNO_3.

No. 3. op het Scheik. Lab. te Amsterdam, onder toezicht van Prof. Bakhuis-Rooseboom. Het water bevatte 500 c.M³ koolzuur per liter, 2.3 m.G. NH_3, geen HNO_2, HNO_3, H_2SO_4 of H_3PO_4.

De samenstelling der grondsoorten, waaruit gas en water te voorschijn komen, geeft in 't algemeen weinig opheldering omtrent de vraag naar den oorsprong der gassen. Veelal bestaat volgens Lorié de grondlaag waaruit ze opstijgen, uitsluitend uit min of meer grof zand, fijn grint en kleine keitjes, zonder verdere organische bestanddeelen; in andere gevallen wordt schelpengruis, in nog weer andere houtgruis, meermolm of andere plantenresten aangetroffen. Wordt schelpengruis gevonden, dan ligt het eenigszins voor de hand te vermoeden, dat het brongas uit rottende schaaldieren is ontstaan, welke opvatting kan gesteund worden door het feit, dat phosphorzuur,

afkomstig van de schelpkalk, in niet onaanzienlijke hoeveelheid in het bronwater wordt aangetroffen. Treft men daarentegen plantenoverblijfselen aan, dan zoude de cellulosegisting als oorzaak van het ontstaan van het brongas kunnen worden beschouwd.

Reeds is bij eene vluchtige beschouwing der geologische kaart te zien, dat de terreinen in Noord-Holland en Friesland, waar brongas voorkomt, hetzij in, hetzij niet ver van het groote laagveengebied gelegen zijn.

Waarschijnlijk is het volgens Lorié, dat het gas, dat zich uit dat veen ontwikkelt, in het grondwater oplost en wordt weggevoerd, waarbij dan het grove zand en fijne grint, al of niet met schelpen- of plantengruis vermengd, slechts een mechanischen rol speelt, in zooverre, als het water zich daarin gemakkelijk verzamelt en voortbeweegt.

In het geheele brongasterrein heeft men met slechts een drietal grondsoorten te maken en wel met veen, zand en klei.

Het veen komt tot op een diepte van 19 M. beneden A. P. voor, maar nooit in een doorloopende laag. De aanzienlijkste dikte, die tot nu toe bekend is, bedraagt 10 M. (Feijenoord.)

Ontwikkelt zich het brongas nu inderdaad uit dat veen, dan moet het dus in water opgelost naar de grootere diepten van 30—80 M. medegevoerd zijn, om daar te worden aangetroffen zooals bij het boren van Nortonpompen het geval is.

Men zoude hiertegen kunnen aanvoeren, dat de kleilaag beneden de veenmassa's voor het bronwater eene hinderpaal oplevert bij de neerwaartsche beweging. Dit bezwaar blijkt echter niet steekhoudend te zijn, want:

1e is deze (oude zee-) klei soms vrij zandering en laat zij dan nog water door.

2e reikt het veen meermalen tot onder de klei.

3e is de bovenvlakte van het onderliggende zand golvend en puilt het somwijlen door de klei heen, waardoor eene verbinding tot stand komt tusschen het grondwater boven en beneden de klei.

In alle deze gevallen zal de kleilaag slechts ten deele de beweging van het bronwater naar dieper zandlagen belemmeren.

Voorbeelden hiervan vindt men o. a. te Alkmaar, Aalsmeer, IJmuiden, Haarlem, Vogelenzang en Katwijk.

Vulkaangassen. Het is niet mijne bedoeling te trachten een overzicht te geven van de uitgebreide literatuur, welke over dit onderwerp beschikbaar is. Volledigheidshalve zullen echter eenige mededeelingen van waarnemingen omtrent de samenstelling van enkele vulkanische gassen gegeven worden.

Door vulkanen, geysirs en heete bronnen geraken belangrijke hoeveelheden brandbare gassen in de atmospheer. Hoewel de brandbare bestanddeelen uit de meeste krachtig werkende vulkanen reeds in den krater verbranden en dus voor den onderzoeker verloren gaan, komen die van kalmwerkende vulkanen geysirs, slijkvulkanen en onderzeesche vulkanen als zoodanig in den dampkring en kunnen zij geanalyseerd worden. Verscheidene onderzoekers hebben zich met het onderzoek van deze gassen beziggehouden.

Zoo heeft Bunsen [1]), gedurende zijn verblijf op IJsland, veel materiaal op dit gebied verzameld. Enkele van zijn analyses zijn hieronder gegeven.

Samenstelling van het gas uit de kokende modderkraters van den Krusivik.

Waterdamp 82 %.

De overige 18 % bestonden uit

87,43 % CO_2
6,60 % H_2S
4,30 % H_2
1,67 % N_2

De hoeveelheid brandbaar gas in het mengsel, dat door dezen vulkaan wordt geleverd, is dus zeer gering.

Toch stroomden uit de slijkvulkanen van den Krusivik, volgens schatting van Bunsen, ± 223 K.G. zwavelwaterstof en ± 12 K.G. of 130 M^3 waterstof per dag. Daar deze hoeveelheid door slechts één vulkaan wordt geproduceerd, zal de massa brandbare gassen, welke door de vele vulkanen der aarde in den damkring wordt gevoerd, zeer aanzienlijk zijn.

---

[1]) Poggendorff's Annalen B. 83 S. 197.

Veel rijker aan waterstof is het gas uit een vulkaan bij Reykjahlidl, in 't Noorden van IJsland.

N_2	0,72 %
CO_2	50 %
H_2S	24,12 %
H_2	25,14 %

Met het water der geysirs ontsnappen eveneens belangrijke gasmassa's;

Samenstelling van het gas van den Grooten Geysir:

N_2	84,11
CO_2	8,92
H_2	6,59
H_2S	0,38
CO	—
CH_4	—
O_2	—

In al deze vulkanische gassen vinden we WATERSTOF en geen methaan.

Van de gassen, welke met het water van minerale bronnen boven komen, bepaalde BUNSEN eveneens de samenstelling; ze bevatten methaan, WATERSTOF, koolzuur, zwavelwaterstof en stikstof.

Door FOUQUÉ [1]) zijn gassen geanalyseerd, welke gedurende de uitbarstingen van den vulkaan Santorin in Mei 1866 en Februari 1867 werden ontwikkeld. Daar de kratermond beneden den zeespiegel ligt, werd de lucht verhinderd tot den krater door te dringen, zoodat de gassen door het zeewater opborrelden.

In de meeste dezer gassen waren waterstof, methaan, zuurstof en stikstof aanwezig, zooals uit de volgende voorbeelden blijkt:

Gassen nabij het centrum van den vulkaan opgevangen.		Gassen boven de lava-afvloeiïngen opgevangen.	
SO_2	Spoor		
CO_2	37,04	CO_2	0,00
H_2	27,10	H_2	1,94
CH_4	0,43	CH_4	1
O_2	0,41	O_2	25,94
N_2	35,02	N_2	72,12

[1]) Santorin et ses éruptions, Paris 1897 p. M. FOUQUÉ.

We zien, dat in deze gassen methaan en waterstof naast elkaar voorkomen.

De waterstof ontbreekt echter geheel in de gassen, welke nog verder van den hoofdhaard ontwikkeld werden. FOUQUÉ merkte op, dat de verhouding tusschen waterstof en methaan, in de gassen uit één krater ontweken, verandert met de hevigheid der werking. Wordt deze minder, dan neemt het koolzuurgehalte toe, dat der brandbare gassen af, terwijl het methaangehalte toeneemt ten opzichte van dat der waterstof.

Ook in *Italië* verrichtten FOUQUÉ en GORCEIX [1]) een groot aantal onderzoekingen omtrent de samenstelling van vulkanische gassen, welke uit kraters, spleten en bronnen ontweken.

Eenige van hunne resultaten zijn hieronder medegedeeld.

	CO_2	N_2	CH_4
Baigazzio	1.58	1.81	96.61
Monte creto	0.53	1.22	98.25
Pietra mala Vulcano	1.54	2.27	96.19
Pietra Acqua buja	0.74	0.41	98.85

Men ziet, dat de gassen een bijzonder hoog methaangehalte bezitten, terwijl de waterstof ontbreekt; ze ontwikkelden zich uit minerale bronnen, welke groote hoeveelheden Na Cl en Na_2CO_3 opgelost bevatten en eene temperatuur van $\pm$ 100° bezaten. Somtijds werden ook hoogere vloeibare koolwaterstoffen aangetroffen.

In de lagunen van TOSCANE stroomden gassen bij gewone temperatuur uit den bodem, waarvan de samenstelling evenals de temperatuur nog geheel dezelfde waren als dertien jaar geleden, toen SAINT CLAIRE DEVILLE en F. LEBLANC [1]) ze analyseerden, hetgeen zeker eene aanwijzing is voor hun vulkanischen aard.

De analyses zijn hieronder weergegeven.

	H_2S	CO_2	N_2	H_2	CH_4
Larderello	4.20	90.47	1.90	1.43	2.00
Castel maniovo	3.76	92.63	1.08	0.90	1.63
Sasso	5.43	88.33	1.55	2.01	2.55
Serrazzano	6.10	87.90	2.93	2.10	0.97

[1]) Compt. rend. T LXIX 1869.

Deze gassen bevatten dus ook *waterstof*.

In de streken der naphtabronnen worden eveneens veel brandbare gassen aangetroffen; zoo stroomen in de omstreken van Baku uit aardspleten massa's methaan en andere koolwaterstoffen; ze verbranden als machtige vuurstralen en zijn de bedevaartplaatsen van de godsdienstige secte der Parsivuuraanbidders.

Op de schiereilanden *Kertsch*, *Apscheron* en *Taman* worden analoge uitstroomingen waargenomen; ook de moddervulkaan van *Boulganak* en de gasbronnen bij *Jenikale* geven gassen met ongeveer 95 % methaan. De gassen uit deze streken bevatten geen of slechts sporen waterstof.

In 't algemeen kan men dus opmerken, dat de gassen van vulkanischen oorsprong zoowel methaan als waterstof bevatten, terwijl de meeste onderzoekers in de gassen van organischen oorsprong alleen methaan en geen waterstof konden aantoonen.

---

[1]) St. Claire Deville et F. Leblanc. Mémoire des savants étrangers. Cit. C. r. T. LXIX. 1869.

HOOFDSTUK II.

Onderzoekingen naar de wijze van het ontstaan van methaan en waterstof van organischen oorsprong.

§ 1. Waterstof als produkt van de pektosegisting.

De oorsprong van de hoofdmassa brandbare gassen, welke zich voortdurend in de natuur ontwikkelen, moest toegeschreven worden aan de rotting van afgestorven plantendeelen. Dit was langzamerhand de meening geworden, welke algemeen ingang gevonden had.

Tal van onderzoekers hebben zich bezig gehouden met de bestudeering van de omzettingsprocessen, die deze plantendeelen in de natuur ondergaan.

Reeds in 1850 verscheen van de hand van Mitscherlich [1]) eene mededeeling over de aantasting van vruchten en knollen door rotting in water; hij had opgemerkt, dat aardappelschijven in water gebracht, na eenige dagen uiteenvallen en eindelijk bijna geheel verdwijnen. Aan dit verschijnsel gaf hij de volgende verklaring: Na voorafgaande opzwelling lossen de wanden der cellen gedeeltelijk onder gasontwikkeling op; hierdoor worden de schijven uit elkaar gedreven; het zetmeel en de overige celdeelen zakken op den bodem, waar het rottingspoces langzaam voortschrijdt, tot het zetmeel en het grootste deel der celwanden zijn verdwenen. Na filtratie van zulk eene aardappelrotting, blijft eene vloeistof vol „vibrionen" over, in welke nieuwe aardappelschijven zeer snel worden aangetast.

Mitscherlich spreekt het vermoeden uit, dat deze „vibrionen' het uiteenvallen van het celweefsel van den aardappel veroorzaken en de cellulosewanden aantasten.

---

[1]) Ueber die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle. Berichte der Berl. Akademie. 1850. S. 102.

Bij eene studie over melksapvaten in plantenweefsels, bemerkte TRÉCUL, [1]) dat wanneer hij melksaphoudende plantendeelen in water te weken zette, in deze vaten daarvan „*des corpuscules amili fères*" ontstonden, welke door jodium blauw gekleurd werden, om welke reden hij daaraan den naam *amylobacter* gaf.

Naar den vorm werden door hem drie soorten onderscheiden n.l.: *amylobacter vrai*, *clostridium* en *urocephalum*. Hoewel TRÉCUL later, naar aanleiding van waarnemingen van NIJLANDER moest erkennen, dat deze lichaampjes bacteriën waren, bleef hij vasthouden aan de theorie der heterogenesis.

VAN TIEGHEM [2]) deed soortgelijke onderzoekingen als MITSCHERLICH; hij nam verschillende vruchten, en stelde deze aan den invloed der bacteriënwerking bloot. Ook hij komt tot de overtuiging, dat de amylobacters als cellulosevergistende fermenten moeten worden beschouwd.

Analoge resultaten verkreeg CORNU met deelen van waterplanten, terwijl DUCLAUX de aanwezigheid van de amylobacters in menschen-faeces constateert, als ook in de pens van herkauwers en in den krop van vogels. Intusschen had PRAZMOWSKI [3]) geconstateerd, dat de amylobacters suikers en amylum tot boterzuur vergisten en uit dit feit besluit hij tot de identiteit van dit ferment en een, waarvan deze eigenschap reeds vroeger door PASTEUR [5]) was vastgesteld n.l. het *vibrion butyrique*.

Terzelfder tijd had echter VAN TIEGHEM [6]) deze gistingen nader uitgewerkt; hij was tot de volgende rusultaten gekomen. De bacterie, welke het verschijnsel der gisting veroorzaakt, is beweeglijk en in staat de cellulose te vergisten. Jonge weefsels worden door haar geheel vernietigd; oudere echter niet volkomen. „Ce qui résiste encore", zegt van Tieghem, „ce sont plusieurs tissus, où la cellulose s'est pourtant conservée pure, comme les fibres du liber (on extrait les fibres textiles par le rouissage; s'est à dire par l'action en grand des amylo-

[1]) Compt. rend. 1865 LXI. 1867 LXV.
[2]) C. r. T. LXXXVII. 1893.
[3]) C. r. T. LXXXVIII 1873.
[5]) Etudes sur la biére p. 268.
[6]) C. r. T. LXXXIX 1879.

bacters), comme les laticiféres (on les sépare par la macération, qui est encore l'oeuvre des amylobacters), comme la moelle des tiges à partir d'un certain âge" etc.

Behalve cellulose vergist de amylobacter eveneens stijfsel, dextrine, glucose, rietsuiker, dextran, arabinose, lichénine, lactose, manniet, glycerine, lactaten, malaten, citraten; waardoor de identiteit van de hier werkzame bacterie met het vibrion butyrique van PASTEUR nog waarschijnlijker was geworden.

Bij de meeste dezer gistingen ontstaat boterzuur onder ontwikkeling van koolzuur en waterstof. Van TIEGHEM had dus gevonden, dat de aantasting door deze bacterie, zich uitstrekt, „à un grand nombre de substances diverses, et qu'il se montre ainsi comme le ferment le plus général de la nature. Il est le ferment butyrique par excellence et c'est directement à lui que viennent s'appliquer tous les resultats des belles expériences de M. PASTEUR sur la vie sans air du vibrion butyrique."

Algemeen beschouwde men de amylobacter van VAN TIEGHEM als het cellulose ferment; echter hebben latere onderzoekers, vooral BEIJERINCK, WINOGRADSKI en OMELIANSKI bewezen, hoe weinig juist de verklaringen van bovengenoemde waarnemingen waren, hetgeen zeker te wijten is aan het feit, dat van TIEGHEM en zijne tijdgenooten, met gecompliceerde bacteriënmengsels experimenteerden en niet met reinkulturen; evenmin verschaften ze zich door exclusieve ophoopingen, bacteriëngroepen, welke bepaalde eigenschappen gemeen hebben.

Terwijl de reeds genoemde onderzoekers alleen met ruwkulturen experimenteerden, trachtte VAN SENUS [1]) in 1890 voor 't eerst de cellulose fermenten te isoleeren. Hij slaagde er in eene reinkultuur van amylobacter uit eene cellulose gisting te verkrijgen en *met de reinkultnur bewees hij, dat deze mikrobe niet in staat is de cellulose aan te tasten.*

De vele proeven met deze bacterie in boonen, erwten en andere zaden geënt, gaven hem de overtuiging, dat de *celwanden* alszoodanig achterbleven, terwijl het zetmeel en celsap vergistten. Ook slaagde hij er niet in, cellulose in een van

[1]) Bijdrage tot de kennis der cellulose gisting 1890.

de vele kultuurbodems, welke hij gebruikte, met de reinkultuur dezer bacterie in gisting te brengen.

In symbiose, met een zeer kleine bacil, geïsoleerd uit het darmkanaal van een konijn, zou de amylobacter, volgens Van Senus, eene langzame oplossing der cellulose kunnen bewerkstelligen. De kleine bacterie was alleen niet in staat cellulose aan te tasten.

De vroegere onderzoekers maakten bij hunne proefnemingen geen onderscheid tusschen de samenstelling der verschillende lagen waaruit de wanden der plantencellen zijn opgebouwd en zoodoende werden de cellulose- en pectosegisting niet van elkander onderscheiden. Na eenige voorloopige onderzoekingen door Winogradski [1]) over de aantasting van de plantencelwanden door mikroben, heeft Beijerinck [2]) scherp het groote verschil tusschen deze gistingen in het oog doen springen.

In de verhandeling van Beijerinck en Van Delden over de vlasroting zien we de onduidelijke resultaten der oudere onderzoekers tot klaarheid komen; bij het rootproces zijn dezelfde bacterieën werkzaam als die, welke de aantasting van den aardappel en de vruchten veroorzaken. In deze stude zijn de levensvoorwaarden van de specifieke rotingsbacterieën beschreven; bovendien is eene ophoopingsproef voor deze mikroben in den vlasstengel gegeven, waardoor het mogelijk is geworden, het rootproces ook in het groot rationeel in te richten.

Het bleek nu, dat het vlasroten en ook het uiteenvallen van den aardappel en de vruchten veroorzaakt wordt door het oplossen der pectoselamellen, welke de cellulosewanden van elkander scheiden. Dit oplossen komt tot stand door een enzym, de *pectosinase*, hetwelk wordt afgescheiden door een amylobacter, waaraan professor Beijerinck den naam *Granulobacter pectinovorum* heeft gegeven.

Deze bacterie tast de cellulose niet aan maar geeft aanleiding tot eene boterzuurgisting, waarbij koolzuur en waterstof en geen methaan ontstaan.

---

[1]) C. r. T. 121 p. 742 1895.

[2]) Archives Néerlandaises des Siences Exactes et Naturelles. Serie II, Tome IX p. 418.

Door deze verhandeling is dus aangetoond, dat de proeven van Mitscherlich, Trécul, Cornu, Prazmowski en Van Tieghem, niet op de cellulose maar op de pektosegisting betrekking hebben.

Gaan we thans over tot de bespreking der eigenlijke cellulosegisting, die vooral is bestudeerd door Popoff, Tappeiner, Gayon, Schloesing, Hoppe-Seyler en Omelianski.

§ 2. Oudere onderzoekingen.

Methaan en Waterstof als produkten der cellulosegisting.

Leo Popoff. Leo Popoff [1]) onderzocht het eerst de gisting van modder in het laboratorium. Hij gebruikte hiervoor modder van een straatriool, die hij met water verdunde, in kolven deed en daarna kultiveerde bij verschillende temperatuur. De gassen, welke uit deze kolven ontwikkelden, bestonden meestal uit methaan en koolzuur; een enkele keer vond hij ook waterstof.

De snelheid, waarmede het gistingsproces in de kolf verliep, bleek afhankelijk te zijn van de temperatuur; bij 13°—18° komt eene hoeveelheid modder sneller tot gisting en geeft zij meer gas in denzelfden tijd als eenzelfde hoeveelheid van dezelfde modder bij eene lagere temperatuur. De beste temperatuur voor de moddergisting bleek ± 40° te zijn.

Teneinde na te gaan, welke verbindingen in de modder bij hunne ontleding de gasproduktie tengevolge hebben, voegde Popoff daaraan verschillende stoffen toe; uit de resultaten van deze proeven volgde, dat slechts cellulose of daarmede in samenstelling overeenkomende stoffen methaan en koolzuur ontwikkelen terwijl glucose en amylum tot waterstofvorming aanleiding geven.

Merkwaardig zijn de proeven over den invloed van cyaankalium, kaliumchloraat, carbol, chloroform, strychnine en andere op de gisting. Vooral de werking der laatstgenoemde verbinding is zeer frappant, zoo bemerkte hij, dat eene zeer kleine hoeveelheid strychnine in de gistingskulturen zeer gunstig werkt, grootere porties echter een storenden invloed uitoefenen; het-

---

[1]) Ueber die Sumpfgasgährung. Archiv. für die Gesammt-Physiologie. 1875. X. 113.

geen Popoff aanleiding geeft de werking van de strychnine op de mikroben te vergelijken met de energische prikkeling, welke ze uitoefent op het zenuwstelsel der hoogere wezens.

Er is echter te veel onzekers in zijne proeven om groote waarde aan de resultaten te hechten; zoo vulde hij somtijds de gistingskolven slechts gedeeltelijk, waardoor het bepalen van methaan of waterstof in het gasmengsel, dat gedurende de gisting werd opgevangen, onnauwkeurig werd; verder hadden de gistingen plaats IN HET LICHT, waarvan het gevolg was, dat een rijke algengroei zich ontwikkelde, waardoor voortdurend zuurstof in de kultuurvloeistof vrijkomt en aan tal van aerobe bacteriën gelegenheid tot groei wordt gegeven.

Het is dan ook geen wonder, dat de verschillende proeven van Popoff geen overeenstemmende resultaten opleverden, aangezien de boven aangeduide factoren tot zeer gecompliceerde processen aanleiding moesten geven, zoodat de eigenlijke cellulosegisting zich daarbij niet scherp liet bestudeeren.

Toch maken reeds de onderzoekingen van Popoff het zeer waarschijnlijk, dat methaan als gistingsprodukt van de cellulose moet worden beschouwd.

Door de studie van de samenstelling en het ontstaan der darmgassen van verschillende dieren, komt H. Tappeiner [1]) tot de slotsom, dat de cellulose door georganiseerde fermenten, in waterstof, methaan, koolzuur en vluchtige vetzuren uiteenvalt.

De hoeveelheid en de samenstelling is afhankelijk van den aard van het genuttigde voedsel; bij de planteneters is de hoeveelheid gas belangrijk grooter dan bij de vleeschetersen aangezien een aanzienlijk gedeelte der cellulose in het darmkanaal der planteneters wordt verteerd [2]), meende Tappeiner de celluloseontleding als bron voor de darmgassen te mogen aannemen; door zijne onderzoekingen is dit vermoeden bewaarheid.

---

[1]) Ber. der Deutsch Chem. Gesellsch. Bd. XIV S. 2375. Bd. XV S. 999 en S. 2267. Bd. XVI S. 1734 en 1740.

[2]) Haubner Zeitschr. f. Landwirtsch. 1855 S. 177.
Henneberg und Stohmann. Beiträge zür Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkauern. 1860 en 1864.

De darmgassen werden onmiddellijk na den dood van het dier zorgvuldig opgevangen en geanalyseerd, terwijl de darminhoud onder omstandigheden, welke zoo nauw mogelijk met die van het lichaam overeenkomen, aan eene nagisting werd onderworpen. Zijne voornaamste resultaten, in tabellen vereenigd, worden hieronder weergegeven.

DARMGASE DES PFERDES BEI HEUFÜTTERUNG.

		Magen.	Dünndarm		Blind-darm.	Grimm-darm.	Mastdarm
			Anf.	Ende.			
Direct aufgefangen.	CO_2 / H_2S	75,20	42,70	15,65	85,47	55,18	29,19
	H_2	14,56	19,38	24,06	2,33	1,69	0,83
	CH_4	9,99			11,16	32,73	56,62
	N_2		37,44	59,62	0,90	9,99	13,44
Durch Gärung erhalten.	CO_2			80,6	85,40	70,49	
	H_2			15,65	0,50	——	
	CH_4			0,09	13,40	26,08	
	N_2			3,66	1,20	3,43	

DARMGASE DES RINDES BEI HEUFÜTTERUNG.

		Pansen.	Dünndarm.			Dickdarm.	Mastdarm.
			Anfang.	Mitte.	Ende.		
Direct aufgefangen.	CO_2 / H_2S	65.27	17.69			36.35	14.46
	H_2	0.19	3.96			2.29	
	CH_4	30.55	49.15			38.21	44.23
	N_2	3.99	29.26			23.14	41.31
Durch Gärung erhalten.	CO_2 / H_2S	75.47	62.06	81.65	92.33	80.84	
	H_2	0.07	37.64	17.60	0.01		
	CH_4	23.27	0.41		6.59	17.25	
	N_2	1.31		0.71	1.20	1.97	

De in de gassen aanwezige stikstof zal waarschijnlijk afkomstig zijn van de bij de voedselopname medegevoerde lucht.

Ook bij andere dieren als ganzen, konijnen en varkens

bevatten de darmgassen methaan, vooral bij voeding met kool of andere groenten. Hetzelfde geldt voor den mensch. [1])

Teneinde te onderzoeken, of het oplossen der cellulose geschiedt door georganiseerde of ongeorganiseerde fermenten, werden gelijke deelen pens-, dunnedarm- of dikkedarminhoud, met en zonder antiseptica, eenigen tijd bij lichaamstemp. geplaatst, terwijl een derde evengroot gedeelte gekookt werd.

In het gekookte deel en in dat hetwelk een antisepticum bevatte, was de hoeveelheid cellulose na eenigen tijd dezelfde, terwijl daarentegen in het gedeelte, waarin de gisting door bacteriënwerking kon voortgaan, 35% der cellulose verdween.

Er zouden dus blijkbaar geen cellulosesplitsende enzymen in het darmkanaal worden afgescheiden. Uitgaande van de onderstelling, dat de gisting der cellulose buiten het darmkanaal op dezelfde wijze zou verloopen als daarbinnen, verrichtte TAPPEINER nog de volgende proeven. Hij infecteerde kultuurvloeistoffen, welke uit 1% cellulose en 1% vleeschwater in leidingwater bestonden, met een weinig pensinhoud en kultiveerde bij 38—40°. Na eenige dagen begon de kultuur te gisten; de gassen, welke bij deze gisting werden ontwikkeld, bestonden òf uit methaan en koolzuur, òf uit waterstof en koolzuur. Hij constateerde dus het feit, dat de cellulose aanleiding kan geven tot twee verschillende gistingen en wel ten eerste eene methaangisting en ten tweede eene waterstofgisting. Traden een enkele keer beide gistingen gezamenlijk op, dan verdween toch na eenigen tijd de waterstof en bestond het verder opgevangen gasmengsel uit methaan en koolzuur. Het liet zich alzoo aanzien alsof er twee fermenten zouden zijn, waarvan het eene de cellulose afbreekt onder waterstof- en koolzuur-, het andere onder methaan- en koolzuurontwikkeling.

Eene scheiding van beide processen meende TAPPEINER gevonden te hebben door de alkaliteit van den voedingbodem, te regelen. Zoo zou de waterstofgisting optreden 1e. indien de kultuurvloeistof met 1% cellulose, 1% vleeschwater, *zwak alkalisch was*.

[1]) RUGE, Sitzungsber. der Wiener Academie Math. Nat. Wiss. Classe Bd. 42 1860. Die Gase des Verdauungsschlauches etc. citaat uit Archiv f. ges. Physiol. 1875 Bd. X.

2e. indien aan eene oplossing 1% cellulose ½% vleeschwater *de Nägeli'sche zoutoplossing wordt toegevoegd*, n.l.

0.2% K_2HPO_4.
0.04% $MgSO_4$.
0.02% $CaCl_2$.

3e. indien aan deze nog 0,35% ammoniumacetaat, 0,3% aceetamid of 0,6 asparagine wordt toegevoegd.

De methaangisting daarentegen zou in neutrale oplossingen alleen kunnen plaats hebben. Over deze verschillende manieren om de cellulosewaterstofgisting te scheiden van de cellulosemethaangisting spreekt TAPPEINER later minder beslist.

TAPPEINER stelde zich de vraag of het mogelijk kon zijn, dat het methaan niet afstamde van de toegevoegde cellulose, maar misschien ontstond uit de andere in de vloeistof aanwezige stoffen.

De resultaten zijner proeven zijn de volgende:

Vleeschwater, met rioolmodder geïnfecteerd, vergist tot methaan en koolzuur.

Samenstelling van 't gas.

Na 1 week.		Na 3 weken.		Na 6 weken.	
CO_2 + H_2S	23,95	CO_2 + H_2S	21,43	CO_2	15,34
H_2	0,43				
CH_4	74,75	CH_4	77,87	CH_4	84,66
N_2	1,15	N_2	0,84		

Rioolmodder zelf vergist eveneens tot methaan onder vorming van:

CO_2	25,29
CH_4	72,89
N_2	1,78

Eene oplossing bestaande uit: leidingwater 100, *planteneiwit* 1%. Nägeli'sche zoutopl., geïnfecteerd met een weinig rioolmodder gaf:

Na 1 week.		Na 2 weken.	
CO_2 / H_2S	36,46	CO_2 / H_2S	33,23
CH_4	63,54	CH_4	66,77

De contrôleproef zonder eiwit gaf slechts sporen gas.

Uit 100 leidingwater met 1,5 % pepsinfibrinpepton + Nägeli'sche opl. ontwikkelde zich na 4 weken 153 c.c. gas.

CO_2 / H_2S	25,42
CH_4	72,56
N.	2,36

Uit deze proeven bleek, dat ook eiwitten tot methaangisting aanleiding kunnen geven, evenals rioolmodder alleen. Dat cellulose echter ook tot methaan, resp. waterstof en koolzuur kan vergisten, toonde TAPPEINER eveneens aan.

Voor TAPPEINER waren reeds door HAUBNER [1]), welke in 1855 het verdwijnen van cellulose in het darmkanaal aantoonde, en door HENNEBERG, STOHMANN [2]), WEISKE [3]), KNIERIEM [4]) en anderen, waarnemingen gedaan, volgens welke een niet onbelangrijk procentgehalte der cellulose uit het voedsel aan de dieren als zoodanig ten goede komt. Zelfs van de eigenlijke cellulose weten sommige planteneters nog goed partij te trekken.

Zoo verteeren, volgens MAC GILLAVRY, ossen 60 % ruwvezel uit grashooi; runderen, volgens HAUBNER, 30 %—34 %, terwijl HOFMEISTER bepaalde, dat schapen 54—58 % ruwvezel verteeren.

KNIERIEM gaf aan konijnen papiervezels te eten, waarvan 54,3 % en linnengoed, waarvan 49,5 % nuttig verbruikt werden. De mensch verteert 25,32 % ruwvezel uit kropsalade, echter is hij niet in staat eenig profijt te trekken van filtreerpapier, noch van watten; misschien kan de mensch alleen pectose assymileeren.

---

[1]) Zeitschr. f. Landwirtsch. 1855.

[2]) Beiträge zür Begründung einer Rationellen Fütterung der Wiederkauern 1860 en 1864.

[3]) Zeitschr. f. Biologie 1870 VI.

[4]) Zeitschr. f. Biologie XXI.

De wijze van ruwvezelbepaling heeft echter grooten invloed op de cijfers, welke het verbruik der cellulose in het darmkanaal aangeven.

Onder ruwvezel wordt volgens KNIERIEM het gedeelte der plantendeelen verstaan, dat overblijft na behandeling met 1¼ %ig zwavelzuur en daarna met 1¼ %ige kaliloog, uitwasschen met water en drogen met aether en alcohol.

Dat deze wijze van ruwvezelbepaling groote fouten aankleven, werd door verscheidene onderzoekers bewezen.

Zoo toonde KERN aan, dat van de normale cellulose ± 8.6 % verdwijnt door deze wijze van werken; echter wordt door koken met 1¼ %ig zuur, volgens ARONSTEIN, [1]) geen cellulose opgelost.

Er zijn verschillende methoden van ruwvezelbepaling beproefd, welke alle meer of min zuivere uitkomsten leveren; noemen we slechts de salpeterzuur-kaliumchloraat-methode van SCHULZE, de sulfietmethode van MITSCHERLICH, en de broomwatermethode van MÜLLER. De meeste ruwvezelbepalingen geschiedden volgens de methode van KNIERIEM.

Na Tappeiner's onderzoekingen is men omtrent de enzymwerkingen in het darmkanaal niet veel wijzer geworden en toch lijkt het onmogelijk aan te nemen, dat de geweldige hoeveelheden door de planteneters verbruikt, door het bacteriënproces in zoo korten tijd zouden worden omgezet, waarbij dan enorme massa's methaan en koolzuur zouden vrijkomen. Zulke buitensporige gasprodukties worden bij de planteneters niet waargenomen; de gasontwikkeling is bij hen zeer ondergeschikt en het groote methaanproces staat daarom niet direct met de ontleding in het darmkanaal in verband.

Veeleer ligt het voor de hand aan te nemen, dat de cellulose grootendeels door hydrolyse in den darm tot suikers wordt omgezet, en als zoodanig het lichaam ten goede komt.

Zekerheid omtrent de wijze, waarop de cellulose in het darmkanaal der planteneters verdwijnt en het dier tot voedsel strekt, hebben we nog niet; spreken we de hoop uit, dat over deze hoogstbelangrijke kwestie spoedig licht worde verspreid.

---

[1]) Journal für Landwirtsch. 1866.

Hoppe-Seyler. [1]) Hoppe-Seyler en Omelianski bepaalden zich, bij hunne onderzoekingen over het cellulosevraagstuk, tot de afbreking der normale, der eigenlijke cellulose [2]). De voedingsbodems bevatten als koolstofbron slechts cellulose in haar meest onaantastbaren vorm; de andere elementen werden als minerale zoutèn toegevoegd. Het behoeft geen betoog, dat in deze oplossingen slechts de meest krachtige cellulose-splitsende bacteriën zich direct kunnen vermeerderen.

Aan de rationeele keuze van den voedingsbodem, de nauwkeurige chemische onderzoekingen der ontledingsproducten en aan de groote volharding, met welke de studie is voortgezet, is het te danken, dat Hoppe-Seyler l.c. er in slaagde, den aard en het verloop der gisting te bepalen.

Hij ging, alvorens het proces in het laboratorium in studie te nemen, de verspreiding van de methaanontwikkeling in de natuur na en kwam, evenals Volta, tot de slotsom, dat ze overal plaats heeft, waar plantendeelen in rotting zijn overgegaan.

De analyses van eenige door hem opgevangen gasmonsters heb ik blz. 4 opgegeven. Zij bevatten methaan 50—70%, waterstof 2—10%, koolzuur 0—2%, stikstof 20—50% en zuurstof 0—1,5%.

Geheel andere samenstelling hebben de gassen, welke ontwikkeld worden bij proefneming met modder in een afgesloten ruimte. Het koolzuurgehalte neemt gedurende de proef steeds toe, totdat de verhouding tusschen de volumina methaan en koolzuur ongeveer 2 : 1 is. De stikstof is na een week uit de gassen verdwenen, vormt zich alzoo niet gedurende de gisting maar was in de modder als atmospherische stikstof aanwezig.

Zuurstof wordt in 't geheel niet waargenomen.

---

1) Zeitschrift für Physiologische Chemie. 1886 Band X Heft 3. 1886 Band X Heft 5.

2) Onder normale cellulose wordt die cellulose verstaan, waaruit de vezels van het vlas, de hennep, het katoen enz. zijn opgebouwd en welke we ons in den vorm van het Zweedsche filtreerpapier gemakkelijk zuiver kunnen verschaffen. Ze wordt onder de cellulosesoorten het moeilijkst gehydrolyseerd en geoxydeerd.

Modder uit de Ill bij Straatsburg, in een kolf gebracht, vergistte tot een gasmengsel van de volgende samenstelling:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	4	7	14	21	40	79	115	121dagen
CO_2	16,80	21,75	25,79	26,37	28,82	32,14	36,27	37,69
CH_4	79,38	77,34	74,21	73,63	71,18	67,86	63,73	62,31
N_2	3,85	0,91						

Ik wijs er nog eens opnieuw op, dat bij al deze analyses de waterstof ontbreekt.

Den 2den Dec. 1881 zette Hoppe-Seyler een beslissende proef in over de vraag, of de cellulose als een bron van methaanvorming moet worden beschouwd. 25,77 gram cellulose werden in een kolf van ± 1 l. met 700 c.c. water en een weinig modder bij kamertemperatuur ter gisting gezet onder afsluiting van 't licht. De kolf was door een gummistop met buis gesloten; de gevormde gassen werden door de buis geleid en boven kwik opgevangen.

Het gloeiverlies van eene even groote hoeveelheid van dezelfde modder, als waarmede de infectie had plaats gehad, bedroeg 0,6139 gr., welke als cellulose in rekening gebracht, de totale kwantiteit cellulose op 26,384 gr. zou brengen.

De zoo verkregen kultuur gistte regelmatig; na één jaar was de hoeveelheid koolstof, in de opgevangen gassen, meer dan mogelijkerwijze uit de modder alleen kon zijn ontstaan.

Totaal werden in *de 4 jaren, welke deze proef duurde*, 3281 c.c. koolzuur en 2570 c.c. methaan opgevangen, vertegenwoordigende een gewicht van 3.1387 gram koolstof. Uit de cellulose heeft dus blijkbaar de gasontwikkeling grootendeels plaats gehad.

Van 26 Nov. tot 6 Dec. leverde de kolf geen gas meer en werd daarom geopend; de inhoud bestond uit een kleurlooze neutrale vloeistof en een bezinksel; bevatte slechts een weinig organische stof, geen alcohol, aceton of zuren.

In het bezinksel waren nog 11.4 gr. cellulose over, zoodat rond *15 gr. cellulose waren vergist*, waaruit 12.2775 l. CO_2 en CH_4 hadden kunnen ontstaan, terwijl slechts 5.852 l. zijn opgevangen, overeenkomend met 7 gr. cellulose.

Dit groote tekort meende H.-S. aan verliezen door tijdelijk niet opvangen en 't ontsnappen van gas, gedurende het verwisselen der opvang-apparaten, te moeten toeschrijven.

Daar de volumina CO_2 en CH_4 ongeveer gelijk zijn, zou de gisting kunnen worden voorgesteld door de formule:

$$C_6 H_{10} O_5 + H_2O = C_6 H_{12} O_6.$$
$$C_6 H_{12} O_6 = 3 CO_2 + 3 CH_4,$$

waarbij suiker hypothetisch als tusschenprodukt aangenomen wordt.

Hoppe-Seyler zegt naar aanleiding van deze proeven:

„Durch diese Versuche habe ich die volle Gewissheit erhalten, dass bei der Gärung von Cellulose mit Schlamm aus Flüssen nur Kohlensäure und Methan entstehen".

Bij een tweede onderzoek voegde Hoppe-Seyler naast 12,150 gr. filtreerpapier, 34,400 gr. gips en 16,00 gr. ijzeroxyd toe. Na infectie met riviermodder begon 2½ maand later de gisting, welke ongeveer een jaar aanhield. Gedurende dit tijdsverloop waren 417.5 cc. koolzuur en 246.5 cc. methaan geleverd uit 5.8051 gram cellulose; in de kultuur waren 14.5 gram $CaSO_4$ tot $CaCO_3$ omgezet, terwijl 7.5 gram ijzeroxyd in ijzersulfiede waren veranderd.

Naar de meening van Hoppe-Seyler zou het gevormde methaan in status nascens door de gips geoxydeerd worden volgens de vergelijking $CH_4 + CaSO_4 = CaCO_3 + H_2S + H_2O$, terwijl de gevormde zwavelwaterstof onder zwavelafscheiding het Fe_2O_3 zal reduceeren tot Fe S.

Bij de beschrijving mijner eigen onderzoekingen wordt het bewijs geleverd, dat methaan noch bij het ontstaan, noch bij het verdwijnen aanleiding geeft tot sulfaatreductie, zoodat de hierbovengenoemde opvatting van Hoppe-Seyler onjuist is. Het proces der sulfaatreductie verloopt echter glad in de cellulose-gistingen en wordt veroorzaakt onder den invloed der zuren, welke bij de ontleding van de cellulose ontstaan. In de verhandelingen van Beijerinck [1]) en Van Delden [2]) vinden we het proces der sulfaatreductie beschreven.

[1]) Centralbl. f. Bakt. 2e Abt. 1895 Bd. 1 S. 1.
[2]) Centralbl. f. Bakt. 2e Abt. 1903 Bd. 17 S. 81.

§ 3. Nieuwere onderzoekingen.

Methaan en waterstof als produkten der cellulosegisting. Methaangisting in mesthoopen.

De studie van Omelianski [1]) over de aantasting der cellulose, welke 8 jaren eischte, geeft de volle overtuiging, dat de volhardende onderzoeker er in slaagde de krachtigste cellulose-splitsende fermenten zoodanig op den voorgrond te brengen, dat het hem mogelijk werd ze te beschrijven en de processen, door deze organismen veroorzaakt, te leeren kennen.

De voedingsbodems, waarmede Omelianski experimenteerde bevatten, evenals die van Hoppe-Seyler, slechts cellulose als koolstofbron, terwijl de andere elementen als minerale zouten werden toegevoegd. Soms werd als stikstofbron pepton, asparagine of mestdekokt genomen, wat echter geen gunstiger invloed op de gisting uitoefende. Gewoonlijk werd de volgende voedingsvloeistof gebruikt.

Cellulose als strooken filtreerpapier of papierpap	
Krijt.	
Kal. phosph.	1 gram.
Magn. sulf.	0,5 gram.
Amm. sulf. of amm. phosph.	1 gram.
Natriumchloride	spoor
Aqua distillata	1000 gram.

Het krijt dient om gevormde zuren te binden. Als infectiemateriaal werd mest of grachtmodder gebruikt, terwijl bij 34—35° werd gekultiveerd, zijnde ongeveer het optimum der gisting. Het verloop der cellulose-aantasting na infectie, of overenting, heeft als volgt plaats.

Reeds vóór de gasontwikkeling optreedt wordt de vloeistof, welke aanvankelijk helder was, troebel; de papierstrooken zakken dichter samen, worden geel tot bruin; na 7 tot 30 dagen begint de gasontwikkeling. Na eenigen tijd zijn de strooken op ontelbare plaatsen als 't ware doorvreten., en soms ook lossen ze in

[1]) Central. bl. f. Bakt. 2e Abt. 1902 Bd. 8 S. 193, 225, 257, 289, 321, 353, 385 en 605.

hun geheel langzaam op. Na afloop der gisting, welke maanden duurt, is gewoonlijk nog een gedeelte der cellulose over, bestaande uit halfvergane strooken, die alle hechtheid missen. De vloeistof heeft een geelbruine kleur aangenomen, en ruikt naar rotte kaas.

Zooals TAPPEINER reeds mededeelde zouden er twee cellulosegistingen bestaan: eene cellulose-methaan- en eene cellulose-waterstofgisting, beide onder ontwikkeling van koolzuur en vorming van vetzuren.

Tot hetzelfde besluit komt OMELIANSKI na een aantal proefnemingen, waarbij hem tevens de onvolkomenheid van TAPPEINER's scheidingsmethode bleek. OMELIANSKI zocht een betere methode vast te stellen, welke hij vond in de combinatie van overenting en pasteurisatie (15 minuten op 75°). De seriën gistingen van OMELIANSKI, op de wijze geschreven als in zijne laatste publicatie over dit onderwerp, geeft een duidelijk overzicht van zijn arbeid.

Gewone Arabische cijfers geven de nummers der kolven aan, waarin methaangisting verloopt.

Vette Arabische cijfers, die waarin de waterstofgisting verloopt.

Romeinsche cijfers, de nummers der kolven, waarvan de gassen niet zijn geanalyseerd.

(——) beduidt: overenting zonder verhitting.

═══ beduidt: overenting na verhitting 75°—15 minuten.

Serie A. 19 Mei 1894. Infectie grachtmodder.

I — I — II — 3.

Serie B. 16 Sept. 1897. Infectie grachtmodder.

1 — I — II — 3.

Het gas van 1 bevatte 28 Sept.:

80 °/₀ CO_2
2,3 °/₀ CH_4
5,0 °/₀ H_2
13,7 °/₀ N_2

In 3 is de waterstof verdwenen en heeft de methaangisting vasten voet gekregen.

Serie C. 24 Febr. 1899. Infectie grachtmodder.

I — I — II — 3 — 4 — 5 = 6 — 7 = VIII = IX — 10 — XI — 12.

IV
5
6

inf. 7 Nov.	20 Febr.	5 Apr.	24 Apr.	26 Mei.	20 Aug.	
gist. 9 Jan.	16 Maart	19 Apr.	18 Mei.	14 Juni.	12 Sept.	
2 maanden.	23 dag.	14 dag.	24 dag.	19 dag.	23 dag	

De methaangisting gaat na 5 overentingen door, ook na herhaalde pasteurisatie.

Serie D. 6 Maart 1899.

1 — I — II = III = 4

inf. 15 Mei.	10 Sept.	6 Oct.	29 Dec.
gist. 23 Mei.	17 Sept.	1 Nov.	26 Jan. 1900.
		24 dag.	28 dag.

Verhitting van de 3e en 4e overenting voerde tot methaangisting.

De overentingen gisten in 't algemeen na ongeveer een week, terwijl de overentingen met verhitting over 't geheel na een maand en langer in gisting gaan.

Serie E. Paardemest infectie. Stikstofbron, mestdekokt.

1 — 1.

Serie F. Paardemest infectie. Stikstofbron, mestdekokt.

1 — 1 — 2.

Serie G. Paardemest infectie.

1 — 1.

Serie H. 30 Oct. 1899. Inf. Paardemest.

I — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6

inf. 29 Dec.	24 Jan.	15 Feb.	17 Apr.	6 Mei.	6 Sept.	
gist. 4 Dec.	gist. 6 Jan.	2 Feb.	25 Feb.	26 Apr.	17 Mei.	15 Sept.

Serie I. 30 Oct. 1899. Met dezelfde paardemest als *H* geïnfecteerd.

I = 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 = 7 = 8 — IX — **10 — 11**

gist 4 Dec.	inf. 26 Jan.	13 Mrt.	26 Apr.	3 Oct.	10 Nov.	12 Jan.	26 Mrt.	17 Apr.	24 Mei.	28 Aug. 15 Sept.
gist 23 Febr.	17 Apr.	12 Mei.	5 Nov.	31 Dec.	16 Febr.	17 Apr.	11 Mei.	18 Juni.	12 Sept.	16 Oct.
28 d.	35 d.	16 d.	32 d.	51 d.	34 d.	22 d.	24 d.	23 d.	15 d.	31 d.

OMELIANSKI zegt van deze proeven het volgende:

„Vergleichen wir die Incubationszeit in dieser Serie I und der, der letzt genannten Serie H, so müssen wir bemerken, dass

dieselbe bei der Wasserstoffgährung eine bedeutend längere ist (3—4 Wochen) als bei der Methangährung" (c.a 1 Woche).

OMELIANSKI heeft zich hier blijkbaar vergist; na pasteurisatie is de incubatietijd van het waterstofferment over 't geheel iets korter dan die van het methaanferment, hetgeen uit bovengaande opgaven is af te leiden.

Serie K. 1 Dec. 1900. Inf. paardemest.

	Inf.	12 Jan.	9 April.	23 Mei.	28 Aug.	15 Sept.
	gist.	22 Jan.	25 April.	31 Mei.	7 Sept.	1 Oct.
1 gist 7 Dec.	I	**2**	III	**4**	**5**
		16 d.	8 d.	10 d.	15 d.
	I	**2**	**3**	IV	
	Inf.	12 Jan.	9 April.	14 Mei.	24 Mei.	
	gist.	20 Febr.	16 April.	22 Mei.	1 Juni.	
		39 d.	7 d.	8 d.	15 d.	

In beide rijen ontstond de waterstofgisting, ofschoon in het gasmengsel van de stamkolf 1 *geen waterstof* aanwezig was.

De incubatietijd van het waterstofferment is in deze proef 1—2 weken.

Teneinde zich geheel te overtuigen, dat de scheiding der beide processen te vertrouwen is, mengde OMELIANSKI eene waterstof- en eene methaangisting, met het doel ze door middel van overenting en verhitting weder te scheiden.

Na 5 dagen begon de gisting, welke slechts koolzuur en methaan leverde. Eene overenting van deze kolf gaf de methaangisting; eene overenting, welke daarna werd verhit, gaf eene waterstofgisting.

Uit de bovengenoemde proeven volgt, dat door overenting en verhitting beide processen gescheiden kunnen worden.

De verklaring, die OMELIANSKI l.c. blz. 263 geeft is de volgende:

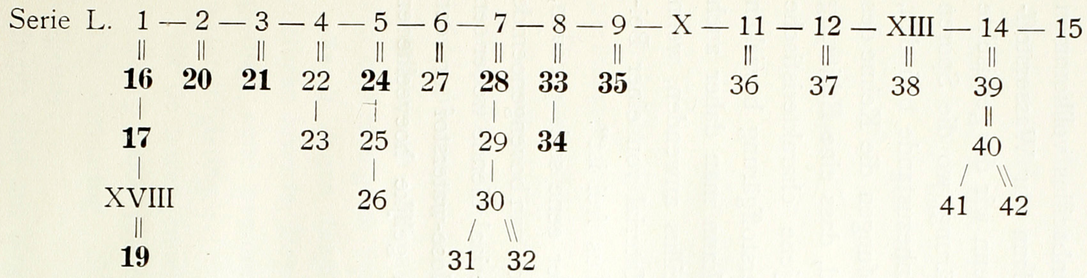
Impft man mit einem Material, welches Sporen der Mikroben beider Gärungen enthält, sei es Schlamm, Mist oder ein künstliches Gemenge, so entsteht zunächst die Methangärung, deren Inkubationszeit kürzer ist als die der Wasserstoffgärung. Erhitzen wir nun eine solche einseitig entwickelte Kultur, so ist es klar, dass wir die ausgekeimten oder auskeimenden Sporen des Methan-

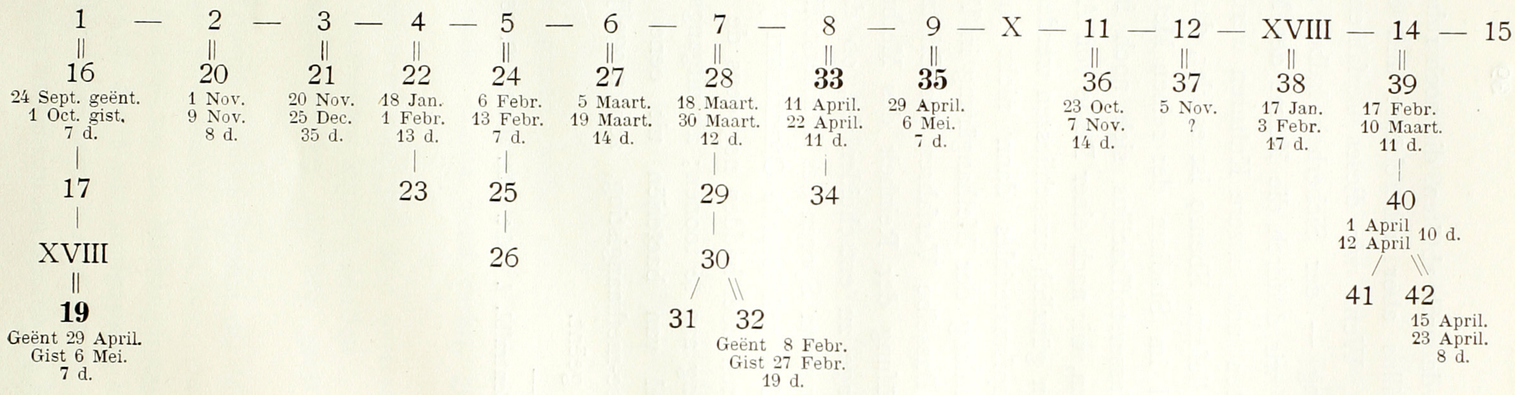
bacillus dadurch abtöten, die noch ruhenden Sporen des Wasserstoffbacillus aber unbeschädet und entwickelungsfähig bleiben werden. Wenn wir dieses Verfahren — die Abimpfung unter Erhitzung — der Sicherheit halber mehrmals wiederholen, so müssen wir dadurch die Keime des Methanbacillus vollkommen vernichten und unsere Kulturen werden dann nur Wasserstoffgärung liefern. Ebenso ist es klar, dass, wenn wir das gemischte Material im Stadium der reinen Methangärung, wo die Sporen des Wasserstoffbacillus sich noch im Ruhezustande befinden, abimpfen, wir nach einer Reihe von Abimpfungen die Keime des letzteren gänzlich ausschlieszen werden und, dass eine Erhitzung des Impfsmateriales dann nicht mehr jene charakteristische Verwandlung der Methangärung in Wasserstoffgärung bewirken wird. Dasselbe Verfahren des Erhitzens kann man daher auch zur Prüfung der Reinheit des Methanbacillus anwenden, wenn die Frage zu entscheiden ist, ob das Material von einer Beimengung von Sporen des Wasserstoffbacillus frei ist".

In 1904 publiceerde OMELIANSKI [1]) weder eene serie proeven, welke ten doel hadden nog eens de waarde van bovengenoemde scheiding aan te toonen; als uitgangsmateriaal diende weder een mengsel van bacteriën uit eene cellulose-waterstof en een cellulose-methaangisting, zoo mogelijk in gelijke hoeveelheden samen geënt.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II 1904 S. 369.





De incubatietijden der waterstofgisting waren dus 7 d., 8 d., 3 d., 7 d., 12 d., 11 d., 7 d., 7 d.
De incubatietijden der methaangisting 13 d., 14 d., 19 d., 14 d., 17 d., 11 d., 10 d., 8 d.

Uit deze tabel zien we, dat eerst bij de 11de overenting de methaangisting vasten voet verkrijgt, dat is na ongeveer een jaar werken.

Volgens Omelianski kan men zich echter de methaangisting vlugger verschaffen, door na overenting de kolf een tijd lang te laten doorgisten, waardoor de methaanbacteriën gelegenheid hebben flink te groeien en de waterstoffermenten te overwoekeren.

Onze auteur geeft de volgende beschrijving van de cellulose-fermenten:

Het waterstofferment heeft in jonge kulturen den vorm van zeer dunne staafjes, 0,5 μ breed en 4—8 μ lang; later bereiken ze eene lengte van 10—15 μ; snoeren worden niet gevormd. In oudere kulturen ontstaat aan het eene einde van een staafje een spore, welke eerst gerekt is, later rond wordt, van 1,5 μ. Door jodium worden de bacterie niet blauw gekleurd, waardoor de identiteit met de amylobacter vervalt; eigenbeweging werd niet waargenomen. De fermenten liggen tegen de papiervezels gedrukt en nemen na afloop der gisting de plaats van deze in.

Na vele vergeefsche pogingen om deze fermenten in reinkultuur te verkrijgen, waarbij de meest verschillende voedingsbodems werden aangewend, gelukte het eindelijk op aardappelschijven zeer kleine, gele, natte, zwak troebele koloniën te kweken. Deze fermenten vergisten echter de cellulose zeer slecht, terwijl oplossingen van glucose, manniet, dulciet, rietsuiker, melksuiker, zetmeel, arabische gom, dextrine of inuline, geïnfecteerd met deze reinkultuur, geen gisting vertoonden. We hebben ook hier weder het geval, dat met de reinkulturen zeer slechte resultaten worden verkregen, terwijl door de ruwkulturen met succes de cellulose in gisting gaat.

In eene cellulose-waterstofgisting wordt de cellulose vergist tot waterstof en koolzuur, onder vorming van azijnzuur en boterzuur.

Kwantitatieve analyse van eene cellulose-waterstofgisting.

3,4743 gr. cellulose ingebracht.	2,2402 gr. vetzuren.	
0,1272 gr. onvergist gebleven = 3,66%	0,9722 gr. koolzuur.	
3,3471 gr. vergist.	0,0138 gr. waterstof.	
	Totaal 3,2262 gr.	

Daar verscheidene gistingsprodukten, als valeriaanzuur, hoogere alcoholen, hier niet zijn bepaald, mag het geringe tekort 0,1209 gr. daaraan worden toegeschreven. De verhouding $\frac{\text{azijnzuur}}{\text{boterzuur}} = \frac{1.7}{1}$.

Het ferment der cellulose-methaangisting vertoont ongemeen veel overeenkomst met het cellulose-waterstofferment; het is echter iets dunner, lengte 5 μ, breedte 0,3 μ, terwijl de afmetingen der sporen 1 μ—1.5 μ zijn; door jodium worden ook deze fermenten niet blauw gekleurd.

Het is niet gelukt deze fermenten in reincultuur te brengen; noch op vleeschgelatine, noch op aardappelschijven, koolpreparaten, bieten of filtreerpapier was het mogelijk koloniën te doen groeien.

Kwantitatieve analyse van eene cellulose-methaangisting.

2,0815 gr. cellulose ingebracht.	0,1372 gr. methaan.
0,0750 gr. onvergist.	0,8678 gr. koolzuur.
2,0065 gr. vergist.	1,0223 gr. vluchtige zuren.
	Totaal 2,0273 gr.

Er is dus ± 50 % van de cellulose vergist tot gassen, de rest tot vluchtige zuren.

De verhouding van de hoeveelheid azijnzuur tot de hoeveelheid boterzuur is: $\frac{\text{azijnzuur}}{\text{boterzuur}} = \frac{9}{1}$

Evenals bij deze proeven, vergist in 't algemeen de cellulose niet geheel in eene kultuur; het procentgehalte, dat vergist, hangt samen met de concentratie der afgescheiden produkten; in kulturen, welke 1—1.5 % cellulose bevatten, was na 5 maanden 80—85 % vergist; bij nog geringere cellulose-concentratie verdwijnen nog meer procenten. Door de vloeistof boven het bezinksel eenige keeren voorzichtig te vernieuwen, vergistte 96,24 % der ingebrachte cellulose, terwijl de rest, behalve uit enkele vlokjes cellulose, hoofdzakelijk uit bacteriën-materiaal bestond.

„Auf Grund der in dieser Arbeit festgestellten Tatsachen", zegt Omelianski, „kommen wir zu folgenden Schlüssen:

1. Die Cellulose ist einer 2-fachen Gärung unterworfen, der Wasserstof- und der Methangärung.

2. Jede dieser Gärungen ist ein selbständiger Prozess, der unter dem Einflusse eines spezifischen Microbiums von statten geht.

3. Die Microben der beiden Gärungen stehen einander morphologisch sehr nahe. Nur der unmittelbare Vergleich gestattet die Unterscheidung derselben, dank der etwas geringeren Grösze des Methanbacillus.

4. Die physiologischen Eigenschaften der beiden Microben sind ebenfalls sehr ähnliche: Sowohl die Bedingungen, als auch der Charakter und die Producte ihrer Lebensthätigkeit stehen einander sehr nahe; das einzige und konstante Merkmal, welches gestattet, sie leicht von einander zu unterscheiden, ist die Wasserstoffentwickeling in dem einen, und die Methanbildung in dem anderen Falle".

Men zal hebben opgemerkt, dat in de gistingsgassen van de kulturen van Omelianski, geen waterstof werd aangetoond; terwijl toch beide fermenten, het waterstof- en het methaanferment, daarin aanwezig waren en gescheiden konden worden.

Eigenaardig is het feit, dat Omelianski den incubatietijd van het methaanferment korter noemt dan dien van het waterstofferment, terwijl uit zijne proeven blijkt, dat dit niet het geval is; want bij vele pasteurisaties bleek het waterstofferment een korteren incubatietijd te hebben dan het methaanferment. Gemiddeld kunnen we deze tijden als gelijk beschouwen, waarvoor men vergelijke serie C. D. I. K. en H. Ik zal op dit punt bij de beschrijving, in mijne eigen onderzoekingen terugkomen en naar aanleiding daarvan eene verklaring geven van de wijze waarop de scheiding der beide gistingen plaats heeft.

Methaangisting in mesthoopen

Déhérain. Aan de proeven van Tappeiner over gistingen van den darminhoud sluiten zich de onderzoekingen van Déhérain aan over de ontleding van mest. Dit is een materiaal, dat zeer rijk is aan gecompliceerde stikstof- en koolstofverbindingen, welke door het bacteriënleven tot meer eenvoudige lichamen worden afgebroken; de mikroben ontwikkelen zich daarin buitengewoon krachtig en door de omzettingsprocessen stijgt de temperatuur ver boven die der omgeving.

Zoo nam Déhérain [1]) waar, dat de temperatuur van een ouden mesthoop 28°—35° en die van een verschen 65°—68° was.

Met behulp van een glazen buis, verbonden aan een kwikpomp werden de gassen, in den mesthoop ontstaan, uitgezogen. In de bovenste lagen bestaan ze uit koolzuur en stikstof, terwijl dieper in den mesthoop, waar het materiaal meer is samengedrongen en de lucht niet kan doordringen, methaan en koolzuur worden gevonden; echter ontstaat geen waterstof.

De samenstelling dezer gassen was:

Boven in den mesthoop	Midden in den hoop	Onder in den hoop
21 CO_2	31 CO_2	37,1 CO_2
78 N_2	33,3 CH_4	58 CH_4
	35,5 N_2	4,9 N_2

Gayon [2]) constateerde dat een M³. mest bij 37° geruimen tijd achtereen 100 l. methaan per dag leverde. Wordt mest niet van de lucht afgesloten, maar in een draadnet opgehangen, zoodat de zuurstof van alle kanten kan toetreden, dan heeft eene krachtige verbranding plaats, die de partij inwendig tot 80° Celsius verwarmt. De ontwikkelde gassen bestaan dan slechts uit koolzuur.

Th. Schloesing. Bij de bestudeering der processen, welke in den bodem verloopen bij den kringloop der stikstof, stelde Th. Schloesing [3]) zich o.a. ook de vraag, of elementaire stikstof ontstaat bij de omzettingen van stikstofhoudende organische verbindingen.

Ter beantwoording van dit zoo hoogst belangrijke vraagstuk deed Schloesing koemest vergisten, een materiaal, dat de meest verschillende stikstofverbindingen bevat.

Maar aangezien bij deze gistingen tevens koolzuur en methaan ontstonden, hebben zijne onderzoekingen bijgedragen om de feitenkennis over de methaanvorming te vermeerderen.

De eerste gisting van 100 gram verschen koemest bij 42°, leverde in twee maanden 850 c.c. gas, waarin:

[1]) Compt. rend. T. 98. 1884.
[2]) Compt. rend. T. 98. 1884.
[3]) Compt. rend. T. 109. 1899 pg. 835.

713,6 c.c. CO_2
38,8 c.c. H_2
97,6 c.c. CH_4.

Geen elementaire stikstof werd bij de gisting ontwikkeld.

Eene tweede proef, waarbij 124,4 gr. bij 52° werd vergist, leverde in twee maanden ongeveer 10 l. gas en wel 4217,5 c.c. CO_2 en 4577,4 c.c. CH_4. Ook hier werd geen elementaire stikstof gevormd, zoodat hierdoor bewezen is, dat uit mest bij anaerobe gisting geen stikstof ontstaat. Bij deze tweede gisting vond Schloesing geen waterstof.

De mest bevatte	C	H	O	N	anorganische zouten,
Voor de gisting	12,67	1,653	10,78	0,453	3,69
Na de gisting	7,92	1,125	7,08	0,392	3,78
	4,75	0,528	3,70	0,061	— 0,09

Waaruit volgt, dat 37,5 °/₀ van de in den mest aanwezige koolstof als gas verdwenen zijn; een weinig ammoniak is gevormd uit de org. stikst. verb. en daarna vervluchtigd.

Sjollema en de Ruyter de Wildt. Proeven over de omzettingen in den stalmest werden genomen door onze landgenooten Dr. B. Sjollema en Dr. J. C. de Ruyter de Wildt [1]) waarbij vooral de resultaten over de veranderingen der stikstofverbindingen op den voorgrond springen.

Er werden vier proeven respectievelijk bij ± 15°, 30°, 30° en 50°—55° met 1 K.G. verschen stalmest en 100 c.c. runderurine onder aerobe condities genomen. In de drie eerste proeven werd elementaire stikstof afgescheiden waarschijnlijk door nitrificatie en denitrificatie (aan 't einde van proef 3 werd salpeter aangetoond); in de vierde kolf had geen stikstofontwikkeling plaats.

De hoeveelheden organische stof respectievelijk 22,8 °/₀, 48,3 °/₀, 49,1 °/₀ en 54,5 °/₀, welke na afloop der proeven bleken te zijn verdwenen, waren in den vorm van gassen als koolzuur en waterdamp meegevoerd. Geen methaan, noch waterstof konden worden aangetoond.

[1]) Cultura 18e jaargang No. 210. 1906.

Twee anaerobe gistingen met dezelfde mestsoort gaven geheel andere resultaten. De hoeveelheden organische stof, welke vergistten waren veel geringer dan bij de aerobe proefnemingen. Geen elementaire stikstof werd bij deze anaerobe proeven ontwikkeld. Gedurende de eerste proef bij 15° verdwenen 4.9°/₀, gedurende de tweede, bij 45°—50°, 12,3 °/₀ koolstof als gas. Gasanalyses zijn bij de 1e proef níet uitgevoerd.

De opgevangen gassen van de 2e proef bestonden uit stikstof, koolzuur, methaan, en waterstof.

58,7 °/₀ CO_2	31,00 °/₀
11,15 °/₀ CH_4	7,36 °/₀
4,7 °/₀ H_2	1,08 °/₀
25,25 °/₀ N_2	60,56 °/₀

Er werd getracht nog verschillende analyses te verrichten, maar door het lage gehalte aan brandbare gassen konden echter geen explosies verkregen worden.

We zien dus uit de onderzoekingen van Déhérain, Gayon, Schloesing, Sjollema en de Ruyter de Wildt, dat dierlijke afval onder den invloed van het mikrobenleven, onder anaerobe omstandigheden bij 45°—50° aanleiding geeft tot eene methaan, waterstof en koolzuurgisting. De hoeveelheid waterstof in de gassen is zeer gering tegenover de kwantiteit methaan; bij de proeven van Déhérain en Gayon, die bij lagere temperatuur de gassen opvingen, werd geen waterstof gevonden.

§ 4. Methaan- en waterstofgisting uit organische zouten, eiwitten en andere verbindingen.

Het proces der calciumacetaat-gisting ontdekte Hoppe-Seyler [1]) in 1886; hij infecteerde een kolf van 600 c.c., welke 9,768 gr. calciumacetaat, opgelost in rivierwater, bevatte, met ± 50 c.c. riviermodder. Gedurende 7 maanden ontwikkelden zich gassen, welke slechts uit methaan en koolzuur bestonden; na eenigen tijd was de oplossing in de kolf met koolzuur verzadigd en bestond dit gasmengsel uit 2 deelen methaan en 1 koolzuur,

[1]) Zeitschr. für Physiol. Chem. Bd. 11 1887.

zoodat de splitsing waarschijnlijk volgens de formule verloopt:

$$(C_2\ H_3\ O_2)\ {}_2Ca + H_2O = Ca\ CO_3 + CO_2 + 2CH_4.$$

„Das Acetat war während des Versuchs vollständig in Carbonat übergeführt und dies mit 2,411 gr. Gehalt an Ca. gefunden Die eingebrachte und die wiedergefundene Quantität der organischen Stoffe sind so wenig von einander verschieden, dass man eine stattgehabte Vermehrung der Spaltpilze nicht hieraus mit Sicherheit erschliessen kann. Wenn eine solche stattgefunden hat, kann sie jedenfalls nur eine geringe sein und in keinem Verhältniss stehen zu dem bedeutenden Umsatz von Acetat in Carbonat. Sehr geringe Schlammquantitäten bei solchen Versuchen zu benutzen um über die stattgefundene Vermehrung der Bacteriën sicherere Aufschlüsse zu erhalten, empfiehlt sich aus dem Grunde nicht, weil dann die Gährung entweder sehr langsam erfolgt oder ganz ausbleibt.

Van de omzetting van calciumlactaat onder waterstof- en koolzuurontwikkeling tot azijnzuur, dat verder tot CO_2 en CH_4 vergist, deelt H.-S. alleen het feit mede, evenals van de ontleding van calciumformiaat tot waterstof en koolzuur en calciumcarbonaat onder opname van een molecuul water.

Hoppe-Seyler stelde zich de splitsing van het acetaat en formiaat door mikroben voor, als zoude het protoplasma der bacteriënlichamen dezelfde werking uitoefenen als fijn verdeeld rhodium en de zouten niet geschikt zijn voor opbouw van nieuwe fermenten, hetgeen dus neerkomt op eene katalytische werking zonder groei.

Mazé [1]) schrijft over de acetaatgisting, welke in eene flesch met rotte bladen eene hevige methaan- en koolzuurontwikkeling veroorzaakte: „Une semence empruntée à cette culture avec une autre, tirée d'une pareille de fumier bien décomposé, ont constitué le point de départ d'une série de cultures, qui ont abouti à la découverte d'un microorganisme particulier, auquel il faut attribuer le dégagement de formène.

Ce microbe se présente isolé, et alors il est sphérique, ou sous forme d'agrégats plus ou moins volumineux, d'un aspect

[1]) C. r. T 137. p. 887. 1903.

mûriforme rappellant une grosse sarcine, en raison de cette analogie je le désignerai provisoirement par le terme de pseudo-sarcine, car il ne semble pas que ses bipartitions se fassent suivant deux plans perpendiculaires."

Deze sarcine was reeds lang in het laboratorium te Delft in de acetaatgisting bekend.

Mazé maakte een kultuurvloeistof van de volgende samenstelling:

gemalen doode bladeren	50 gram.
ammoniumphosphaat	0.5
kaliumcarbonaat	0.5
gewoon water	500
calciumcarbonaat	2 à 3 gram.

Hij entte hierin de kultuur en kreeg opnieuw methaan en koolzuurontwikkeling in de verhouding 65 : 35. Ook eene oplossing, welke acetaat en butyraat bevatte naast minerale zouten werd door de sarcine in gisting gebracht.

Mazé deelt ook mede, dat het hem gelukt is de reinkultuur van dit organisme te verkrijgen, maar hiermede verkreeg hij geen methaangisting uit acetaten. Wel echter zou dit gelukken door toevoegen van twee, acetaat zelf niet vergistende sporevormers.

Ook Omelianski, wien deze sarcine reeds bekend was, deelt mede, dat zij in staat is butyraten te vergisten. Hij gebruikte oplossingen, welke 0.1 % pepton, 0.5 % calciumbutyraat of ook die welke 0.5% natriumbutyraat in leidingwater bevatten en infecteerde deze met eene overenting der ruwkulturen van de sarcine.

Omelianski kende deze sarcine eveneens en maakte uit, dat zij ook in staat is butyraten te vergisten. Zoowel oplossingen met pepton als met minerale zouten naast calcium- of natriumbutyraat worden daardoor ontleed. De overentingen gaan na ongeveer een maand opgang en ontwikkelen dan een gas, dat slechts uit koolzuur en methaan bestaat en wel bevatte het 4—8 % koolzuur en 96—98 % methaan.

Zonder eenige verdere toelichting geeft Omelianski hiervoor de volgende formule:

$$Ca\ (C_4\ H_7\ O_2)_2 + 3\ H_2\ O = Ca\ CO_3 + 2CO_2 + 5CH_4.$$

Behalve de reeds genoemde verbindingen kunnen ook de eiwitten door bepaalde fermenten zoodanig worden afgebroken, dat naast waterstof en koolzuur ook methaan ontstaat, hetgeen reeds uit de op blz. 30 vermelde onderzoekingen van Tappeiner is gebleken.

De Bacillus oedematis maligni vergist volgens proefnemingen van Kerry [1]) ossenbloedserum onder H_2, CH_4 en CO_2 ontwikkeling, waarbij tevens de vorming van vetzuren, leucin, hydroparacumaarzuur een weinig aldehyd- en ketonachtige lichamen plaats heeft.

Kerry geeft de volgende getallen:

Eerste gisting	Tweede gisting	Derde gisting
$H_2 = 67{,}33\ \%$	$H_2 = 98\ \%$	$H_2 = 91.42\ \%$
$CH_4 = 17{,}03\ \%$	$CH_4 = 2\ \%$	$CH_4 = 4{,}73\ \%$
$N_2 = 15{,}64\ \%$		$N_2 = 3{,}67\ \%$

Door andere bacteriën worden de eiwitten echter zonder methaanvorming omgezet in eenvoudiger produkten; noemen we slechts de onderzoekingen van Hüfner [2]), Bovet [3]), Nencki [4]) en Sieber [5]), die de gassen, welke ontwikkelen bij de rottingen, analyseerden en bevonden, dat Bacillus liquefaciens magnus, Bacillus spinosus, miltvuurbacil serumeiwit, gelatine en lijm onder vrijwording van koolzuur en waterstof vergisten tot vluchtige vetzuren, phenylpropionzuur, paraoxyphenylpropionzuur en skatolazijnzuur.

Zoja [6]) ontleedde elastin door een reinkultuur van „Rauschbrandbacillus", waarbij koolzuur, methaan en waterstof afgescheiden werden (verhouding methaan tot waterstof = 2 : 1) en bovendien boterzuur en valeriaanzuur, benevens een weinig mercaptaan ontstonden.

Belangrijker zijn de onderzoekingen van Baginski [7]) en Von

[1]) Sitzungsberichte der Math. Naturw. Klasse der Kaiserl. Akademie der Wissensch. Bd. XCVII Abt. III 1888.

[2]) Journal für pract. Chemie 1875 Bd. II.

[3]) Ann. de microgr. 1890 Bd. 2.

[4]) Sitz. ber. der math. naturw. Kl. der Kaiserl. Akad. der Wissensch. Bd. XCVII.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 32. 1901.

[6]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 23 1897.

[7]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 12 1888. S. 434.

Klecky [1]) over de melksuikergisting door Bacillus lactis aerogenes en Bacillus saccharobutyricus.

De eerste vergist melksuiker in eene oplossing van:

750	gedistilleerd water.
36	melksuiker.
8	pepton siccum.
1,60	K_2HPO_4.
0,15	$CaCl_2$
0,3	$MgSO_4$

volgens Baginsky bij 37° tot azijnzuur, een spoor melkzuur en aceton, terwijl koolzuur, methaan en waterstof vrijkomen. De verhouding waterstof tot methaan is als 3 : 1.

Het gelukte Omelianski, na vele vruchtelooze pogingen om eene methaangisting uit eiwitten te verkrijgen, door rottende wol als entmateriaal te gebruiken.

„Infizierten wir," zoo schrijft hij, „mit diesem Material einen für anaërobe Kulturen bestimmten Kolben, welcher eine Mineralsalzlösung (in der Ammoniak- und Salpetersaure-salze ausgeschlossen sind) und eine stickstoffhaltige Substanz (wie hartgesottenes Eiereiweisz, Gelatine, Tischlerleim, Wolle) enthält, so beobachteten wir in sämtlichen Fällen reine Methangärung, welche sodann in einer Reihe fortlaufender Ueberimpfungen fortdauerte. In vereinzelten Kulturen verlief die Gärung ziemlich energisch, im allgemeinen jedoch entwickelte sie sich unter den erwähnten Verhältnissen ziemlich langsam und zog sich auf Wochen, sogar Monate in die Länge.

Ausser den erwähnten Eiweiss- und Leimstoffen verwandten wir zu unseren Versuchen auch Pepton."

Omelianski merkt op, dat in deze gistingen twee perioden onderscheiden moeten worden; gedurende de eerste, welke reeds na een dag aanving en na drie dagen ophield, ontstond waterstof en koolzuur; gedurende de tweede, welke eerst na een week begon en zeer lang duurde, werd methaan en koolzuur ontwikkeld.

Noch van de bij deze gistingen betrokken bacteriën, noch

[1]) Centr. bl. f. Bakt. Abt. II Bd. II 1896. p. 169.

van de hoeveelheden gas per gram eiwit of pepton gevormd, maakt Omelianski melding.

Eenige van zijne analyses zijn hieronder weergegeven, betrekking hebbende op de samenstelling van het gas verkregen uit eene albuminegisting. De eerste gisting is begonnen met rotte wol, de overige gistingen zijn verkregen door overenting.

Datum der infectie.	Begin der gisting.	Datum der analyse.	CO_2	CH_4	H_2
24 April '03	29 April	3 Mei	38.7	61.5	
3 Mei '03	4 Mei	12 Mei	37.8	62.0	
20 Sept. '03	23 Sept.	8 Oct.	75.8	17.5	6.5

Samenstelling van het gas, verkregen uit eene houtlijmgisting.

23 April '03	27 April	28 April	48.9	51.0	
20 Sept. '03	25 Sept.	1 Oct.	72.0	28.0	
7 Sept. '04	19 Sept.	1 Oct.	78.7	21.1	

Samenstelling van het gas uit eene peptongisting.

22 Mei '05	24 en 30 Mei	1 Juni	60.3	28.1	11.6
24 Mei	25 en 31 Mei	2 Juni	60.0	34.2	5.8
16 Sept.	17 en 24 Sept.	28 Sept.	74.8	25.0	0.2

We zien hieruit, dat de gassen een hoog methaangehalte bezitten en somtijds waterstof bevatten.

§ 5. Andere processen, welke onder waterstofontwikkeling verloopen.

Gelijk reeds boven is opgemerkt, geraken enorme massa's waterstof langs vulkanischen weg in de atmospheer.

Maar behalve op deze wijze ontwikkelt zich waterstof als een zeer algemeen verspreid produkt van het bacteriënleven bij tal van gistingen en er behoeft niet aan getwijfeld te worden, dat

de hoeveelheid, langs dezen weg gevormd, verre die, welke door de vulkanen wordt geleverd, overtreft en dus als de hoofdmassa moet worden beschouwd van het betrekkelijk hooge waterstofgehalte van onzen dampkring.

In de mikrobiologische laboratoriën worden vele bacteriënsoorten gekultiveerd, welke juist door hunne ontwikkeling van waterstof herkenbaar zijn; noemen we slechts de Aerobactergroep [1]), die eenige van de meest algemeen verspreide bacteriën omvat; uit de verschillende koolhydraten, zelfs uit glycerine ontwikkelen vele representanten dezer groep waterstof. Overal waar plantenstoffen vergaan, zullen deze bacteriën noodzakelijkerwijs tot waterstofontwikkeling aanleiding moeten geven.

Door Fitz [2]) zijn verscheidene gistingsprocessen uitgewerkt, waarbij onder waterstofontwikkeling produkten worden gevormd welke door zekere mikrobensoorten ontleed, aanleiding tot methaangisting kunnen geven. De fermenten, welke deze biochemismen veroorzaken, zijn door hem vaag beschreven, de meeste daarvan behooren tot het geslacht Granulobacter, door Prof. Beijerinck [3]) opgesteld en beschreven. Uit de onderzoekingen van Fitz volgt, dat glycerine, manniet, dextrine en zetmeel in oplossingen, welke naast deze verbindingen slechts anorganische zouten bevatten, onder ontwikkeling van waterstof en koolzuur vergisten tot alkoholen (voornamelijk hoogere), vluchtige vetzuren en organische niet vluchtige zuren.

De glycerine- en mannietgisting leveren naast waterstof en koolzuur hoofdzakelijk alcoholen en weinig zuren; bij de dextrinegisting worden minder alcoholen, bij de amylumgisting zeer weinig alcoholen gevormd, daarentegen ontstaan hier vluchtige organische zuren, grootendeels uit normaal boterzuur bestaande,

---

[1]) Beijerinck M. W. Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgraben und Aufstelling der Gattung Aerobacter. Centralbl. f. Bact. Abt. 2 1900.

[2]) Berichte der Deutsch Chem. Gesellsch. Bd. 9 1876 S. 1348; Bd. 10 1877 S. 276; Bd. 11 1878 S. 42 u. S. 1890; Bd. 12 1879 S. 474; Bd. 13 1880 S. 1309; Bd. 14 1881 S. 1084; Bd. 15 1882 S. 867; Bd. 16 1883 S. 844; Bd. 17 1884 S. 1188.

[3]) Sur la fermentation et le ferment butyliques. Archives Néerlandaises T. 29 p. 1—68.

gemengd met azijnzuur en capronzuur, welke stoffen alle als uitgangspunten voor de methaanvorming kunnen dienen.

Als niet vluchtige zuren worden in hoofdzaak melkzuur en barnsteenzuur gevormd.

Eveneens deelt Fitz mede, dat lactaten, tartraten, glycerinezure kalk en citroenzure kalk onder waterstof- en koolzuurontwikkeling kunnen vergisten tot zouten van vluchtige vetzuren, melkzuur en barnsteenzuur.

De ontleding van formiaten onder vorming van waterstof is door verscheidene onderzoekers in studie genomen; de eenvoudige samenstelling van dit zout maakt de wijze van splitsing begrijpelijk. Kitasato bemerkte, dat natriumformiaat, toegevoegd aan mediën, welke glucose bevatten, sommige bacteriën onder anaërobe omstandigheden beter doet groeien; veel acht geven op de gassen daarbij ontwikkeld, deed hij niet. Hieraan schonken Pakes en Jollyman [1]) echter bijzondere aandacht. Zooals algemeen bekend, vergist Bacillus coli communis bij 37° eene oplossing welke glucose en vleeschwater bevat tot organische zuren onder waterstof en koolzuur ontwikkeling (het gas bevat 25—50 % koolzuur).

Volgens deze onderzoekers ontstaan uit 100 c.c. van de volgende voedingsvloeistof. Vleeschwater 1 % pepton, 0,5 % NaCl., 2 % glucose door:

	c.c. gas.	procenten CO_2.
B. coli communis	32,8	31,5
B. enteritidis Gärtner . .	68,6	35,4
Pneumobacillus Friedländer	10,9	22,2
B. oedematis maligni . .	36	40,0

Wordt echter aan deze oplossing 0,4 % natriumformiaat toegevoegd, dan stijgt de gasproduktie belangrijk.

B. coli communis produceerde uit 425 c.c. van eene zoodanige oplossing in 16 dagen ongeveer 1700 c.c., welke ± 50 % koolzuur bevatten.

B. enteritidis Gärtner, Pneumobacillus Friedländer en B. oedematis maligni gaven analoge resultaten.

---

[1]) Proceedings of the Chemical Society 1901 17, 29.

De hoeveelheid gassen, door de toevoeging van het formiaat bij deze processen ontwikkeld, leidde tot de gevolgtrekking, dat door de splitsing van de formiaten, carbonaten waren gevormd, welke de zuren die door de ontleding der suiker ontstonden, hebben geneutraliseerd.

Teneinde den invloed van het natriumformiaat in de kulturen na te gaan, werd een voedingbodem genomen zonder glucose. 490 c.c. Vleeschwater, 1 °/₀ natriumformiaat geïnfecteerd met de Bacillus enteritidis leverde in 7 dagen 495.6 c.c. gas waarvan ± 20 °/₀ koolzuur.

In de vloeistof waren 350 c.c. koolzuur
in het gas 111 c.c. „
totaal 461 c.c. „

terwijl 451 c.c. waterstof waren gevonden, zoodat de verhouding $CO_2 : H_2 = 1 : 1$ en het formiaat klaarblijkelijk vergist volgens de formule: $H\,COO\,Na + H_2O = Na\,H\,CO_3 + H_2$. Echter werd slechts 25—30 % van het toegevoegde formiaat gesplitst. B. coli communis, Pneumobacillus Friedländer, B. lactis aërogenes, B. cloacae, B. cholerae gallinarum, Proteus vulgaris, B. prodigiosus en de roode bacil uit de Kieler waterleiding zouden het natriumformiaat op gelijke wijze splitsen.

Door middel van de methode der electieve kultuur, verkreeg Omelianski uit paardemest eene bacterie, welke het vermogen bezit, vleeschwaterformiaat zeer krachtig te vergisten. De meest geschikte gistingsbodem bleek een oplossing van 2 % mierenzure kalk en 0,2 % pepton in leidingwater te zijn, waarmede een Erlenmeyer ongeveer voor de helft werd gevuld, terwijl bij 35° werd gekultiveerd. Na 1 à 2 weken treedt gisting op. Zonder pepton als stikstofbron is echter geen gisting mogelijk.

In deze mediën vergist echter het formiaat niet geheel, ± 40 % blijft onontleed terug.

Bij een proef met 500 c.c. eener oplossing van 2 % calc. form., 0,2% pepton in leidingwater in een kolf van 750 c.c. werden in 8 maanden 61 % der mierenzure kalk vergist. Na 1 maand was reeds de zuurstof uit de kolf verdwenen, zoodat de gisting gedurende 7 maanden onder streng anaërobe omstandigheden verliep.

Na $2^1/_2$ maand had het gasmengsel de constante samenstelling ± 33,5 % CO_2 en 66,5 % H_2. Een andere proef met 500 c.c. vleeschwater, 0,5 % natriumformiaat gaf 231,6 c.c. waterstof, terwijl 374 c.c. waterstof hadden kunnen ontstaan, zoodat 38,1% natriumformiaat blijkbaar onvergist achtergebleven was.

Dat de meening van Hoppe-Seyler, als zou het bacteriënprotoplasma zich tegenover de formiaten gedragen als fijn verdeeld rhodium, onjuist is, bewees Omelianski door aan kolfjes vleeschwaterformiaat, met veel entmateriaal geïnfecteerd, een weinig chloroform toe te voegen. In deze trad geen gisting op, terwijl dit met de contrôlekolfjes wel het geval was.

De hierbij werkzame bacterie is door Omelianski *Bacillus formicicus* genoemd. Het is een kort beweeglijk staafje, lengte 2—3 μ, breedte 0,7—0,8 μ, groeit zeer goed in vleeschwater, coaguleert kaseïn van melk, reduceert nitraat tot nitriet; groeit als coliachtige kolonie op vleeschgelatine of vleeschagar, als geelbruine kolonie op aardappelschijven. Calciumformiaat aan den vasten voedingbodem toegevoegd, geeft eene afzetting van calciumcarbonaat in en om de kolonie.

Glucose, galactose, melksuiker, manniet, dulciet, arabinose en maltose worden in oplossing met minerale zouten vergist; rietsuiker, dextrine, inuline, gummi, aethyleenglycol, glycerine en erythriet echter niet.

Uit al de bovengenoemde feiten volgt, dat de B.formicicus als een representant van de Aërobactergroep mag worden beschouwd en een van de vele variëteiten van coli is.

Een groote hoeveelheid waterstof wordt zeker in de natuur ontwikkeld door de pectosegisting. De volgende proef geeft daarvan het bewijs. [1])

Den 21en Mei 1906 werd in een literkolf, gevuld met duinwater, een aardappel gebracht van 139 gram, welke in eenige stukken was gesneden. De kolf was gesloten door een gummistop met glazen afleidbuis voor het gas en werd bij 35° geplaatst, terwijl de ontwikkelde gassen boven water werden opgevangen. Denzelfden dag begon reeds eene gisting, welke 4 dagen krachtig

[1]) Deze proefneming behoorde op pagina 22 achter de onderzoekingen van Mitscherlich vermeld te zijn, maar is te laat gereedgekomen.

voortging en waarbij 550 c.c. gas zich ontwikkelde, bestaande uit 88,5 % H_2 en 11,5 % CO_2.

Bij deze gisting heeft in hoofdzaak eene aantasting plaats van de pectose, waaruit die laag van den celwand bestaat, waardoor aangrenzende cellen van elkander gescheiden zijn; daardoor vallen de aardappelstukken geheel uit elkaar, zoodat men op den bodem van de kolf de met zetmeel gevulde cellen vindt; natuurlijk zal ook de geringe hoeveelheid aanwezige suiker vergisten. Uit een aardappel van gemiddelde grootte ontstaat dus door de pectose-gisting ± een halve liter waterstof.

Een ander proces, waarbij waterstof ontstaat, is de cellulose-waterstofgisting, het zal overal te wachten zijn, waar plantendeelen aan zichzelf zijn overgelaten.

De rol van dit omzettingsproces in de natuur is op blz. 41 en volgende besproken.

Deze voorbeelden zullen voldoende zijn om de algemeenheid van de waterstofvorming door het mikrobenleven overtuigend in 't licht te stellen.

EIGEN ONDERZOEKINGEN

INLEIDING.

De biochemische functies der mikroben voeren, in tegenstelling met die der hoogere planten en dieren, welke hoofdzakelijk den opbouw der organische wereld bewerkstelligen, tot de afbreking van de door deze gevormde produkten. Zij vormen als het ware de groote schakel in het geweldige proces, dat men *„den kringloop der elementen in de natuur"* noemt, en leiden tot het algeheele mineralisatieproces, bestaande in de vorming van water, koolzuur en salpeter.

Dat deze biochemismen van overwegende beteekenis zijn, moge reeds eenigermate uit het historisch overzicht gebleken zijn. Inderdaad maken ze een der noodzakelijke voorwaarden uit, waardoor alle leven op onzen aardbodem mogelijk is.

Door de bacteriënwereld worden de organische stoffen bij aërobe aantasting meest tot zeer eenvoudige verbindingen afgebroken; de ontleding is zeer snel en heeft zoo volledig plaats, dat de tusschen produkten, indien ze ontstaan, zelden kunnen worden aangetoond; veelal is eene totale mineralisatie der stoffen het gevolg van deze omzettingen.

De oxydatie der suikers, cellulose, vluchtige vetzuren, alkoholen tot koolzuur en water; de hydrolytische splitsing van ureum (het hoofdbestanddeel van de vaste stof der urine) door de groep der ureumbakteriën en de aërobe eiwitontleding tot koolzuur, ammoniak en water en vele andere aërobe processen zijn hiervan voorbeelden. In al deze gevallen ontleenen de bacteriën de voor hun bestaan noodzakelijke energie aan oxydatiewerkingen.

In tegenstelling hiermede is de afbreking bij afwezigheid der

zuurstof doorgaans onvolledig, zeer dikwijls zelfs ontstaan naast lagere, tevens door synthese meer gecompliceerde produkten. Suikers, amylum, glycerine vergisten door de granulobaktergroep in hoofdzaak tot alcoholen en vetzuren onder ontwikkeling van waterstof en zuurstof; eiwitten ontleden met of zonder gisting tot mengsels van gecompliceerde aromatische en aliphatische lichamen; cellulose vergist onder waterstof-, respectievelijk methaan- en koolzuurontwikkeling tot boterzuur en azijnzuur, in alle welke gevallen de bacteriën hunne energie aan intermoleculaire omzettingen ontleenen. De produkten, die daarbij ontstaan, kunnen weer door andere mikroben aëroob verder worden afgebroken.

Methaan en waterstof zijn dus, blijkens het voorgaande, steeds produkten van anaërobe omzettingen. Wanneer wij dus de vorming van deze gassen in de natuur willen bestudeeren, zoo zijn we aangewezen op processen, die bij afsluiting der lucht plaats grijpen.

In het historisch overzicht is uiteengezet, dat de vroegere onderzoekers de bron van de methaanvorming uitsluitend in de ontleding van acetaat en cellulose hebben gezocht; alleen de onvolledige onderzoekingen van Omelianski over de gisting van boterzure kalk maken hierop een uitzondering. Een nader onderzoek omtrent de methaanvorming scheen dus gewenscht; in de eerste plaats kwamen andere vetzure zouten dan calciumacetaat in aanmerking. Hierbij deed zich de vraag voor op welke wijze de zouten der homologen van het azijnzuur worden afgebroken. Geeft hunne ontleding aanleiding tot methaanvorming, ontstaan misschien hoogere koolwaterstoffen, door hydrolytische splitsing, analoog aan die van de mierenzure en azijnzure zouten, of worden geheel andere verbindingen gevormd?

In den bodem worden de vetzuren, welke bij zoo vele processen als ontledingsprodukten ontstaan, spoedig geneutralizeerd tot zouten, welke als zoodanig het bacteriënleven ten dienste staan; en aangezien het algemeen in den grond voorkomende calciumcarbonaat deze neutralisatie hoofdzakelijk zal bewerkstelligen, zijn ook de mikroben er op aangewezen om in de eerste plaats de calciumzouten der zuren als voeding te gebruiken.

Bij de proefnemingen in het laboratorium hebben deze zouten

boven die der alkalimetalen, welke bij hunne ontleding alkalicarbonaten afscheiden, waardoor een storende invloed op den verderen groei wordt uitgeoefend, het voordeel, dat het medium bij hunne splitsing steeds neutraal blijft, aangezien daarbij calciumcarbonaat wordt gevormd. Het lag dus voor de hand om bij het onderzoek van de splitsing der vetzure zouten bepaaldelijk de calciumzouten te gebruiken.

Terwijl de tamelijk algemeene verspreiding van de propionaten de verwachting opwekt, dat zij gemakkelijk door mikroben zullen worden vergist, leert het onderzoek verrassender wijze, dat in 't geheel geen aantasting daarvan onder anaërobe omstandigheden tot stand komt.

Geheel anders echter gedroeg zich het calciumbutyraat, dat tot eene nog krachtiger gisting aanleiding gaf dan het calciumacetaat en waarbij methaan, koolzuur en calciumcarbonaat gevormd worden, zoodat geen propaan ontstaat, zooals bij eene hydrolytische splitsing, analoog aan die van het calciumacetaat, te wachten was. Ook werden geen waterstof, kooloxyd of hoogere koolwaterstoffen aangetoond, niettegenstaande men die bij afbreking dezer betrekkelijk gecompliceerde verbinding verwachten kon.

Het gansche verloop der gisting van caciumbutyraat bleek te kunnen worden voorgesteld door de formule:

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 3\ H_2O = 5\ CH_4 + 2\ CO_2 + CaCO_3.$$

Door dit proces, hetwelk reeds uitgewerkt was voordat Omelianski zijne korte aanteekening over de butyraatsplitsing publiceerde, was dus eene nieuwe bron voor de vorming van CH_4 ontdekt en wel in het zeer algemeen verspreid voorkomende boterzuur.

Het calciumvaleraat kon onder geen omstandigheid in gisting gebracht worden en gedroeg zich alzoo geheel als het propionaat.

Deze uitkomsten gaven aanleiding tot het stellen van de vraag, of wellicht een verschil zou bestaan in het al of niet vergistbaar zijn der vetzure zouten.

Eene beschouwing van de wijze, waarop het uiteenvallen van het acetaat en butyraat plaats heeft onder methaanvorming met betrekking tot hunne samenstelling, leidde tot de onderstelling, dat de zouten van de zuren met een even aantal koolstofatomen wel, die met een oneven aantal niet vergistbaar zijn. Het onderzoek deed blijken dat deze theorie juist is, zoodat de zouten van azijnzuur, boterzuur, capronzuur, caprylzuur en caprinezuur vergisten volgens de formules:

Wat betreft het calciumacetaat:

$$C_4\ H_6\ O_4\ Ca + H_2O = 2\ CH_4 + CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Wat betreft het calciumbutyraat:

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 3\ H_2O = 5\ CH_4 + 2\ CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Wat betreft het calciumcapronaat:

$$C_{12}\ H_{22}\ O_4\ Ca + 5\ H_2O = 8\ CH_4 + 3\ CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Wat betreft het calciumcaprylaat:

$$C_{16}\ H_{30}\ O_4\ Ca + 7\ H_2O = 11\ CH_4 + 4\ CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Wat betreft het calciumcaprinaat:

$$C_{20}\ H_{38}\ O_4\ Ca + 9\ H_2O = 14\ CH_4 + 5\ CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Daarentegen ontleden de zouten van propionzuur ($C_3\ H_6\ O_2$), valeriaanzuur ($C_5\ H_{10}\ O_2$), heptylzuur ($C_7\ H_{14}\ O_2$) en nonylzuur ($C_9\ H_{18}\ O_2$), die alle een oneven aantal koolstofatomen hebben, niet onder anaërobe condities.

Verschillende gasanalyses, in het historisch overzicht genoemd, hadden bij mij het vermoeden doen ontstaan, dat in zekere gevallen de waterstof in gistingen verdwijnt.

Bepaaldelijk de butyraatgisting gaf aanleiding dit punt nader te vervolgen, waarbij bleek, dat deze verwachting bewaarheid werd en tevens kwam hierbij aan het licht, dat de verdwenen waterstof aan eene hoeveelheid nieuw gevormd methaan beantwoordde.

Teneinde deze omzetting tot stand te doen komen, konden twee wegen worden ingeslagen; òf de waterstof kon door eene gisting gelijktijdig met de butyraatgisting ontwikkeld worden, waarvoor de bekende waterstofgisting van het formiaat gekozen werd, òf de waterstof kon kunstmatig als chemisch bereid gas worden toegevoegd. In het laatste geval verliep het proces in de verwachte richting, volgens de formule:

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 8\ H_2O = 7\ CH_4 + H_2O + Ca\ CO_3.$$

Eveneens absorbeerde eene calciumacetaatontleding waterstof volgens de formule:

$$C_4\ H_6\ O_4\ Ca + 4\ H_2 = 3\ CH_4 + H_2O + Ca\ CO_3,$$

terwijl ook in het eerste uitsluitend methaan en koolzuur ontstonden:

$$C_8\ H_{14}O_4Ca + 2\ C_2H_2O_4Ca + 3\ H_2O = 6\ CH_4 + 3\ CO_2 + 3\ CaCO_3.$$

Het lag voor de hand, te vermoeden, dat bij de butyraat-formiaatgisting ook aanvankelijk waterstof kon gevormd worden en dat deze gelijktijdig bij de butyraatgisting zou worden geabsorbeerd. Het verloop van de gistingssnelheid en de samenstelling der gassen waren evenwel met deze onderstelling niet in overeenstemming en het bleek, dat de methaanvorming daarbij moet verklaard worden uit een tot heden onbekend gebleven proces en wel de vergisting van formiaat tot methaan.

Deze gisting, welke men in hoofdstuk I beschreven vindt onder den titel van *gisting van mierenzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat*, verloopt volgens de formule:

$$2\ C_2\ H_2\ O_4\ Ca = CH_4 + CO_2 + Ca\ CO_3.$$

Het calciumformiaat kan dus onder den invloed van het mikrobenleven op twee geheel verschillende wijzen worden afgebroken. Eene waterstofgisting ontstaat, indien pepton als stikstofbron aan de kultuur wordt toegevoegd, terwijl eene ontleding onder vorming van methaan, koolzuur en calciumcarbonaat dan plaats heeft, wanneer chloorammonium als stikstofbron aanwezig is.

De mikroben, welke de formiaatwaterstofgisting veroorzaken behooren tot de Aërobactergroep; de werkzame fermenten in de kulturen der formiaatmethaangisting bleken dezelfde te zijn als die, welke het butyraat tot methaan vergisten.

Omtrent den aard van de bij de methaangistingen uit vetzure zouten betrokken mikroben was tot dusver zeer weinig bekend. Uit eenige voorloopige onderzoekingen in het Mikrobiologisch Laboratorium te Delft, later door Mazé en Omelianski bevestigd, was reeds gebleken, dat eene sarcinesoort bij de gisting van acetaten en butyraten betrokken kan zijn. Het lag dus op mijn

weg om ook de natuur van de werkzame mikroben nauwkeuriger te bestudeeren.

Twee totaal verschillende gistingsorganismen eene sarcine en eene staafbakterie, beschreven in hoofdstuk I § 7, zijn beide als oorzaken van de methaanvorming herkend. Deze fermenten zijn niet alleen in staat acetaten en butyraten te ontleden, maar tevens zijn zij de werkzame mikroben in de methaangistingen der calciumzouten van hoogere vetzuren en van eiwitachtige stoffen.

Bovendien is gebleken, dat alle tot nu toe als methaanvormers bekende mikroben, het vermogen bezitten, de waterstof te kunnen binden onder methaanvorming.

De overweging, dat bij de formiaatmethaangisting waarschijnlijk één van de vier carboxylgroepen van het molecuul tot methaan wordt door waterstof, welke intermoleculair ontstaat, deed vermoeden, dat ook één der overige carboxylgroepen wellicht door toevoeging van elementaire waterstof in methaan zou kunnen worden veranderd. Het onderzoek leerde, dat dit proces inderdaad plaats had. Bij toevoeging van waterstof aan eene mierenzure kalkgisting wordt twee keer zooveel methaan ontwikkeld als bij de ontleding van het zout zonder waterstoftoevoeging. Doch tevens bleek bij de bestudeering van deze omzetting, dat eene grootere hoeveelheid waterstof verdween dan volgens deze opvatting mogelijk was, terwijl te veel methaan werd gevormd. Daar geen andere koolstofbron in de kultuur aanwezig was, waaruit deze overmaat methaan verklaard kon worden, dan koolzuur van het bicarbonaat, dat bij de enting met het mikrobenmateriaal was medegebracht, werd het zeer waarschijnlijk, dat er een proces zou bestaan, volgens hetwelk waterstof en koolzuur tot methaan kunnen vergisten.

Door eene serie onderzoekingen, waarbij slechts koolzuur en waterstof als voedings- en energiebron waren toegevoegd aan de kulturen, kon het bestaan van dit onbekende biochemisme worden bewezen en het verloop daarvan worden teruggegeven door de formule:

$$CO_2 + 4\ H_2 = CH_4 + 2\ H_2O.$$

Dit proces is beschreven in hoofdstuk II.

De waterstofabsorptie, die plaats heeft in de methaangistingen van calciumacetaat en -butyraat, kon ten slotte verklaard worden als een gevolg van dit eenvoudige proces.

Dat echter de waterstof ook door geheel andere fermenten tot verdwijnen kan worden gebracht, bewees het feit, dat dit gas wordt geabsorbeerd door gepasteuriseerde kulturen van eene cellulose-methaangisting.

De resultaten van deze proeven gaven tevens aanleiding tot het opstellen eener verklaring van de wijze, waarop de scheiding der cellulose-methaan- en cellulose-waterstofgisting plaats heeft.

Door de hier beschreven waterstofabsorptie, welke waarschijnlijk overal op de aardoppervlakte zal plaats hebben, kan het waterstofgehalte in de atmospheer nagenoeg constant blijven.

Hoe ook ontstaan, hetzij bij biochemische processen gevormd, hetzij door vulkanen uitgestooten, zal de waterstof langs de bovengenoemde wegen door de methaanmikroben in het organische leven kunnen worden opgenomen, om gedeeltelijk in den vorm van methaan weder in den dampkring te treden.

Ten slotte is nog gebleken, dat niet alleen de waterstof, maar ook het methaan door mikroben geabsorbeerd wordt en als koolstof- en energiebron dienen kan.

Terwijl ik aanvankelijk meende, dat dit proces slechts onder den invloed van één specifieke mikrobensoort tot stand komt, reeds beschreven onder den naam van Bacillus methanicus, die dit gas bij luchttoetreding ten deele oxydeert volgens de formule:

$$CH_4 + 2\ O_2 = CO_2 + 2\ H_2O,$$

is later gebleken, dat ook andere mikroben in staat zijn van methaan te leven, zoodat het als zeker kan worden beschouwd, dat het methaan in de natuur moet bijdragen tot het onderhoud eener mikrobenflora.

Thans zal ik overgaan tot de behandeling der hier in het algemeen genoemde punten.

HOOFDSTUK I.

Het ontstaan van methaan door gisting van organische verbindingen.

§ 1. Gisting van calciumacetaat tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat.

Als uitgangspunt voor mijne onderzoekingen koos ik de herhaling van de proeven van Hoppe-Seyler aangaande de splitsing der acetaten, om die aan eene contrôle te onderwerpen ten aanzien van het door hem opgegeven kwantitatieve verloop dezer gisting. Zooals te verwachten was, bleken de waarnemingen, welke hem aanleiding gaven onderstaande formule daarvoor vast te stellen, geheel juist te zijn.

$$C_4H_6O_4Ca + H_2O = 2CH_4 + CO_2 + CaCO_3.$$

Alleen moet er op gewezen worden, dat zijne proefneming 8 maanden duurde, terwijl door toepassing van de kultuurmethode, in de volgende paragraaf beschreven, deze tijd verkort wordt tot enkele weken. Eenige volgens de laatstbedoelde methode van werken uitgevoerde proefnemingen gaven de volgende resultaten.

Het gasmengsel, vrijkomende uit eene acetaatkultuur, bestaat inderdaad, overeenkomstig de formule, uit methaan en koolzuur in de verhouding van 2 : 1, zooals uit onderstaande cijfers blijkt. Van eene proef, welke den 5den Januari 1905 werd ingezet en waarvan de gassen boven kwik werden opgevangen, zijn hier eenige analyses der ontwikkelde gassen weergegeven.

6 Januari	85,6 c.c. gas	18 Januari	91 c.c. gas
bevatten	56,1 c.c. CH_4		60,1 c.c. CH_4
en	29,5 c.c. CO_2		30,9 c.c. CO_2
26 Januari	58,4 c.c. gas		
bevatten	39,2 c.c. CH_4		
en	19,2 c.c. CO_2		

Na dien datum werd de gisting steeds geringer en daarom den 4den Februari afgebroken. Van twee andere proeven, welke beide van 1.58 gr. droog calc. acetaat voorzien waren en eveneens den 5den Januari ingezet, werden de gassen boven 50% ige kaliloog opgevangen. Ze bestonden slechts uit methaan; het koolzuur was in de kali opgelost. Ook deze gistingen waren den 4den Februari geeindigd, ze hadden respectievelijk 450 en 438 c.c. methaan geleverd.

De vloeistoffen van de uitgegiste kulturen bevatten geen calciumacetaat meer, zoodat dit geheel moet zijn vergist. Uit 1,58 gram calc. acet. zou volgens bovenstaande formule 470 c.c. methaan kunnen gevormd worden, zoodat bij deze gistingen ongeveer 95% van het toegevoegde acetaat op deze wijze onder gasproduktie wordt vergist, terwijl de rest dan in bacteriënmateriaal wordt omgezet. Deze onderzoekingen stemmen geheel overeen met die van Hoppe-Seyler over dit onderwerp; genoemde onderzoeker bepaalde echter niet de totale hoeveelheid gas, welke ontstaat bij zijne proefneming, maar wel de kwantiteit van het bij deze gisting gevormde calciumcarbonaat.

Overigens werden de methaangistingen van het acetaat herhaaldelijk aan een nauwkeurig mikroskopisch onderzoek onderworpen, waarover in § 6 van hoofdstuk II nader gesproken zal worden.

Daar er verder geen bepaalde vragen waren, die in verband staan met de studie der methaangisting uit acetaten, maar wel ten aanzien van die van de overige homologen, heb ik mij verder bepaaldelijk met deze laatste beziggehouden.

§ 2. Gisting van boterzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat.

Een kultuurbodem van de volgende samenstelling:

100 duinwater
0,05 % NH_4Cl.
0,05 % K_2HPO_4
2 % calciumbutyraat,

geeft na infectie met een groote hoeveelheid riool- of gracht-modder en opgesteld bij ± 35°, onmiddellijk eene vrij krachtige gisting. Gewoonlijk gebruikte ik kolven van ± 250 c.c. inhoud, waaraan ± 40 c.c. modder waren toegevoegd en welke verder met bovengenoemde kultuurvloeistof waren aangevuld. Tuingrond als entmateriaal gedraagt zich echter anders; aanvankelijk bemerkt men van eene gisting zeer weinig, na eenige weken treedt ze merkbaar op; toch verloopt het proces nooit zoo krachtig als bij infectie met bovengenoemde materialen.

Opmerkelijk is, dat pogingen, om de vloeistof met weinig infectiemateriaal in gisting te brengen, zeer ongunstige resultaten opleveren en meestal totaal mislukken. Overenting van de vloeistof of het bezinksel uit de eerste kolf, na of gedurende de gisting in een tweede met denzelfden voedingsbodem, heeft al even weinig succes als de infectie met kleine kwantiteiten ruw entmateriaal. Zelfs, indien de geheele bovenstaande vloeistof, die gedurende het proces tamelijk helder blijft, voorzichtig wordt afgeschonken en als infectiemateriaal wordt gebezigd om een grootere kolf, met denzelfden voedingsbodem gevuld, te enten, geraakte deze vloeistof in 't geheel niet in gisting.

De werkzame mikroben bevinden zich dus blijkbaar uitsluitend in het bezinksel, waar de gassen ook gevormd worden en als groote bellen daaruit opstijgen. Deze gistingen onderscheiden zich daardoor van andere bekende, waarbij zeer kleine gasbelletjes overal in de vloeistof ontstaan. Toch leert het mikrobiologisch onderzoek, dat een zeer groot aantal aërobe kiemen in de bovenstaande vloeistof aanwezig zijn, die daaruit de zuurstof kunnen verwijderen, maar blijkbaar met de methaangisting niet in direkt verband staan.

Wordt de uitgegiste vloeistof van een calciumbutyraatgisting van het bezinksel afgegoten en daarop eene versche kultuurvloeistof geschonken, dan treedt na eenige uren de gisting weder opnieuw in. Door herhaald afgieten, zoodra *de gistingssnelheid*

begint te verminderen en opnieuw opschenken van nieuwe oplossing, verkrijgt men na maanden een bijkans wit bezinksel, waarin de eigenlijke gistingsfermenten zich langzamerhand hebben opgehoopt. De versche kultuurvloeistoffen toch, die nu op het bezinksel geschonken worden, vergisten buitengewoon krachtig; in 3 tot 4 weken is het proces totaal afgeloopen, terwijl dit zich bij gebruik van versche rioolmodder over vele maanden uitstrekt.

Het mikroskopisch onderzoek bewijst, dat zich in het bezinksel fermenten van eene bepaalde natuur hebben opgehoopt, die blijkbaar als de oorzaak der gisting moeten worden beschouwd.

Het is met de boven beschreven wijze van werken mogelijk deze gisting in drie of vier weken te laten verloopen, terwijl zij bij HOPPE-SEYLER 8 maanden vereischte. Daardoor is het mogelijk haar van het begin tot het einde te bestudeeren, de voorwaarden, waaronder zij het best plaats heeft vast te stellen, de produkten, welke door de omzettingen onstaan, te verzamelen en te analyseeren.

De samenstelling der gassen werd bepaald, nadat deze boven kwik waren opgevangen, waarbij ik gebruik maakte van het gistingsapparaat, zooals dit in Fig. 1 is weergegeven.

Te dien einde werden de kultuurkolven voorzien van goedsluitende gummistoppen met ééne doorboring, waardoor een omgebogen glazen buisje de gassen onder in een buret, gevuld met kwik, voerde. [1])

[1]) Uit de resultaten der proeven, welke HOPPE-SEYLER verrichtte over de diffusiesnelheid van gassen door gummiplaten, zou volgen, dat gummistoppen niet mogen worden gebruikt aan toestellen, bestemd voor gasanalytische doeleinden. Hij nam deze proeven, teneinde te trachten eene verklaring te vinden voor het groote gasverlies, dat moet hebben plaats gehad gedurende zijn onderzoek der cellulosegistingen.

Zijne gevolgtrekking grondde HOPPE-SEYLER op de volgende proefneming.

In eene buis van 22 m M. middellijn, werd een gummistop met eene doorboring, waarin een passend glazen staafje, ingeperst, zoodat een 15 m.M. lang gedeelte zich in de buis bevond. Dit apparaatje werd geheel met kwik gevuld en met het open einde in een bak met kwik gezet, daarna met gas uit een moddergisting zoodanig voorzien, dat het kwikniveau in de buis 3,5 c.M. hooger stond dan daarbuiten. 14 dagen bleef het toestel op eene koele plaats staan; daarna werd het gasmengsel geanalyseerd.

Onder A. vinden we de samenstelling van het gas in volume-procenten

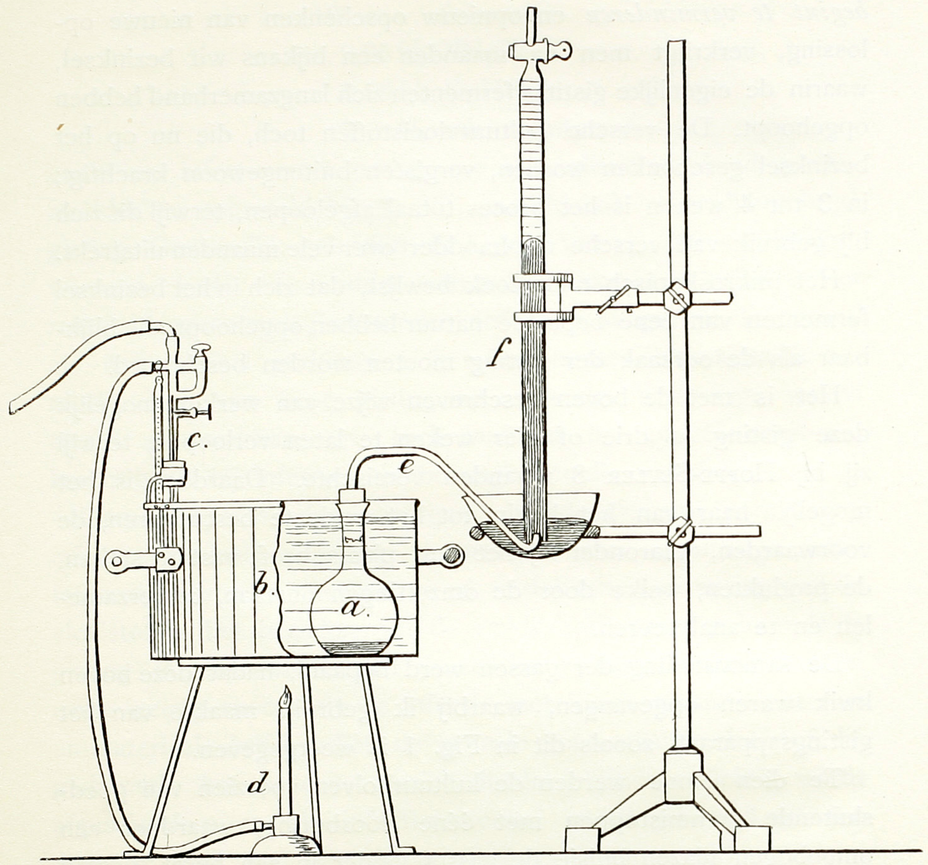


Fig. 1.

Gistingsapparaat met inrichting voor het opvangen der gistingsgassen.
a. Gistingskolfje van 150 c.c. inhoud. *d.* Brander.
b. Waterbad van konstante temperatuur 36° C. *e.* Afvoerbuis voor het gas.
c. Thermoregulator. *f.* Gasburet.

Zoowel de kulturen met versche modder als die met het allengs gezuiverde gistingsmateriaal ontwikkelden een gasmengsel

---

bij den aanvang der proef. Onder B. de samenstelling na 14 dagen.

	A.	B.	Verschil tusschen A. en B.
CO_2	37,687	32,102	— 5.585
CH_4	62,313	60,580	— 1,733
O_2		0,677	+ 0,677
N_2		6,641	+ 6,641

Hoewel de druk van het koolzuur bij deze proef de helft is van die

slechts bestaande uit methaan en koolzuur. Met het oog op de constitutieformule van het calciumbutyraat schijnt het vreemd, dat methaan en koolzuur ontstaan en niet propaan en koolzuur, zooals men zoude verwachten naar analogie met de hydrolytische splitsing van calciumacetaat volgens de vergelijkingen:

---

van het methaan, was toch de hoeveelheid gediffundeerd koolzuur 3 keer zoo groot als die van het methaan; even vreemd is de verhouding waarin stikstof en zuurstof naar binnen diffundeeren; hunne verhouding in de atmospherische lucht is ongeveer $\frac{4}{1}$ en toch diffundeerde 10 keer zooveel stikstof als zuurstof door de stop.

Aangezien ik bij mijne proeven gewoonlijk gummistoppen met doorboring en glazen afleidbuis als sluiting voor gistingskolven bezigde en mij de cijfers van Hoppe-Seyler zeer vreemd voorkwamen, heb ik eenige proeven genomen over de diffusiesnelheid van waterstof door gummistoppen.

Twee champagneflesschen werden elk met een gummistop, voorzien van eene doorboring, waardoor een glazen buis met kraan was gestoken, stevig gesloten; de stoppen waren vooraf met vaseline ingesmeerd en konden daardoor zeer ver in de hals worden geperst, waarna ze met eenen champagneknoop van koperdraad op de flesch gehouden werden.

Beide flesschen werden nu beurtelings 6 keeren leeggepompt en met waterstof bij gewonen druk gevuld, daarna gesloten en in een thermostaat van 35° gelegd. Na 14 dagen werd de eene onderzocht en nu bleek, dat niet de minste verandering in de samenstelling van het gas in de flesch waar te nemen was. De volgende feiten waren hiervoor bewijzend:

1e. Bij het openen der kraan werd, terwijl het einde van het glazen buisje onder water was gedompeld, geen water naar binnen gezogen, hetgeen na diffusie van waterstof uit de flesch zeker het geval zou zijn geweest.

2e. Bij het analyseeren van het gas uit de flesch bleek de samenstelling daarvan geheel overeen te komen met die van zuivere waterstof.

1e Analyse.	2e Analyse.
31,4 c.c. gas.	34,7 c.c. gas.
97,3 c.c. na O_2 toevoeging.	96,6 c.c. na O_2 toevoeging.
50,1 c.c. na ontploffing.	44,55 c.c. na ontploffing.

Na eene maand waren uit de tweede flesch ongeveer 3 c.c. gas verdwenen. De samenstelling van het gas kwam echter geheel overeen met die van waterstof.

Er heeft dus bij de waarnemingen van Hoppe-Seyler eene vergissing plaats gehad, of misschien ook waren zijne gummistoppen niet van zulk goed materiaal vervaardigd als die, welke ik tot mijne beschikking had. Bij mijne volgende proeven heb ik derhalve goede gummistoppen zonder aarzelen als gasafsluiting durven gebruiken.

$$\left.\begin{matrix}CH_3\,COO\\CH_3\,COO\end{matrix}\right\rangle Ca + H_2O = 2\,CH_4 + CO_2 + CaCO_3,$$

$$\left.\begin{matrix}C_3H_7\,COO\\C_3H_7\,COO\end{matrix}\right\rangle Ca + H_2O = 2\,C_3H_8 + CO_2 + CaCO_3.$$

Toch bleek het gasmengsel bij de nauwkeurigste analyses geen spoor waterstof of kooloxyd, noch hoogere koolwaterstoffen te bevatten. Teneinde de aanwezigheid van geringe hoeveelheden waterstof, welke bij deze gisting misschien toch zouden kunnen ontstaan, met zekerheid aan te toonen, werd, aangezien de gasanalyse door verbranding aan nauwkeurigheid te wenschen overlaat, een apparaat geconstrueerd, waarmede een volume van $\pm$ 100 c.c. gas zeer nauwkeurig op waterstof kan worden onderzocht.

Hiertoe werd gebruik gemaakt van het vermogen, dat het metaal palladium, vooral in den vorm van spons, bezit, bij een temperatuur van 100° C. in sterke mate gasvormige waterstof te kunnen absorbeeren. De hierbij ontstane verbinding van palladium met waterstof is bij lage temperatuur bestendig, valt echter bij hoogere temperatuur uiteen, zoodat men door uitgloeien het na eenigen tijd onwerkzaam geworden absorptiemateriaal weer regenereeren kan.

Het apparaat (Fig. 2) bestaat uit een glazen buis *a* van 15 c.M. lengte, waarin een palladium schuitje *s*, gevuld met palladiumspons, is gebracht; de buis rust in een ijzeren kokertje en wordt door een vlam op $\pm$ 100° verwarmd; ze is aan beide einden voorzien van gummistoppen, waardoor capillairbuizen loopen, die met de driewegkranen *b* en *c* in verbinding staan. Deze driewegkranen geven de gelegenheid, het eene einde der buis met een koolzuurapparaat en een kwikburet te verbinden, het andere einde met een koolzuurabsorptie-apparaat en een kwikburet.

De buis *a* en de daarmede verbonden capillairen worden met koolzuur uit het koolzuurapparaat gevuld, hetgeen ten doel heeft de lucht geheel uit het toestel te verdrijven. Door de schuine stand van buis *a* is dit in enkele minuten bereikt, hetgeen men contrôleert door het doorstroomende gas in de kalipipet, aan *kp* verbonden, op te vangen. Daarna wordt het te onderzoeken gasmengsel, dat vooraf ontdaan is van koolzuur, door middel

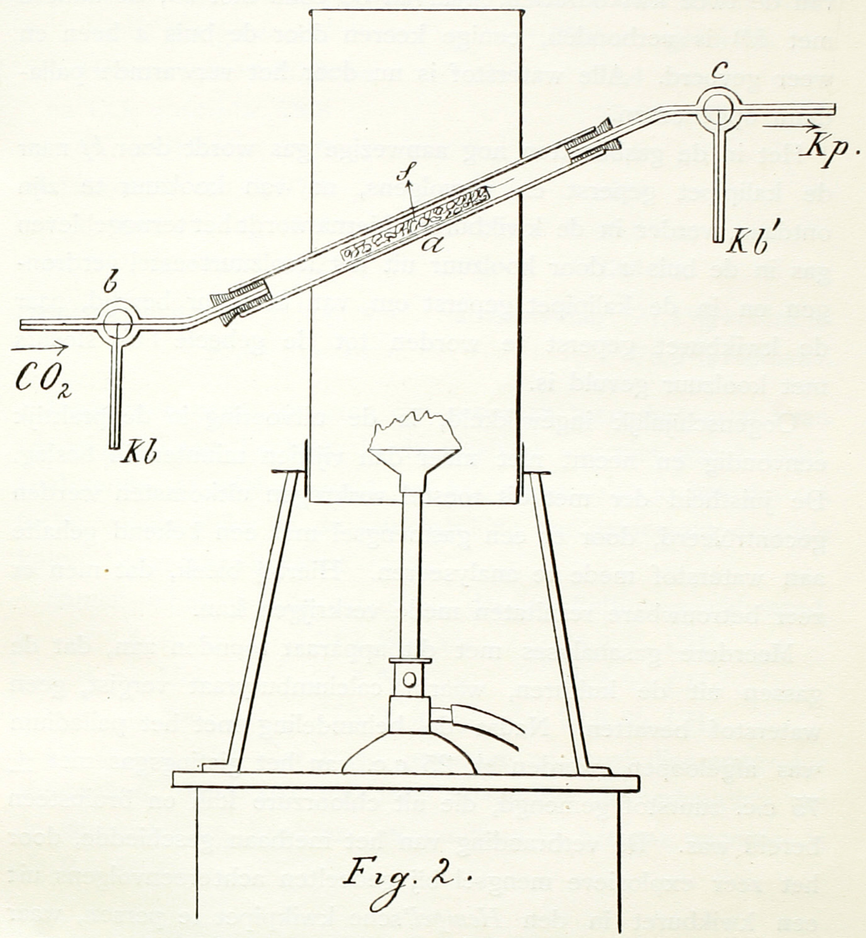


Fig. 2.

Apparaat voor de kwantitatieve waterstofbepaling door middel van palladium.

a. Glazen buis.
b. Glazen driewegkraan.
c. Idem.
s. Schuitje van palladiumblik, gevuld met palladiumspons.
CO_2. Toevoer van het koolzuur.
Kb. Capillaire buis, waaraan een kwikburet verbonden.
Kb′. Idem.
Kp. Capillaire buis, waaraan de kalipipet is verbonden.

van de twee kwikburetten, waarvan de eene met *kb*, de andere met *kb*1 is verbonden, eenige keeren door de buis *a* heen en weer gevoerd. Alle waterstof is nu door het verwarmde palladium opgenomen.

Het in de gasburetten nog aanwezige gas wordt door *kp* naar de kalipipet geperst en vervolgens, na van koolzuur te zijn ontdaan, verder in de kwikburet; hierna wordt het teruggebleven gas in de buis *a* door koolzuur uit het koolzuurtoestel verdrongen en in de kalipipet geperst om, van koolzuur bevrijd, naar de kwikburet geperst te worden tot de geheele buis slechts met koolzuur gevuld is.

Oogenschijnlijk ingewikkeld, is de uitvoering in de praktijk eenvoudig en neemt niet meer dan vijftien minuten in beslag. De juistheid der met dit toestel verkregen uitkomsten werden gecontrôleerd, door er een gasmengsel met een bekend gehalte aan waterstof mede te analyseeren. Hierbij bleek, dat men er zeer betrouwbare resultaten mede verkrijgen kan.

Meerdere gasanalyses met dit apparaat toonden aan, dat de gassen uit de kulturen, waarin calciumbutyraat vergist, geen waterstof bevatten. Nadat de behandeling met het palladium was afgeloopen, werden ± 25 c.c. van het gistingsgas met ± 75 c.c. zuurstof gemengd, die uit chloorzure kali en bruinsteen bereid was. De verbranding van het methaan geschiedde, door het zeer explosieve mengsel bij gedeelten achtereenvolgens uit een kwikburet in den *Hempel*'sche kwikpipet te persen, waar het door een electrische vonk werd ontstoken. Ik volgde deze methode om in een klein volume veel methaan te kunnen verbranden, waardoor de fouten geringer worden.

Van het groot aantal proeven, dat werd verricht, zijn eenige analyses als voorbeeld hieronder gegeven.

Eene kultuur, welke ± 200 c.c. van bovengenoemden voedingbodem bevat en geinfecteerd is met ± 40 c.c. rioolmodder, werd den 2den Maart 1905 bij 30° ingezet. Het ontwikkelde gas werd boven kwik opgevangen.

Den 5den Maart waren ± 200 c.c. gas gevormd.	Den 13den Maart waren weder ± 200 c.c. gevormd.
Hiervan gaven 86,2 c.c	98,4 c.c.
na CO_2 absorptie 78,3 ,,	77,65 ,,
en hiervan 24,6 ,,	24,5 ,,
na toevoegen van O_2 97,4 ,,	95,8 ,,
na ontploffing 47,9 ,,	46,8 ,,
na CO_2 absorptie 43,25 ,,	22,4 ,,
Samenstelling: 9,2 % koolzuur. 90,8 % methaan.	Samenstelling: 21,1 % koolzuur. 78,9 % methaan.

Deze twee eerste proeven zijn genomen toen de toestand van verzadiging van koolzuur in de vloeistof nog niet was bereikt. Gedurende de gisting stijgt het koolzuurgehalte in het gas tot 28 %, zooals blijkt uit de samenstelling der gassen uit dezelfde kultuur later geanalyseerd.

Samenstelling van de gassen uit dezelfde kultuur geanalyseerd.

1 April:	24,3 % CO_2	75,7 % CH_4
1 Mei:	27,2 % CO_2	72,8 % CH_4
25 Mei:	27,5 % CO_2	72,5 % CH_4

De gisting was zeer traag geworden en werd dientengevolge afgebroken. Men ziet uit deze cijfers dat de verhouding van de hoeveelheden koolzuur en methaan in het gas ongeveer is als 2 : 5.

Optimumtemperatuur van de butyraatgisting.

De optimumtemperatuur van de gisting, is de temperatuur, waarbij onder overigens gelijke omstandigheden de maximumsnelheid van gisting wordt verkregen. Door een even groot aantal fermenten bij verschillende temperaturen, gelijke concentraties calciumbutyraat te laten vergisten, werd zij bepaald.

Teneinde gelijke hoeveelheden fermenten te verkrijgen, werd eene groote hoeveelheid bacteriënmateriaal krachtig opgeschud in water en gelijk verdeeld over 5 kolfjes, elk van 200 c.c. inhoud: A, B, B1, C en D, welke daarna met eene oplossing 100 duinwater, 0,05 K_2HPO_4, 0,05 NH_4Cl, 1 calc.butyr. waren voorzien, en bij verschillende temperaturen werden geplaatst.

De ontwikkelde gassen werden boven 50 % ige kaliloog opgevangen. Voor de contrôle waren twee kolven bij 35° opgesteld; deze zouden dus even snel moeten gisten.

16 Maart 1905 5 uur n.m. werden de kulturen ingezet.

	Kolf A 45°	B 35°	B1 35°	C 30°	D 25°
17 Maart 10 uur v.m.	33 c.c.	21 c.c.	23 c.c.	18 c.c.	12 c.c.
17 „ 5 uur n.m.	37 „	38 „	40,5 „	30,5 „	19 „
18 „ 10 uur v.m.	49 „	91 „	95 „	68,5 „	42,5 „

Reeds na 2 dagen bleek, dat de temperatuur van 45° boven het optimum der gisting ligt en wel dichtbij het maximum, aangezien de gasontwikkeling in snelheid afnam. Zooals het verder onderzoek leerde, was een groot deel der fermenten reeds gedood, want de kultuur, daarna bij 35° geplaatst, vergistte slechts zwak door.

Beneden het optimum liggen de temperaturen 25° en 30°.

Om nu de grenzen nauwer aan te halen, is nog de volgende proef gedaan; hiervoor plaatste ik B1 bij 30°, C bij 35°, B bij 38° en D bij 40°, na ze opnieuw van versche oplossing te hebben voorzien.

20 Maart 1905 5 uur n.m. werden de kulturen ingezet.

	Kolf B1 30	C 35°	B 38°	D 40°
23 Maart 10 uur v.m.	21 c.c.	22,5 c.c.	28 c.c.	31,5 c.c.
21 „ 5 uur n.m.	32 „	38,5 „	45,5 „	43,5 „
22 „ 10 uur v.m.	68,5 „	88 „	87,5 „	65 „
22 „ 5 uur n.m.	87 „	110 „	102 „	73,5 „

B, B1 en C, alle bij 35°, gistten ongeveer even sterk waaruit blijkt, dat de methode ter bepaling van het optimum nauwkeurig is. Ze verschillen meer dan voldoende in snelheid van gasontwikkeling met D, A en B1 om met zekerheid vast te stellen, dat het optimum van de gisting tusschen 35° en 38° ligt. De verdere proeven zijn dientengevolge bij deze temperaturen uitgevoerd.

Teneinde de vergisting van het calciumbutyraat kwantitatief na te gaan, werd eene serie onderzoekingen verricht met het chemisch zuivere zout. Dit verschafte ik me, door het herhaaldelijk gerectificeerde normale boterzuur van KAHLBAUM met zuiver $CaCO_3$ te neutralyseeren, hetgeen een produkt opleverde, dat als zijdeglanzende rhombische blaadjes uit water kristalliseerde met eene samenstelling $C_8H_{14}O_4Ca + H_2O$.

Na omkristallisatie van dit zout in water, waarbij gebruik werd gemaakt van de mindere oplosbaarheid van butyraat bij hooge dan bij lage temperatuur (oplossen bij 14°, uitkristalliseeren bij 80°), werd een calciumbutyraat verkregen, dat als chemisch zuiver beschouwd mag worden. Bij 150° gedroogd is het watervrij en bevat 26,2 % CaO; 0,527 gram calc. but. geeft na gloeien 0.1381 gr. CaO = 26,2 % CaO; 0.505 gram calc. but. geeft na gloeien 0,1313 gr. CaO = 26,2 %.

Theoretisch bevat boterzure kalk 26,17 % CaO.

Bij de voorafgaande proeven was leidingwater gebruikt, dat kleine hoeveelheden sulfaten bevat, die aanleiding kunnen geven tot verlies van butyraat tengevolge van sulfaatreductie; daarom is in de volgende proeven dit leidingwater vervangen door gedistilleerd water en anorganische zouten.

Met fermenten eener kultuur, welke van Februari af wekelijks van versche oplossing was voorzien, werd einde Mei eene proef ingezet; het bezinksel had eene lichtgrijze tint en vergistte de kultuurvloeistof, welke kleurloos en bijkans helder was, buitengewoon krachtig. De ontwikkelde gassen werden boven kwik opgevangen.

Aan ± 25 c.c. van deze fermenten waren gedistilleerd water, anorganische zouten en 1,07 gram calc.butyraat toegevoegd.

Den 25sten Mei 1905 om 5 uur n.m. werd de gisting bij 35° ingezet; den 26sten Mei om 9 uur was de kwikburet van 100 c.c. geheel volgegist; het gasmengsel daarin had de samenstelling: 89 % CH_4, 9,5 % CO_2, 1,5 % N_2. Het gasmengsel, dat gedurende de volgende dagen zich ontwikkelde, werd steeds rijker aan koolzuur; zoo was den 28sten Mei de samenstelling van het gas: 73,5 % CH_4, 26,5 % CO_2, den 4den Juni: 71,6 CH_4, 28,4 CO_2. De gistingssnelheid werd zeer gering, zoodat de kultuur den 13den Juni, toen nog 85 c.c. waren ontwikkeld, bestaande uit 28,6 % CO_2 en 71,4 % CH_4, practisch was afgeloopen.

De verhouding van koolzuur en methaan beantwoordde aan 't einde der gisting, toen de kultuur met koolzuur verzadigd was,

weder aan $\frac{CH_4}{CO_2} = \frac{5}{2}$ We zien dus, dat met ruwe modder en met de meer gereinigde kulturen der fermenten geheel overeenkomstige resultaten verkregen zijn; de gistingssnelheid der laatste was veel grooter.

Een nieuwe hoeveelheid calciumbutyraat aan deze met koolzuur verzadigde kultuur toegevoegd vergistte tot een gasmengsel van nagenoeg konstante samenstelling; het bevatte $\pm$ 28,6 % CO_2 en $\pm$ 71.4 % CH_4 gedurende het geheele verloop der proef, zooals dit aan 't eind der vorige het geval was.

Den 4den Juli was ook deze gisting ten einde en om nu uit te maken in hoeverre het organische zout al of niet volledig vergist was, werd de kultuurvloeistof gefiltreerd en ingedampt. Het filtreeren geschiedde nadat de kultuur opgekookt was ten einde het gevormde bicarbonaat, dat belangrijk oplosbaar is, te ontleden. Het verdampingsresidu bleek nu zeer gering te zijn en in hoofdzaak uit anorganische bestanddeelen te bestaan, daar het na gloeien geen merkbaar gewichtsverlies onderging. Het calciumbutyraat vergist dus blijkbaar tot methaan en koolzuur in de verhouding 5 : 2 en calciumcarbonaat. Door eenige proeven, welke den 4den December zijn begonnen, werd kwantitatief de hoeveelheid methaan bepaald, welke uit eene bepaalde hoeveelheid calc. but. kan ontstaan. Twee gistingen, elk met 1.07 gram calc. butyraat, waarvan de gassen boven 50 % ige kaliloog waren opgevangen, gaven respectievelijk 565 c.c. en 572 c.c. methaan en waren den 23sten December uitgegist.

De kultuurvloeistoffen bevatten na de gisting geen calciumbutyraat meer, noch andere organische produkten van eenige beteekenis.

De afbreking van het calciumbutyraat geschiedt zonder vorming van tusschenprodukten plotseling tot methaan en koolzuur, want in gedeeltelijk vergiste kulturen toch bleek na droogdampen alleen butyraat aanwezig te zijn, kenbaar aan de gemakkelijke oplosbaarheid in absoluten alcohol en aan den vorm der kristallen van koperbutyraat.

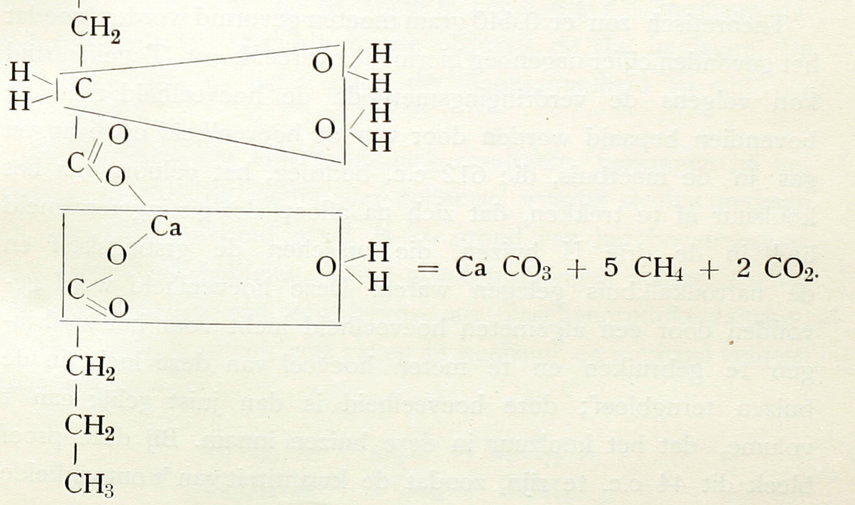
De eenvoudigste wijze, waarop men zich de afbreking der

boterzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat kan voorstellen, wordt uitgedrukt door de formule:

$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 3H_2O = Ca\ CO_3 + 2\ CO_2 + 5\ CH_4$,

welke overeenstemt met het reeds boven omschreven feit, dat koolzuur en methaan in de verhouding 2 : 5 uit de kultuur ontwijken en dat $\pm$ 567 c.c. methaan uit 1,07 gram calciumbutyraat worden ontwikkeld, terwijl theoretisch volgens deze formule 591 c.c. methaan zouden moeten ontstaan.

Ter verklaring van deze vergelijking zij aangenomen, dat, benevens de gewone hydrolytische splitsing, een α CH_2-groep als de meest actieve wordt geoxydeerd door de zuurstof van 2 moleculen water tot koolzuur en de hierdoor vrijkomende 6 atomen waterstof mede dienen tot vorming van CH_4 uit de overige CH_2- en CH_3-groepen. De onderstaande formule geeft eene voorstelling van deze omzetting.



$= Ca\ CO_3 + 5\ CH_4 + 2\ CO_2.$

Ten slotte werd nog een kwantitatieve proef genomen, om met zekerheid de hoeveelheid koolzuur, welke bij gisting van boterzure kalk ontstaat, vast te stellen. Deze bepaling werd gewichtsanalytisch uitgevoerd, door het koolzuur in natronkalk op te vangen. Achtereenvolgens werden de gassen, die ontstonden uit 1,07 gr. calciumbutyraat, gevoerd door een U buisje met

eene aangezuurde oplossing van kopersulfaat, teneinde zwavelwaterstof te absorbeeren, vervolgens door twee buisjes met chloorcalcium om het water op te vangen, daarna door een gewogen U buis, gevuld met natronkalk, die het koolzuur opnam, en met chloorcalcium, die het reactiewater terughield; aan 't einde werd nog een buisje met sterk zwavelzuur geplaatst, terwijl verdrongen lucht en gas in een meetbuis boven water werden opgevangen.

Na afloop der gisting, welke van den 8sten tot den 30sten Januari duurde, werd het koolzuur, dat nog in de buizen vóór de natronkalkbuis aanwezig was, door middel van een koolzuurvrije luchtstroom hierin overgevoerd. De hoeveelheid ontwikkeld koolzuur werd gevonden door weging:

Gewicht van de natronkalkbuis na de gisting:	71,3224 gram
Gewicht van de buis voor de gisting:	70,8793 gram
Gewicht koolzuur:	0,4431 gram.

Theoretisch zou er 0,440 gram moeten gevormd worden, zoodat het gevonden cijfer nagenoeg hiermede overeenkomt. Tegelijkertijd kon volgens de verdringingsmethode de hoeveelheid methaan bovendien bepaald worden door van de hoeveelheid opgevangen gas in de meetbuis, die 612 c.c. bedroeg, het volume van het koolzuur af te trekken, dat zich na afloop der gisting verzameld had in de drie U buizen, die tusschen de gistingskolf en de natronkalkbuis gelegen waren. Deze hoeveelheid werd gevonden door een afgemeten hoeveelheid lucht voor het verdringen te gebruiken en te meten hoeveel van deze lucht in de buizen terugbleef; deze hoeveelheid is dan juist gelijk aan 't volume, dat het koolzuur in deze buizen innam. Bij deze proef bleek dit 44 c.c. te zijn, zoodat de kwantiteit van 't ontwikkelde methaan 612 — 44 c.c. = 568 c.c. bedroeg.

Zooals reeds gezegd werd kan volgens de formule, door deze gisting (zie blz. 69) een volume van 591 c.c. methaan ontstaan uit 1,07 gram calciumbutyraat, zoodat er dus ongeveer 23 c.c. methaan, d.i. $\pm$ 4 % van de totale hoeveelheid, die kan worden gevormd, niet als zoodanig gevonden werd. Waarschijnlijk moet dit verklaard worden uit de steeds optredende sulfaat-

reductie, zichtbaar aan het kopersulfide in het U buisje met koperoplossing, waarbij een kleine hoeveelheid butyraat wordt geoxydeerd, die dus niet tot de methaanvorming kan bijdragen. Misschien moet ook het kleine surplus aan koolzuur hieruit verklaard worden.

Uit deze onderzoekingen volgt dus met voldoende zekerheid, dat de gisting van boterzure kalk nagenoeg kwantitatief plaats heeft volgens de formule:
$C_8 H_{14} O_4 Ca + 3 H_2O = 5 CH_4 + 2 CO_2 + CaCO_3$, een proces, dat tot de ontwikkeling van 34,8 calorien aanleiding zou kunnen geven.

$$-311.7 - 3 \times 69 = -5 \times 18.9 - 2 \times 95 - 269 + \mathbf{34.8.}$$

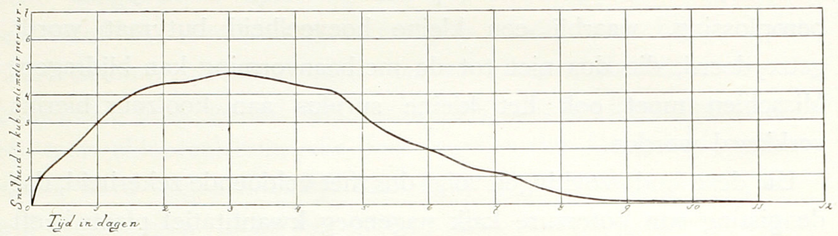
De grootste hoeveelheid van het organische zout dient den bacteriën als energiebron en slechts een zeer klein gedeelte wordt voor den opbouw der bacteriënlichamen gebruikt.

Hier achter is eene graphische voorstelling van het verloop der gisting gegeven; op de abcis is het aantal c.c. methaan, dat per uur ontstaat, uitgezet, op de ordinaat de tijd in dagen. De lijn geeft dus in ieder punt de gistingssnelheid in c.c. per uur aan.

De juistheid van Hoppe-Seyler's resultaten, verkregen bij het onderzoek over de gisting der cellulose, waarbij slechts methaan en koolzuur gevormd werd, is op grond van het bovenstaande niet meer te betwijfelen. Zijne gevolgtrekkingen echter, waarbij hij het ontstaan van een hexose als tusschenprodukt aannam, hetwelk daarna uiteen zou vallen in koolzuur en methaan volgens de formules:

$$C_6 H_{10} O_5 + H_2 O = C_6 H_{12} O_6$$
$$C_6 H_{12} O_6 = 3 CO_2 + 3 CH_4,$$

moeten als onjuist verworpen worden, sedert Omelianski als produkten der cellulosegisting boterzuur en azijnzuur vond. Deze zuren toch zullen in den vorm van hunne calciumzouten gemakkelijk vergisten tot methaan en koolzuur, zoodat als eindprodukten der cellulosegisting ten slotte niets dan koolzuur, methaan en calciumcarbonaat overblijven.



1. Grafische voorstelling van het verloop der butyraatgisting.

TABEL van het verloop der methaangisting van 1,07 gram boterzure kalk, waaruit bovenstaande grafische voorstelling is afgeleid.

			Totaal aantal c.c.	Aantal c.c. per uur.	Aantal uren.
1906 Januari	30	10 uur v.m.	0	0	0
		5 uur n.m.	7	1	7
	31	10 —	49,5	2,5	24
		5 —	73	3,3	31
Februari	1	9 —	138	4,1	47
		5 —	173	4,4	55
	2	9 —	246	4,6	71
		5 —	284	4,8	79
	3	10 —	360	4,5	96
		5 —	390	4,3	103
	4	10 —	458	4	120
		5 —	479	3	127
	5	10 —	518	2,3	144
		5 —	531	1,9	151
	6	10 —	552	1,3	168
		5 —	569	1,1	175
	7	10 —	570	0,6	192
		5 —	572	0,3	199
	9	10 —	577	0,1	240
	11	5 —	578	0,02	295
	13	5 —	578	0,0	343

§ 3. Gisting van boterzure kalk en mierenzure kalk te samen tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat.

Eene nadere beschouwing van de eigenaardige wijze, waarop het calciumbutyraat vergist, leidde mij er toe, de onderstelling te opperen, dat het wellicht mogelijk zou zijn, de waterstof, noodig voor het vormen der methaanmoleculen uit de CH_2- en CH_3-groepen van het calciumbutyraat, op eene minder energievereischende wijze toe te voegen dan dit gedurende de gisting geschiedt.

De omzetting toch van eene α-CH_2-groep tot koolzuur en waterstof door ontleding van twee moleculen water, dus:

$$CH_2 + 2H_2O = CO_2 + 3H_2,$$

vordert eene groote hoeveelheid arbeid en zou geheel vervallen, indien bovengenoemde onderstelling juist bleek.

De waterstof voor het proces noodig, zou door middel van eene doelmatige waterstofgisting in de kultuur zelf kunnen ontstaan en zoodoende de beste gelegenheid aanbieden zich in status nascens met deze CH_2- en CH_3-groepen van de boterzure kalk te vereenigen tot methaan.

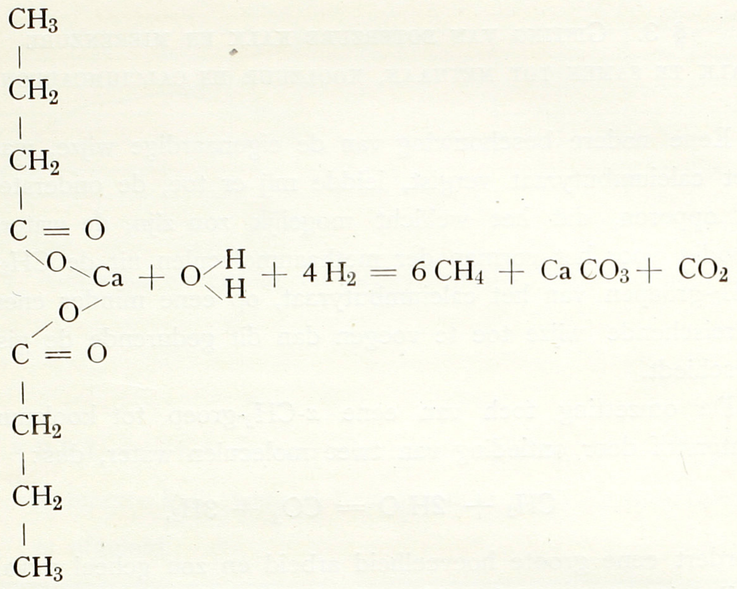
Om verschillende redenen koos ik de reeds door Pakes en Jollyman en Omelianski genoemde calciumformiaatgisting:

$$\left.\begin{matrix} H\,COO \\ H\,COO \end{matrix}\right\rangle Ca + H_2O = Ca\,CO_3 + 2H_2 + CO_2,$$

als bron voor de waterstofontwikkeling in de kultuur, waarin tevens calciumbutyraat vergist.

Deze calciumformiaatgisting heeft het voordeel, dat bij haar verloop geene voor de calciumbutyraatgisting storende produkten ontstaan in tegenstelling met de andere bekende waterstofgistingen b.v. bij de coli-gisting uit glucose, de boterzuurgisting uit amylum, enz.

In de onderstaande vergelijking is die hoeveelheid waterstof in reactie gebracht, welke noodig is om zonder oxydatie van de CH_2-groep, onder ontleding van water, uit de boterzure kalk slechts methaan te laten ontstaan.



Deze 4 moleculen waterstof kunnen geleverd worden door de ontleding van 2 moleculen calcumformiaat, zoodat de vergelijking

$$C_8 H_{14} O_4 Ca + 2 C_2 H_2 O_4 Ca + 3 H_2 O = 6 CH_4 + 3 Ca CO_3 + 3 CO_2$$

de gecombineerde gisting zou uitdrukken.

Aangezien het moleculair gewicht van calciumbutyraat 214 is en dat van calciumformiaat 130, zijn in de kultuurvloeistoffen, waarmede de volgende proeven zijn genomen, deze zouten in de verhouding 214 : 260 toegevoegd, in overeenstemming met de bovenstaande formule.

Het verschil tusschen deze gisting en die van het calciumbutyraat alleen springt duidelijk op den voorgrond. Bij de boterzure kalkgisting toch bevatten de gistingsgassen ± 30 % koolzuur en worden 5 moleculen methaan uit een mol. calciumbutyraat gevormd; daarentegen bedraagt de hoeveelheid koolzuur in het gas der gecombineerde gisting slechts 14 %, terwijl 6 moleculen methaan uit 1 molecuul calciumbutyraat en 2 moleculen calciumformiaat ontstaan.

Eene serie proefnemingen met het mengsel der zouten werd genomen teneinde de juistheid dezer formule aan te toonen; gewoonlijk gebruikte ik daarvoor 1.07 gram calc. but. en 1.30

gr. calc. form., opgelost in ± 75 c.c. duinwater en infecteerde deze oplossing met ± 25 c.c. rioolmodder. Hoewel na infectie der bovengenoemde oplossing met versche rioolmodder als entmateriaal eenige keeren eene kleine hoeveelheid waterstof bij den aanvang der gisting in de gassen aanwezig was, bestonden de overige ± 750 c.c. ontwikkeld gas geheel uit methaan en koolzuur.

Ik zal nu enkele der proeven nauwkeuriger beschrijven.

Den 7den Mei 1905 werden de eerste twee gecombineerde gistingen bij 35° ingezet, elk met 2,14 gram calciumbutyraat en 2,60 gram calciumformiaat, opgelost in 150 c.c. van eene oplossing 100 duinwater, 0,05 % $K_2 HPO_4$, 0,05 % NH_4Cl; aan deze vloeistoffen werd elk ± 25 c.c. rioolmodder als infectiemateriaal toegevoegd. De ontwikkelende gassen van de eerste kultuur werden boven kwik opgevangen; van de tweede boven 50 %-ige kali.

Kultuur 1.

11 Mei	123 c.c.	gas gev.	Samenst.	27 c.c.	H_2	8 c.c. CO_2,	95,5 c.c. CH_4, 2,5c.c N_2
14 Mei	126 c.c.	„	„	„	8 c.c.	H_2 9,5 c.c. CO_2,	108,5 c.c. CH_4.
22 Mei	139 c.c.	„	„	„		11 c.c. CO_2,	128 c.c. CH_4.
15 Juni	113 c.c.	„	„	„		16 c.c. CO_2,	99 c.c. CH_4.
1 Juli	65 c.c.	„	„	„		7 c.c. CO_2,	58 c.c. CH_4.

De gisting verliep daarna langzaam en werd den 12den Juli afgebroken; er waren sinds 1 Juli nog 47 c.c. gevormd, welke 5,6 c.c. CO_2 en 41,4 c.c. CH_4 bevatten.

Kultuur 2.

11 Mei	98 c.c.	gevormd.	Samenstelling	19 c.c.	H_2,	75,6 c.c. CH_4,	2,4 N_2
14 Mei	107 c.c.	„	„	8 c.c.	H_2,	99 c.c. CH_4.	
22 Mei	176 c.c.	„	„		H_2,	176 c.c. CH_4.	
15 Juni	141 c.c.	„	„		H_2,	141 c.c. CH_4.	
1 Juli	76 c.c.	„	„		H_2,	76 c.c, CH_4.	
12 Juli	43 c.c.	„	„		H_2,	43 c.c. CH_4.	

De gisting verliep na dien datum langzaam en werd afgebroken.

Uit deze onderzoekingen volgt, dat slechts bij den aanvang der gisting eene kleine hoeveelheid waterstof wordt ontwikkeld, terwijl

bij eene gisting van het calciumformiaat tot waterstof afzonderlijk bijna 900 c.c. waterstof zouden kunnen ontstaan.

De waterstof van de formiaatgisting kan dus, zoo was de conclusie, zonder eenigen twijfel in de kulturen waarin boterzure kalk vergist, tot verdwijnen worden gebracht.

Deze, met rioolmodder geïnfecteerde gistingen verliepen echter te langzaam; proefnemingen toch welke zich over een tijdsverloop van vele maanden uitstrekken, stellen niet alleen het geduld van den onderzoeker te zeer op den proef maar maken het tevens bijna onmogelijk de verschillende factoren, welke voor het proces van belang zijn waar te nemen. Daarom werd, evenals dit bij de butyraatgisting was geschied, wel eerst de kultuurvloeistof, bestaande uit eene oplossing van 2.14 % calc. butyraat, 2.60 % calc. form. in duinwater, met anorganische zouten, geinfecteerd met eene overvloedige hoeveelheid rioolmodder, maar dan daarna telkens na vermindering der gistingssnelheid voorzichtig van het bezinksel afgeschonken en door eene versche hoeveelheid vervangen. Op deze wijze was in November het bezinksel zooverre gereinigd, dat de zwarte kleur der rioolmodder voor eene lichtgrijze had plaats gemaakt en de vuile bruine bovenstaande vloeistof langzamerhand helder en kleurloos was geworden. De werkzame fermenten, welke ook hier slechts in het bezinksel aanwezig zijn, hadden zich gedurende dien tijd belangrijk vermeerderd, hetgeen bleek uit de stormachtige vergisting van eene nieuw opgegoten hoeveelheid kultuurvloeistof.

Met 25 c.c. van dit gezuiverde entmateriaal werden den tweeden November 1905 een viertal gistingen ingezet; van twee dezer werd het gas boven kwik, van de twee andere werd het boven kaliloog opgevangen. Ze bevatten elk 1,07 gram boterzure kalk, 1,30 gram mierenzure kalk, opgelost in 100 c.c. duinwater met anorganische zouten.

Om 10 uur v.m. ingezet, waren de kulturen om 11 uur reeds in stormachtige gisting, welke met zulk eene heftigheid verliep, dat de voortdurende stroom opborrelende gasbellen het bezinksel door de vloeistof bewoog; zelfs werden eenige c.c. kultuurvloeistof door de gasafleidbuis overgeperst naar de gasburetten.

Om 2 uur 's namiddags waren de gasburetten van 100 c.c. inhoud

reeds gevuld (ze bevatten resp. 98 en 102 c.c. gas); in de buretten met kaliloog waren resp. 51 c.c. en 63 c.c. gas opgevangen.

	Kultuur 1.	Kultuur 2.	Kultuur 3.	Kultuur 4.
2 uur n.m.	96 c.c. gas. Samenstelling: 43,5 c.c. CO_2 49,0 c.c. CH_4 3,5 c.c. N_2 geen H_2	102 c.c. gas. Samenstelling: 47,8 c.c. CO_2 50,2 c.c. CH_4 4,0 c.c. N_2 geen H_2	51 c.c. gas. Samenstelling: 48,5 c.c. CH_4 2,5 c.c. N_2 geen H_2	63 c.c. gas. Samenstelling: 51,5 c.c. CH_4 2,5 c.c. N_2 geen H_2
10 uur des avonds; de kwikburetten geheel gevuld.				
	van 76 c.c. gas. Samenstelling: 36,8 c.c. CO_2 39,2 c.c. CH_4	van 81 c.c. gas. Samenstelling: 38,5 c.c. CO_2 42,5 c.c. CH_4	van 52 c.c. gas. Samenstelling: 52 c.c. CH_4 De kultuurstof was tengevolge van het verstoppen der afvoerbuis gesprongen.	van 102 c.c. gas Samenstelling: 102 c.c. CH_4

3 November 9 uur v.m.		
Kultuur 1.	Kultuur 2.	Kultuur 4.
van 53 c.c. Samenstelling: 20.7 c.c. CO_2 32,3 c.c. CH_4	van 61 c.c. Samenstelling: 22,2 c.c. CO_2 38,8 c.c. CH_4	88 c.c. Samenstelling: 88 c.c. CH_4
De samenstelling van het gasmengsel veranderde in den loop der gisting weinig meer. Het koolzuurgehalte daalde nog tot 29 %. Zoo bevatte b.v. 93 c.c. gas uit de 1ste kultuur van 16 tot 21 November 27 c.c. CO_2 66 c.c. CH_4 en 68 c.c. van de 2e kultuur van 17 tot 21 Nov. ontwikkeld, 19,6 c.c. CO_2 en 48,4 c.c. CH_4.		Tot het einde der gisting werd slechts methaan opgevangen. In 't geheel zijn tot 24 November 689 c.c. methaan ontwikkeld; het proces was toen afgeafgeloopen.

De kulturen waren nu zoo goed als uitgegist.

In de plaats van de gesprongen kultuurkolf 3, waren den 5den November nog twee nieuwe gistingen ingezet waarvan de gassen boven kaliloog werden opgevangen; de eene bevatte 2.14

gram calciumbutyraat en 2.60 gram calciumformiaat, was den 30sten November uitgegist en had 1338 c.c. methaan gevormd; de tweede gisting met 1,07 gram calc. but. en 1,30 gram calc. formiaat eindigde den 26sten November na 672 c.c. methaan te hebben geleverd.

In geen der bovengenoemde kulturen was de hoeveelheid gevormde organische produkten voldoende om als zoodanig bepaald te worden; na droogdampen der uitgekookte kultuurvloeistoffen was het residu nog geen 90 milligrammen en bestond hoofdzakelijk uit anorganische zouten.

Uit de resultaten van deze proefnemingen blijkt, dat bij de gecombineerde gisting geen waterstof wordt gevormd, terwijl de hoeveelheid methaan door de kulturen ontwikkeld, nagenoeg overeenkomt met de theoretische.

Uit 1,07 gram calc. but. en 1,30 gram calc. formiaat ontstonden, onder den invloed der fermentwerkingen, respectievelijk 689 c.c., $\frac{1338}{2} = 674$ c.c. en 672 c.c. methaan, overeenkomend met gemiddeld 95,6 % van de theoretische hoeveelheid, welke 709 c.c. bedraagt bij 15° C. en 760 m.M. druk. Het koolzuurgehalte van de ontwijkende gassen beantwoordde echter in 't geheel niet aan de verwachting.

In de eerste hoeveelheden gas bedroeg de verhouding $\frac{CO_2}{CH_4}$ ongeveer $\frac{1}{1}$ waar deze volgens de formule $\frac{CO_2}{CH_4} = \frac{1}{7}$ behoorde te zijn. Later daalde het koolzuurpercentage tot ± 29 % en vertoonde alzoo veel overeenkomst met dat der gassen van de butyraatgisting.

Ik zal den lezer niet ophouden met de beschrijving der vele proeven, welke genomen werden teneinde een inzicht te verkrijgen in het werkelijke verloop van deze eigenaardige gisting met hare tegenstrijdige resultaten; waar toch aan den eene kant de juistheid van het verloop van het proces in overeenstemming met de bovenstaande formule als bewezen mocht worden beschouwd, voortvloeiend uit het feit, dat de toegevoegde organische zouten totaal vergistten tot bijna de theoretische hoeveelheid methaan, wees het enorme koolzuurgehalte der ontwikkelde

gassen er op, dat toch deze formule niet de juiste was.

Nieuwe onderzoekingen toonden nu aan, dat de reeds waargenomen feiten geheel juist waren, maar tevens bleek, dat de gecombineerde gisting twee perioden van maximale gasontwikkeling heeft; één aan 't begin en een tweede ongeveer halverwege het proces.

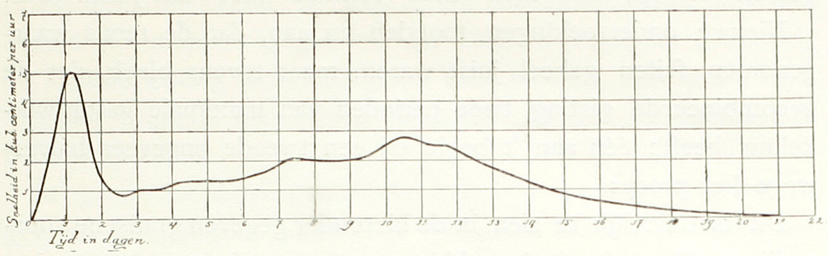
Dit is duidelijk te zien in de hieronder gegeven grafische voorstelling. Deze heeft betrekking op eene gisting waarvan het gas boven kaliloog werd opgevangen, zoodat het koolzuur werd geabsorbeerd.

Op de abcis is het aantal c.c. methaan, dat per uur wordt ontwikkeld, uitgezet; op de ordinaat is de tijd in dagen aangegeven. De graphische lijn geeft alzoo in ieder punt de snelheid der methaangisting aan, d.w.z. het aantal c.c. methaan, dat per uur door de kultuur wordt geleverd.

Vooral de eerste plotselinge stijging dezer lijn duidt op de aanwezigheid van een factor, welke tot eene zeer krachtige gasproduktie aanleiding heeft gegeven, hetgeen nog frappanter blijkt, indien men er bij in aanmerking neemt, dat de gassen bij het begin van het proces gevormd voor ± 50 % uit koolzuur bestaan, volgende uit de gegeven analyses van het boven kwik opgevangen gas, zoodat ongeveer het dubbele van de hoeveelheid gas, door de kromme voorgesteld, in den aanvang werd ontwikkeld.

De tweede periode der gisting verloopt minder stormachtig. Het beeld der kromme is niet steeds gelijk aan het beschrevene; somtijds strekt zich de eerste stijging over een grootere periode uit en gaat zij eenigszins geleidelijker in de tweede stijging over; bij andere proeven waren echter de beide perioden nog iets scherper gescheiden.

De grafische lijn toont echter met zekerheid aan, dat de gisting met een ongelijkmatige snelheid verloopt, waardoor ze verschilt van die van het calciumbutyraat alleen, of in 't algemeen van de gisting van ééne verbinding. Blijkbaar zijn hier twee gistingsprocessen in 't spel, die over elkander heengrijpen; mogelijk vergistte het calciumformiaat met groote snelheid en was zoodoende de oorzaak der eerste stijging, maar dan was ook waterstof te verwachten in de gassen der eerste periode,



2. Grafische voorstelling van het verloop der Formiaat-Butyraatgisting.

TABEL van het verloop der methaangisting van 1,07 Gram boterzure kalk en 1,30 Gram mierenzure kalk, waaruit nevengaande grafische voorstelling is afgeleid.

			Totaal aantal c.c.	Aantal c.c. per uur.	Aantal uren.
November	17	9 uur v m.	0	0	0
		6 uur n.m.	6	0,7	9
	18	9 uur	45	2,6	24
		4 uur	80	5	31
	19	9 —	130	3	48
	20	9 —	150	0,8	72
		6 —	159	1	81
	21	0 —	175	1	96
		6 —	186	1,2	105
	22	9 —	206	1,3	120
	23	9 —	239	1,3	144
		6 —	253	1,5	153
	24	9 —	278	1,7	168
		6 —	296	2	177
	25	9 —	326	2	192
	26	9 —	375	2	216
	27	9 —	427	2.17	240
		6 —	451	2,7	249
	28	9 —	490	2,6	264
		6 —	512	2,5	273
	29	9 —	536	2,5	288
	30	9 —	587	2	312
December	1	9 —	623	1,5	336
	2	6 —	647	1	360
	3	9 —	663	0,7	384
	4	9 —	676	0,5	408
	3	9 —	685	0,3	432
	6	9 —	689	0,17	456
	7	9 —	690	0,04	480
	8	9 —	690	0,0	504

hetgeen echter de nauwkeurigste analyses aantoonden, dat niet het geval was.

Tevens bleek, dat na de eerste periode de toegevoegde 1,30 gram calciumformiaat meestal geheel uit de oplossing was verdwenen en daarmede op eene raadselachtige wijze 444 c.c. waterstof, welke daaruit konden ontstaan.

Allereerst werd nu nagegaan, welken invloed andere ververhoudingen in het mengsel van calciumformiaat en calciumbutyraat op de samenstelling van het gasmengsel en op den vorm der grafische lijn uitoefenden. Een hooger calc. formiaatgehalte zou naar alle waarschijnlijkheid eene hoeveelheid vrije waterstof in het gasmengsel doen ontstaan en tevens zou de eerste stijging in de graphische lijn zich uitbreiden; door een lager calc.formiaat-gehalte zou geen waterstof in het gasmengsel komen en de eerste bocht geringer worden.

Door eene gisting met calciumformiaat alleen kon de snelheid der waterstofontwikkeling bepaald worden, waaruit hare invloed op de eerste stijging waarschijnlijk mede zou volgen.

Den 26sten Februari om 5 uur n.m. werd de volgende serie gistingen ingezet en de gassen boven kaliloog opgevangen.

1e Gisting met 1,07 gram boterzure kalk, 1,30 gram mierenzure kalk.
2e „ „ 0,535 „ „ „ , 1,30 „ „ „
3e „ „ 1,07 „ „ „ , 0,65 „ „ „
4e „ „ 1,30 „ „ „

		Gisting 1.	Gisting 2.	Gisting 3.	Gisting 4.
26 Februari	5 uur n.m.	0 c.c.	0 c.c.	0 c.c.	0 c.c.
	10 uur n.m.	18	18,5	13,5	15
27	„ 9 uur v.m.	62,5	56,5	49	53
		Analyse	Analyse	Analyse	Analyse
		59,5 c.c. CH_4	58 c.c. CH_4	46 c.c. CH_4	51,5 c.c. CH_4
		3 c.c. N_2	3,5 c.c. N_2	3 c.c. N_2	2 c.c. N_2
	5 uur n.m.	41,5 c.c.	38 c.c.	35,5 c.c.	37,7 c c.
		Analyse	Analyse	Analyse	Analyse
		41,5 c.c. CH_4	38 c.c. CH_4	35,5 c.c CH_4	37,7 c.c. CH_4

De eerste drie gistingen niet voortgezet. De vierde gaf:

1 Maart 9 uur v.m. . . . . 18 c.c.
5 uur n.m. . . . . 21 c.c.
2 „ 9 uur v.m. . . . . 25 c.c.

		De vierde gaf:
2 Maart	5 uur n.m.	25 c.c.
3 „	9 uur v.m.	25,4 c.c.
	5 uur n.m.	25.4 c.c.

Analyse

25.4 c.c. CH_4

De gistingen der kulturen 1, 2 en 3 werden gestopt, aangezien de merkwaardige resultaten, verkregen met kultuur 4, hunne voortzetting onnoodig maakte. De 4e gisting was den 3den Maart afgeloopen; de kultuurvloeistof werd uitgekookt, gefiltreerd en drooggedampt, ze bevatte slechts weinige milligrammen droge stof, in hoofdzaak uit anorganische zouten bestaande.

Men ziet hieruit dat de gisting, welke naast de butyraatgisting in de kulturen verliep, een nieuw en onverwacht proces is, n.l. de methaangisting uit calciumformiaat, terwijl tot nu toe alleen eene formiaatwaterstofgisting bekend was.

Zoo hadden dus deze proefnemingen, die begonnen waren met het doel het verloop der butyraatgisting nader te bestudeeren ten opzichte van de vorming van het methaan uit de CH_2-groepen, een geheel ander resultaat dan verwacht werd.

Het formiaat is dus gebleken als waterstofbron ongeschikt te zijn, zoodat deze proeven op een andere wijze herhaald moesten worden, hetgeen in hoofdstuk II beschreven wordt.

Eerst wil ik nu echter de formiaatmethaangisting en nog een paar andere methaangistingen nader bespreken.

§ 4. Gisting van mierenzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat.

De in het voorgaande hoofdstuk beschreven ontdekking eener nieuwe gisting van mierenzure kalk, waarbij methaan en koolzuur als gassen vrijkomen, gaf aanleiding om dit proces nader uit te werken.

De onderzoekingen vingen den eersten Maart 1906 aan met een drietal kulturen, elk voorzien van 2,60 gram calciumformiaat, opgelost in 100 duinwater, 0,05 NH_4Cl en 0,05 K_2HPO_4 geinfecteerd met $\pm$ 25 c.c. sneeuwwit entmateriaal en geplaatst bij 35° C.

De gassen der 1e en 2e kultuur, welke boven kwik waren opgevangen, hadden gedurende het begin der gisting een koolzuurgehalte van $\pm$ 40 %.

Samenstelling der eerste 100 c.c. gas, welke den 1sten Maart van 9 uur v.m. tot 3 uur n.m. waren ontwikkeld.

1e kultuur. 37.8 c.c. CO_2, 57,8 c.c. CH_4, 4.4 c.c. N_2,
2e kultuur. 40.5 c.c. CO_2, 55.8 c.c. CH_4, 3.7 c.c. N_2.

Gedurende het verloop van het proces, steeg het koolzuurgehalte in het ontwikkelde gasmengsel geleidelijk tot $\pm$ 50 %.

Van den 5den tot den 7den Maart leverden beide kulturen slechts nog enkele c.c. gas en waren dus blijkbaar uitgegist.

De derde kultuur, waarvan de gassen boven 50 % ige kaliloog waren opgevangen, ontwikkelde tot den 7den Maart 228.5 c.c. methaan en 2.8 c.c. stikstof.

De kultuurvloeistof van de eerste gisting bevatte na koken en filtreeren, waarbij zich slechts calciumcarbonaat afscheidde nagenoeg geen organisch materiaal meer. In het distillaat van de droge stof der kultuurvloeistof, aangezuurd met een druppel zwavelzuur, kon met de ceronitraatreactie [1]) mikrochemisch geen mierenzuur worden aangetoond.

Aan kultuur 2 werden opnieuw 2,60 gram calciumformiaat toegevoegd; de vloeistof mocht nu als verzadigd met koolzuur worden beschouwd, zoodat de totale hoeveelheid koolzuur, welke gedurende het proces werd gevormd, in gasvorm uit de kultuur zou ontwijken. Oogenblikkelijk na het ontvangen der nieuwe hoeveelheid mierenzure kalk ving de gisting weder aan, welke na een kwartier zoo hevig was, dat een groot deel van het bezinksel door de kultuurvloeistof verspreid werd.

Het ontwikkelde gas bestond gedurende de geheele gisting uit 50 % methaan en 50 % koolzuur.

Aan de derde kultuur werden eveneens opnieuw 2,60 gram calciumformiaat toegevoegd; van de ontwikkelde gassen werd, geheel op dezelfde wijze als dit bij de butyraatgisting geschiedde,

[1]) De vloeistof op het objectglas wordt juist geneutralyseerd met Na_2CO_3, ceronitraat toegevoegd, dan ziet men na indampen de karakteristieke pentagoondode caëders ontstaan onder het mikroskoop.

Behrens.

het koolzuurgehalte gravimetrisch bepaald en ook weder de hoeveelheid methaan gemeten, volgens de verdringingsmethode.

Gewicht koolzuurapparaatje na de gisting 60,8243 gr.
„ „ voor „ „ 60,3792 gr.
Gewicht koolzuur 0,4451 gr.

Gedurende dit proces waren 225 c.c. methaan ontwikkeld.

Het verloop van deze gisting is door nevengaande kromme voorgesteld, die op een vierde, met 1.30 gram uitgevoerde gisting betrekking heeft.

Uit deze onderzoekingen blijkt, dat bij de vergisting van calciumformiaat onder genoemde omstandigheden, zich een gasmengsel ontwikkelt, bestaande uit gelijke deelen methaan en koolzuur en dat gemiddeld uit 2,60 gram formiaat, 226 c.c. methaan en 0,4451 gram koolzuur ontstaan.

Bovendien blijkt, dat bij deze gisting geen noemenswaardige hoeveelheden bijprodukten gevormd worden.

Bij aanwezigheid van eene anorganische stikstofbron geschiedt dus de afbreking van mierenzure kalk nagenoeg kwantitatief tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat. Dit gistingsproces kan dus worden voorgesteld door de volgende formule.

$$2\ (H\,COO_2)\ Ca = CH_4 + CO_2 + 2\ Ca\ CO_3.$$

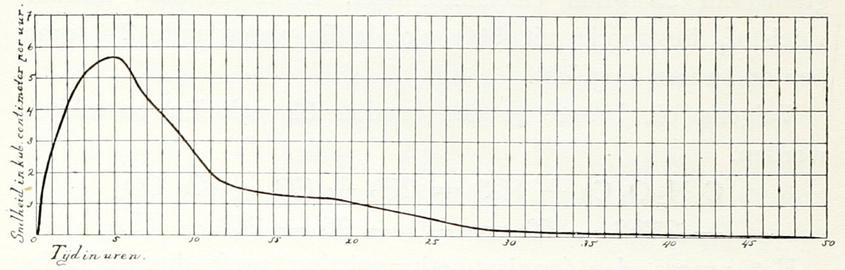
Het is een exothermisch proces, dat volgens deze vergelijking 136,3 caloriën kan opleveren.

$$-\ 2 \times 257.8 = -\ 18{,}9 - 90 - 2 \times 269 + 136{,}3.$$

Theoretisch zouden uit 2.60 gram calc.form. 235 c.c. methaan kunnen ontstaan: $\frac{0{,}16}{0{,}719} \times 1000 \times \frac{288}{273} = 235$ en 0,44 gram koolzuur.

Vergelijken we de formiaatwaterstofgisting, door Pakes en Jollyman en Omelianski beschreven, met de bovenvermelde gisting, dan springt het groote verschil tusschen de twee processen oogenblikkelijk in 't oog. Het eerste toch verloopt zeer langzaam en onvolledig door de werking van facultatief-anaërobe bacteriën, die slechts bij aanwezigheid van pepton als stikstofbron het calciumformiaat ontleden.

Van den 2den Februari 1902 tot den 6den October, dus in 8



3. Grafische voorstelling van het verloop der Formiaatgisting.

TABEL van het verloop der methaangisting van 1.30 gram mierenzure kalk, waaruit nevengaande grafische voorstelling is afgeleid.

		Totaal aantal c c.	Aantal c.c. per uur.	Aantal uren.
1906. Maart 19	9 uur v.m.	0	0	0
	10 —	4	4	1
	11 —	71	7	2
	12 —	20,5	9,5	3
	2 —	42	11	5
	3 —	53	11,2	6
	4 —	62,7	9,5	7
	5 —	70,9	8,2	8
	7 —	83,9	6,5	10
	10 —	94,3	3,5	13
20	9 —	107,7	1,2	24
	5 —	111,8	0,5	32
	10 —	112,9	0,2	37
21	9 —	113,4	0,05	48
	5 —	113,6	—	56
	10 —	113,6	—	61

maanden tijd, vergistten volgens OMELIANSKI ± 60 %, alzoo 15 gram van 25 gram calciumformiaat, welke in eene kultuurvloeistof, bestaande uit 500 c.c. leidingwater met 2½ gram pepton, waren opgelost.

Volgens dit laatste proces zouden 38 caloriën ontwikkeld worden.

$$C_2H_2O_4Ca + H_2O = 2H_2 + CO_2 + CaCO_3$$
$$-257{,}8 - 69 = -0 - 95 - 269 + 38.$$

Het proces der formiaatmethaangisting geeft dus aanleiding tot snellere en totale afbreking van de mierenzure zouten. Het heeft plaats onder anaërobe omstandigheden, in tegenwoordigheid van eene anorganische stikstofbron.

§ 5. GISTING VAN HOOGERE VETZURE ZOUTEN TOT METHAAN, KOOLZUUR EN CALCIUMCARBONAAT.

Uit de vorige paragrafen is gebleken, dat calciumformiaat, acetaat en butyraat door mikroganismen onder anaërobe omstandigheden tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat kunnen vergisten en het ligt voor de hand de vraag te stellen of zouten van andere vetzuren tot deze wijze van ontleding aanleiding zullen geven. Allereerst werden de zouten van propionzuur en valeriaanzuur op hunne vergistbaarheid onderzocht.

Propionzuur wordt bij tal van processen in geringe hoeveelheden gevormd en komt als splitsingsprodukt van eiwitten algemeen verspreid in de natuur voor. Het is dus te verwachten dat er mikroben zullen zijn welke het kunnen vergisten. Bij de vele pogingen echter om calciumpropionaat in gisting te brengen, werd geen resultaat verkregen. Noch met groote hoeveelheden rioolmodder, noch met de meest actieve kulturen van butyraatgistingen geinfecteerd, werden oplossingen van 1 % à 2 % propionaat in 100 duinwater, 0,05 K_2HPO_4, 0,05 NH_4Cl onder gasontwikkeling ontleed. Evenmin slaagden de proeven met calciumvaleraat.

Deze feiten leidden mij er toe, de onderstelling te opperen, dat de vergistbaarheid der vetzure zouten in direct verband staat met den bouw van het molecuul.

Nemen we de bovenbeschreven wijze, waarop het calciumbutyraat vergist als juist aan, zoodat de volgende formule het verloop van het gistingsproces voorstelt:

$$C_8H_{14}O_4Ca + 3\,H_2O = 5\,CH_4 + 2\,CO_2 + CaCO_3,$$

en onderstellen we, dat de ontleding van calciumpropionaat en calciumvaleraat op analoge wijze zou kunnen plaats hebben, welke onderstelling, de overeenkomst in bouw tusschen de drie homologe zouten in aanmerking genomen, niet gewaagd is, dan blijkt, dat eene zuivere methaankoolzuurgisting uit calciumpropionaat, noch uit calciumvaleraat mogelijk is.

De volgende vergelijkingen, welke op deze mogelijke ontleding van calciumpropionaat betrekking hebben, bewijzen dit.

I. $C_6H_{10}O_4Ca + H_2O = 2\,C_2H_6 + CO_2 + CaCO_3$.

II. $C_6H_{10}O_4Ca + 3\,H_2O = 3\,CH_4 + H_2 + 2\,CO_2 + CaCO_3$.

De hydrolytische splitsing door één molecuul water (vergel. I.) zou aethaan, koolzuur en calciumcarbonaat doen ontstaan, aangezien er te weinig waterstof voorhanden is voor de vorming van methaan. Door de ontleding van één molecuul calciumpropionaat met drie moleculen water zou daarentegen te veel waterstof gevormd worden. Eene geheel overeenkomstige redeneering is op de mogelijke calciumvaleraat-ontleding van toepassing; ook hier is of te veel, of te weinig waterstof beschikbaar om eene enkele methaan- en koolzuurgisting te geven.

Uit deze beschouwingen volgt, dat propionaat en valeraat geen gisting tot enkel methaan en koolzuur kunnen opleveren, echter geven ze geen verklaring omtrent het feit, dat genoemde verbindingen onder deze anaërobe condities geheel onaantastbaar zijn. Het heeft echter allen schijn, dat vetzure zouten slechts onder methaanontwikkeling kunnen worden ontleed; nemen we dit als waar aan, dan zouden op grond der beschouwing omtrent de formules, de zuren met een even aantal koolstofatomen kunnen vergisten, die met een oneven aantal echter niet.

De proefnemingen, welke zijn verricht omtrent de vergistbaarheid van andere vetzure zouten bewezen, dat de gemaakte onderstelling juist is. Kultuurvloeistoffen toch van de volgende samenstelling: 100 duinwater, 0,05 K_2HPO_4, 0,05 NH_4Cl. en 1 % à 2 % calc. capronaat, caprylaat of caprinaat, geinfecteerd met rioolmodder

of zuivere fermenten eener butyraatkultuur, vergistten tot slechts methaan, koolzuur en calciumcarbonaat.

Het gas uit de capronaatkulturen bestond uit ± 26 % koolzuur en ± 74 % methaan, zoodat de samenstelling vrijwel overeenstemt met de theoretische, berekend uit de hieronder gegeven formule volgens welke het gas 27 % koolzuur en 73 % methaan zou moeten bevatten.

Het gasmengsel uit de caprylaatgistingen was eveneens samengesteld uit ± 26 % koolzuur en 74 % methaan en verschilt dus ook niet noemenswaard van dat, hetwelk zou ontwikkeld worden, indien het proces volgens onderstaande formule verliep, waarbij theoretisch eveneens 27 % koolzuur en 73 % methaan daarin aanwezig zouden zijn.

Het calciumcaprinaat vergistte slechts zeer langzaam onder ontwikkeling van methaan en koolzuur in de verhouding 3 : 1, hetgeen eveneens met de verwachting overeen kwam; volgens onderstaande formule toch zou de verhouding $\frac{CH_4}{CO_2} = \frac{14}{5}$ zijn.

De vergelijkingen voor deze gistingen zijn de volgende:

Capronaatgisting:

$$C_{12}\ H_{22}\ O_4\ Ca + 5\ H_2O = 8\ CH_4 + 3\ CO_2 + CaCO_3.$$

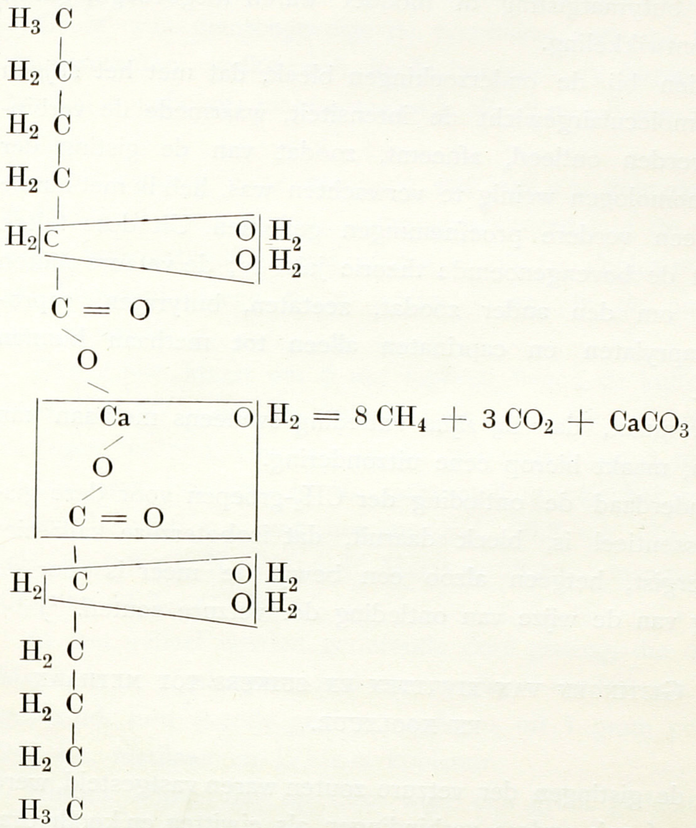
Caprylaatgisting:

$$C_{16}\ H_{30}\ O_4\ Ca + 7\ H_2O = 11\ CH_4 + 4\ CO_2 + CaCO_3.$$

Caprinaatgisting:

$$C_{20}\ H_{38}\ O_4\ Ca + 9\ H_2O = 14\ CH_4 + 5\ CO_2 + CaCO_3.$$

Door de volgende struktuur-vergelijking zou b.v. de gisting van calciumcapronaat kunnen worden voorgesteld.



Voor de ontledingen van capryl- en caprinezure kalk is het noodig, dat ook nog respectievelijk één en twee β-CH_2-groepen zullen worden ontleed, teneinde de benoodigde hoeveelheid waterstof te leveren, om de overige CH_2- en CH_3-groepen in methaan te veranderen. De vergelijkingen voor deze gistingen met de constitutieformules der zouten geschreven, zijn analoog aan die van de capronaatgisting.

Poogt men daarentegen eene dergelijke formule op te stellen, waarbij heptyl- of nonylzure kalk zouden vergisten onder methaan- en koolzuurontwikkeling, dan blijkt, dat dit evenals bij de propionzure en de valeriaanzure kalk niet mogelijk is.

Proefnemingen, met deze twee verbindingen genomen, bewezen

dan ook, dat ze niet in gisting kunnen geraken. Kulturen toch met heptyl- en nonylzure kalk, waaraan de fermenten eener krachtige butyraatgisting of modder waren toegevoegd, gaven geen gasontwikkeling.

Aangezien bij de onderzoekingen bleek, dat met het stijgen van het moleculairgewicht de intensiteit, waarmede de verbindingen werden ontleed, afneemt, zoodat van de gisting der hoogere homologen weinig te verwachten was, heb ik met hunne zouten geen verdere proefnemingen genomen. Uit deze feiten volgt, dat de bovengenoemde theorie juist is; de vetzure zouten vergisten om den ander zoodat, acetaten, butyraten, capronaten, caprylaten en caprinaten alleen tot methaan kunnen vergisten.

Het formiaat, dat bij zijne ontleding eveneens methaan kan opleveren, maakt hierop eene uitzondering.

Dat inderdaad de ontleding der CH_2-groepen voor deze gistingen essentieel is, bleek daaruit, dat isoboterzure kalk niet wordt vergist, hetgeen alzoo een bewijs te meer is voor de opvatting van de wijze van ontleding der vetzure zouten. [1])

§ 6. Gistingen van eiwitten en suikers tot methaan en koolzuur.

Nadat de gistingen der vetzure zouten waren vastgesteld, werd beproefd, of ook andere verbindingen als eiwitten en koolhydraten tot methaangisting aanleiding kunnen geven.

Bij de gewone eiwitrotting, welke bijvoorbeeld ontstaat door kultiveeren onder anaërobe omstandigheden van albumine in duinwater, $^1/_{20}$ % K_2HPO_4, na infectie met *weinig* rioolmodder, grachtmodder, of tuingrond, worden de eiwitten afgebroken tot samengestelde aliphatische en aromatische verbindingen onder ontwikkeling van veel koolzuur en betrekkelijk weinig waterstof. Nimmer ontwikkelt zich methaan bij deze ontledingsprocessen.

Koolhydraten worden onder anaërobe condities door de Aërobactergroep, de boterzuurfermenten, de melkzuurfermenten en nog andere bacteriën vergist, waarbij in hoofdzaak melkzuur en boterzuur onder ontwikkeling van waterstof en koolzuur ontstaan.

[1]) De voor dit onderzoek gebruikte kalkzouten van de volgende zuren; capronzuur, heptylzuur, caprylzuur, nonylzuur en caprinezuur zijn op bepaald verlangen van het Mikrobiologisch Laboratorium vervaardigd aan de chemische fabriek van E. Claerck te Darmstadt.

Groot was dientengevolge de verrassing, toen mij bleek, dat de fermenten, welke zich in de butyraat- en formiaatkulturen hadden opgehoopt, uit eiwitten en koolhydraten eveneens methaan vormen.

Zoo vergistte eene oplossing van 100 c.c. duinwater, $^1/_{20}$ % K_2HPO_4, 1 gram pepton Witte, geinfecteerd met de fermenten eener butyraatkultuur en geplaatst bij 35° C., slechts tot methaan en koolzuur. Geen spoor waterstof was in de ontwikkelde gassen aanwezig.

Den 13den Maart om 6 uur ingezet, begon de kultuur oogenblikkelijk te gisten en leverde een gas, dat uit koolzuur en methaan bestond, ongeveer in de verhouding van 3 tot 4.

Zoo was bijvoorbeeld de samenstelling van het gas op 14 Maart in 91,6 c.c. van het mengsel, 29,3 c.c. CO_2, 33,5 c.c. CH_4 en 3,8 c.c. N_2, en op 15 Maart in 73,2 c.c. mengsel 31,9 c.c. CO_2 en 41,3 c.c. CH_4.

In het geheel werden gedurende deze gisting, die den 17den Maart was afgeloopen, 256 c.c. methaan en 186 c.c. koolzuur gevormd. Een tweede gisting, eveneens uit 1 gram pepton, gaf 243 c.c. methaan en 171 c.c. koolzuur.

Hieruit blijkt, dat op deze wijze een groot gedeelte van de koolstof uit het eiwit en wel ongeveer de helft in den vorm van methaan en koolzuur ontwijkt; immers het gewicht aan koolstof in de 425 c.c. van het gasmengsel, dat ontstaat, bedraagt ongeveer 225 mgr., terwijl in 1 gram pepton $\pm$ 500 mgr. koolstof aanwezig zijn.

Zeer frappant was ook het feit, dat bij deze gisting aanvankelijk geen rotting optrad; de gassen waren vrijwel reukeloos. Eerst later, nadat de kultuur een paar malen van versche peptonoplossing was voorzien, trad een hevige rottingslucht op.

Geheel overeenkomstige resultaten gaven de proeven met albumine; alleen begon de gisting pas na een tijdsverloop van $\pm$ 36 uur, hetgeen daaraan toe te schrijven is, dat de albumine, voor ze verder afgebroken wordt, eerst eene hydrolytische splitsing

tot peptonen moet ondergaan. Waarschijnlijk wordt deze tryptische werking uitgeoefend door andere bacteriën dan die, welke de hoofdgisting bewerkstelligen. Deze veronderstelling is gegrond op de waarneming, dat de albuminegisting in tegenstelling met de zooeven beschreven peptongisting, in korten tijd geheel troebel is van allerlei bacteriën.

Uit 1 gram albumine ontstonden bij twee onderzoekingen respectievelijk:

1e. 285 c.c. methaan en 213 c.c. koolzuur.

2e. 273 c.c. methaan en 202 c.c. koolzuur.

We zien dus, dat de pepton- en de albuminegisting zeer veel overeenkomst vertoonen; beide geven ongeveer dezelfde hoeveelheid van een gasmengsel, dat methaan en koolzuur in eene verhouding 4 : 3 bevat. Ook bij de albuminegisting trad na eenigen tijd het anaërobe eiwitrottingsproces op den voorgrond, hetgeen echter eerder plaats had dan bij de peptongisting.

Dientengevolge worden de eigenlijke gistingsbacteriën spoedig overwoekerd door de echte rottingsbacteriën, zooals bijvoorbeeld Proteobakter septicum, en is de kultuur voor de methaangisting onbruikbaar geworden.

Om dus eiwitten in methaangisting te brengen moet men als infectiemateriaal het bezinksel uit een krachtige butyraatkultuur nemen. Met riool- of grachtmodder kan men echter ook direct eene eiwit- of peptonmethaangisting te voorschijn roepen door met eene zeer groote hoeveelheid te infecteeren.

Terwijl een kleine hoeveelheid rioolmodder tot waterstofontwikkeling aanleiding geeft, kan een groote hoeveelheid modder waarin vele butyraatfermenten aanwezig zijn, methaanontwikkeling geven.

De volgende proefneming deed dit blijken.

In een gistingskolfje van 100 c.c. inhoud werd aan 50 c.c. duinwater 50 c.c. rioolmodder en een gram pepton toegevoegd.

De hoeveelheid methaan, door deze kultuur ontwikkeld, bedroeg 380 c.c., terwijl er geen waterstof gevormd was. Wel geeft rioolmodder voor zich reeds een vrij aanzienlijke hoeveelheid methaan en koolzuur, afhankelijk van de toevallige samenstelling der modder; deze bedraagt echter nooit meer dan het dubbele

van haar volume, zoodat in dit geval hoogstens 100 c.c. methaan op rekening van de verbindingen uit de modder gesteld moeten worden en er dus 280 c.c. op zijn minst uit het eiwit zijn ontstaan. Ook in deze gassen was geen waterstof aanwezig, wat een zeer opmerkelijk feit genoemd mag worden. Bij de gewone eiwitrotting toch ontstaat een gistingsgas, dat naast koolzuur $\pm$ 15 % waterstof bevat; dit proces nu moeten we aannemen ook in deze kultuur plaats gehad te hebben, getuige de sterke groei der rottingsorganismen en de ontwikkeling van stinkende produkten, en toch kon geen spoor waterstof aangetoond worden.

Of deze rotting onder waterstofproduktie was nog te gering om te kunnen worden geconstateerd, óf de ontstane waterstof was in de kultuur verdwenen.

Deze laatste mogelijkheid verkreeg op grond van later geconstateerde feiten grootere waarschijnlijkheid.

Nog eigenaardiger is zeker de methaangisting uit glucose en melksuiker. Zooals reeds boven gezegd, breken tal van bacteriëngroepen deze verbindingen onder koolzuur- en waterstofproduktie af tot melkzuur, boterzuur en andere verbindingen; de fermenten der butyraatkulturen echter produceeren uit deze koolhydraten een gasmengsel, dat in hoofdzaak uit methaan en koolzuur bestaat, doch ook steeds een weinig waterstof bevat.

Van 23 Maart tot 9 April gaven twee onderzoekingen elk met 1 gram glucose en twee elk met 1 gram melksuiker de volgende hoeveelheden methaan en waterstof.

Kulturen welke glucose bevatten.

1e	215 c.c. CH_4	45 c.c. H_2.
2e	231 c.c. CH_4	32 c.c. H_2.

Kulturen welke melksuiker bevatten.

1e	228 c.c. CH_4	38 c.c. H_2.
2e	241 c.c. CH_4	59 c.c. H_2.

Ook in deze gistingen waren de butyraatfermenten niet de eenige werkzame bacteriën, aangezien een belangrijke granulobaktergroei in de vloeistoffen geconstateerd werd, waaraan de waterstofvorming is toe te schrijven. De hoeveelheid waterstof, welke bij deze gistingen werd gevormd, is opvallend gering.

Hoewel het zeer goed mogelijk is, dat de bacteriën, welke in kulturen met vetzure zouten, de reeds genoemde processen doen verloopen, ook direct peptonen en suikers tot methaan en koolzuur kunnen omzetten, zoodat dus de rotting en de granulobaktergisting in de laatst beschreven proeven slechts als nevenprocessen zouden zijn te beschouwen, kan over deze kwestie slechts door proefnemingen met de reinkulturen van de betrokken mikroben worden beslist. Hierbij zou kunnen blijken, dat de butyraatvergistende mikroben niet in staat zijn pepton en suikers te vergisten, zoodat deze processen slechts mogelijk worden door de medewerking van andere organismen als rottingsbacteriën en granulobakters, welke in eerste instantie eene gedeeltelijke afbreking tot stand brengen, waarna de genoemde mikroben de ontstane lichamen verder tot methaan en koolzuur vergisten. Is deze laatste onderstelling juist, dan zou de hoeveelheid ontwikkelde waterstof overeen moeten komen met die, welke uit een glucose-boterzuurgisting wordt gevormd en ongeveer 200 c.c. meer bedragen dan de gevonden hoeveelheid. In dit geval zou er dus weer waterstof in de kultuur moeten zijn verdwenen.

§ 7. Over de mikroben, die de methaangisting veroorzaken.

De mikroben, die de vetzure calciumzouten doen vergisten, bevinden zich, zooals reeds werd opgemerkt, uitsluitend in het bezinksel en niet in de daarbovenstaande heldere vloeistof. Op dit bezinksel werd dus bij het onderzoek alleen de aandacht gevestigd.

Alvorens tot de beschrijving der organismen over te gaan, zal ik eerst een paar algemeene opmerkingen maken over de wijze, waarop men ze het best in kultuur houdt en over hetgeen er verder bij het verloop der gisting is waar te nemen.

De modder, die als infectiemateriaal diende, is, zooals vanzelf spreekt, een gecompliceerd mengsel van verschillende verbindingen waarin, naast de steeds voorkomende humusachtige lichamen en cellulose, allerlei toevallige verontreinigingen, als andere koolhydraten en ook eiwitten, kunnen voorkomen. Deze stoffen

echter worden na betrekkelijk korten tijd ontleed door de werking van anaërobe en facultatief-anaërobe bacteriën, in grooten getale in de modder aanwezig, en hunne ontledingsprodukten worden door het ververschen der kultuurvloeistof verwijderd, zoodat ten slotte een bijna geheel gemineraliseerd bezinksel achterblijft.

Dit bezinksel, dat in den beginne zwart gekleurd is, ziet men dan ook, naarmate de gisting voortschrijdt, langzamerhand een lichtere kleur aannemen, waarschijnlijk doordat de humuskleurstoffen in deze kulturen worden ontleed. Bovendien draagt het voortdurend zich vormende calciumcarbonaat, dat ten slotte de hoofdmassa van 't bezinksel uitmaakt, er toe bij het een zuiver witte kleur te geven.

De vloeistof boven het bezinksel, aanvankelijk bruin en troebel, wordt langzamerhand helder en kleurloos, behoudt echter steeds een onaangenamen reuk, in hoofdzaak teweeggebracht door zwavelwaterstof, die altijd in geringe mate, tengevolge van sulfaatreductie, ontstaat.

In 't algemeen verkrijgt men door overenting met minimale hoeveelheden uit eene bacteriën-ruwkultuur in versche voedingsvloeistof eene ophooping der mikroben, voor welke de gekozen omstandigheden het gunstigst zijn. Een sneller verloop der omzettingen gaat hiermede gepaard.

Pogingen, om op deze wijze de hier ter sprake komende gistingsbacteriën snel op den voorgrond te brengen, hadden geen gunstig gevolg. Overentingen toch met geringe hoeveelheden van het bezinksel kwamen in het geheel niet of slechts zeer langzaam op gang evenals ruwkulturen, die met weinig rioolmodder werden aangesteld, waaruit besloten moet worden, dat de fermenten zich, onder deze omstandigheden, slechts zeer langzaam vermeerderen. Gelukt het overenten, dan verkrijgt men wel is waar zwakke gistingen, maar de bacteriën bevinden zich na verloop van tijd in zeer reinen toestand in een bezinksel van zuiver krijt, zoodat ze in deze kulturen bijzonder goed te bestudeeren zijn. De mogelijkheid, dat het deelingsproces slechts in een medium als modder of het bezinksel snel zou verloopen, was niet uitgesloten. Het bleek echter, dat overentingen met kleine hoeveelheden in kultuurkolven, welke behalve de steriele voedings-

vloeistof, ook een dikke laag gesteriliseerde modder of bezinksel bevatten, even slecht op gang kwamen. Teneinde eenigszins belangrijke gistingen te verkrijgen, waren niet minder dan 5 c.c. infectiemateriaal toereikend. Zeer krachtige gistingen, waarvan men met vrucht het verloop kan bestudeeren, kan men zich verschaffen met ± 25 c.c. infectiemateriaal per 100 c.c. kultuurvloeistof.

Uit dit alles volgt, dat de groei van deze organismen in deze kultuurbodems slechts uiterst langzaam plaats heeft en dat de snelheid der gisting bijna uitsluitend afhangt van de hoeveelheid entmateriaal. Misschien ook was de samenstelling der gebruikte kultuurvloeistof (duinwater 100, vetzuurzout 1, NH_4Cl 0,05, K_2HPO_4 0,05) minder geschikt voor den groei der mikroben.

Teneinde te pogen den groei te bevorderen, entte ik een weinig van het bezinksel over in andere rijkere voedingsbodems welke moutextract, vleeschwater + 1 % glucose, ½ % asparagine + 1 % calciumbutyraat of ¼ % pepton + 1 % calciumbutyraat, bevatten. Bij al deze proeven had eene overwoekering der gistingsfermenten plaats door bacteriën, welke in het bezinksel nog aanwezig waren en in hoofdzaak anaërobe sporenvormers bleken te zijn; hetgeen overeenstemt met de feiten, medegedeeld bij de in § 6 besproken methaangisting uit eiwitten en suikers.

Bij het mikroskopisch onderzoek eener gisting van een vetzuur calciumzout, komt men na eenigen tijd tot de overtuiging, dat, naarmate de kulturen zich reinigen van de verschillende met het infectiemateriaal medegebrachte verbindingen, ook het bacteriënmengsel minder gecompliceerd wordt en er eindelijk twee typische vormen op den voorgrond komen: een „*staafbacterie*" en eene „*sarcine.*" In alle beschreven gistingen zijn het alleen deze twee soorten, die op grond van eene voortdurende mikroskopische contrôle, als agens moeten worden beschouwd.

Oogenschijnlijk zijn de kulturen zeer arm aan mikroben; behandelt men echter het bezinksel met zoutzuur, zoodat het krijt oplost, dan komen ze bij massa's te voorschijn. Ze omhullen zich dus met het carbonaat, dat bij het proces gevormd wordt.

METHAANBACTERIE. Vergrooting 600 ×. Opgenomen met homogene immersie 2 m.m. (HARTNACK) en projectie-oculair 2 (ZEISS). Praeparaat, verkregen door het bezinksel eener butyraatgisting, na met zoutzuur van krijt te zijn ontdaan, volgens de methode van ZETTNOW te kleuren.

METHAANSARCINE. Vergrooting 600 ×. Opgenomen met waterimmersie 2,5 m m. (ZEISS) en projectie-oculair 2 (ZEISS). Praeparaat in water, verkregen door het bezinksel eener sarcine-kultuur met zoutzuur te behandelen, te laten bezinken en uit te wasschen met water.

In de acetaatkulturen is de *sarcine* gewoonlijk de overheerschende vorm; in die der overige zouten vindt men in hoofdzaak de *staafbacterie*, welke over het algemeen tot krachtiger gistingen dan de sarcine aanleiding geeft.

De methaanbacterie doet zich als eene onbeweeglijke staafbacterie voor, die gewoonlijk eene lengte heeft van 5—7 μ en eene dikte van 0.3—0.5 μ. Dikwijls echter vindt men ze tot lange draden van aanzienlijke lengte vereenigd, welke soms als bundels of kluwens voorkomen. Vooral de bundels zijn voor deze soort zeer karakteristiek en trekken direct in elk preparaat de aandacht. Sporenvorming werd niet waargenomen; de dodingstemperatuur ligt bij $\pm$ 60° C. Slechts in neutrale vloeistoffen kan deze bacterie functioneeren. Met verschillende kleurstoffen laat ze zich gemakkelijk kleuren, vooral met de gebruikelijke anilinekleurstoffen, als fuchsine, gentianaviolet en methylviolet. Volgens de GRAM'sche methode kon ze niet gekleurd worden. De ZETTNOW'sche methode gaf goede resultaten; er konden, zooals te verwachten was, geen ciliën aangetoond worden. Het mikrophotogram is opgenomen naar een preparaat, op de laatste wijze gekleurd.

De methaansarcine is een onbeweeglijk organisme van groote afmetingen; de gewone sarcinepakketten hebben eene ribbe van 8—10 μ, bestaan uit 8 gedeelten, welke elk weder uit 8 kokkenachtige deelen zijn opgebouwd. Ze vormt geen sporen, wordt evenals de bacterie bij $\pm$ 60° C. gedood, en leeft slechts in neutrale vloeistoffen. Door anilinkleurstoffen wordt de sarcine gekleurd, echter niet volgens de GRAM'sche methode. De photographie is genomen naar een ongekleurd preparaat in water.

Daar het van belang was beide organismen in reinkultuur te brengen, heb ik getracht dit langs verschillende wegen te bereiken. In een vacuümexsiccator in waterstofatmosfeer bij 35° C., werden kulturen aangelegd op verdunden moutagar, vleeschagar, agar met minerale zouten en 1% calciumbutyraat, en op aardappelschijven; hierop ontwikkelden ze zich echter niet tot koloniën. Evenmin ontstond in buiskulturen met dezelfde voedingsstoffen (mengkultuur in hooge laag uitgekookte agar) een groei tot koloniën. Het mocht dus niet gelukken de rein-

kulturen der methaanorganismen meester te worden, hetgeen òf het gevolg is van de geringe groeisnelheid, òf misschien van de eigenschap, niet op of in vasten voedingsbodem zich te kunnen ontwikkelen.

Een middel, om de sarcine van de staafbacterie te scheiden, werd gevonden in het verschillend weerstandsvermogen, dat ze tegen uitdroging bieden. De sarcine verdraagt het uitdrogen bij 40°, de bacterie echter niet, zoodat uit riool- of grachtmodder bij 40° gedroogd en als entmateriaal gebezigd, slechts de sarcine zich ontwikkelt.

Beide mikroben komen echter hierin overeen, dat hunne functies, door het opdrijven der concentratie van het vetzure zout in de vloeistof, geschaad worden; bij een gehalte van 10% is de gistingssnelheid slechts uiterst gering en staat de kultuur praktisch stil.

Organismen, die in alle eigenschappen overeenkomen met de bovenbeschrevene, zijn aanwezig in zeemodder, zooals die bijvoorbeeld wordt aangetroffen in den buitenhaven van Bergen-op-Zoom en in den Dollard. Uit eenige proeven bleek, dat de vervanging van de kultuurvloeistof van eene gewone butyraatgisting door eene zelfde oplossing, waarin alleen het duinwater was vervangen door zeewater, geen invloed op het verloop der gisting heeft. Omgekeerd kon de modder, van genoemde plaatsen afkomstig, gebruikt worden om eene butyraatgisting met duinwater te infecteeren.

Langs onze zeekusten hebben dus deze zelfde omzettingen plaats als in den bodem van het vasteland.

Eene sarcine, welke morphologisch groote overeenkomst vertoont met de beschreven methaansarcine, werd door Prof. Beijerinck en Goslings in 1905 beschreven [1]). Uit biochemisch oogpunt beschouwd, hebben beide fermenten echter niets gemeen. Terwijl toch de laatste uit koolhydraten waterstof en melkzuur vormt, tevens zich in sterk zure mediën ontwikkelt, vergist de eerste vetzure zouten tot methaan en leeft uitsluitend in neutrale vloei-

[1]) Koninklijke Academie van Wetenschappen. Proceedings 25 Febr. 1905. pag. 580.

stoffen. Deze feiten zijn voldoende, ze als scherp gescheiden soorten te beschouwen.

Dat de methaanbacterie niets te maken heeft met de bacillen, die volgens Omelianski de cellulose vergisten, hebben proeven bewezen, waarbij bleek, dat cellulose door de methaanfermenten niet wordt ontleed. Entingen toch, met het zuivere bacteriënmateriaal in oplossingen, welke behalve minerale zouten ook cellulose en krijt bevatten, gaven na maanden bij 35° C. gekultiveerd te zijn, nog geen spoor van gas. Bovendien werd bij deze bacterie nooit sporenvorming waargenomen.

HOOFDSTUK II.

Het verdwijnen van de waterstof in de natuur, onder den invloed van de mikroben der methaangistingen.

---

§ 1. Waterstof in de atmospheer.

Als produkten van het bacteriënleven en van vulkanische werkingen ontweken sedert duizenden eeuwen, waterstof, methaan en hoogere koolwaterstoffen uit den bodem en kwamen in den dampkring. De processen, waarbij zij gevormd werden, verloopen ook nu nog en gaan steeds voort met de hoeveelheid brandbare gassen daarin te doen toenemen.

Waar blijven deze gassen? Blijkbaar hoopen zij zich niet in de atmospheer op. Is hun verdwijnen in hoogere luchtlagen aannemelijk? Stijgen ze wellicht boven den dampkring, om zich in den ether te verliezen, of zijn er biologische processen aan de oppervlakte van de aarde, waarbij hun energie nuttig gebruikt kan worden?

Volgens de onderzoekingen van Gautier (l. c. blz. 8) mogen we aannemen, dat 0,02 volumeprocent van de atmospherische gassen uit waterstof bestaat. Op zichzelf beschouwd is dit gehalte zeer gering, maar dat een klein percentage van een gas in den dampkring een hoogst belangrijke rol kan spelen, ziet men oogenblikkelijk in, wanneer men nagaat welk eene machtige factor voor de organische wereld het koolzuur is, waarvan het gehalte slechts het dubbele van dat der waterstof bedraagt.

Deze 0,04 % koolzuur toch zijn de koolstofbron van de geheele levende natuur, welke op haar beurt weer de oorsprong der koolzuurvorming is, zoodat het element koolstof eenen kringloop beschrijft.

Zal de waterstof op overeenkomstige wijze circuleeren; zal hare in den dampkring aanwezige hoeveelheid, evenals die der

andere gassen, constant zijn en is er dus een evenwicht tusschen waterstofvorming en waterstofabsorptie? Terwijl haar ontstaan als produkt bij vele biochemismen vaststaat, is het niet gewaagd te veronderstellen, dat dit gas onder invloed van mikroben weder verdwijnt en daarbij hoofdzakelijk als energiebron dient om later weder langs vele wegen in de atmospheer terug te treden.

§ 2. Waterstofabsorptie in butyraatgistingen.

De beschouwing van de wijze, waarop boterzure kalk tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat vergist, leidde tot de vraag, of elementaire waterstof bij dit proces zou kunnen worden geabsorbeerd. De vorming van methaan uit de CH_2- en CH_3-groepen van het butyraat, die bij de gewone gisting plaats heeft door additie van waterstof, die door splitsing van water ontstaat, zou misschien evengoed door vrije waterstof tot stand kunnen komen. Hierdoor zou dan meer energie vrijkomen en tegelijk meer methaan gevormd worden. Dit volgt uit de formules en de berekening der hoeveelheden vrijwordende energie.

Gistingen van calciumbutyraat.

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 3\ H_2O = 5\ CH_4 + 2\ CO_2 + Ca\ CO_3. \quad (1)$$
$$-311{,}7 - 3 \times 69 = -5 \times 18{,}9 - 2 \times 95 - 269 + \mathbf{34{,}8}.$$

Gisting van calciumbutyraat en waterstof.

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 8\ H + H_2O = 6\ CH_4 + CO_2 + Ca\ CO_3. \quad (2)$$
$$-311{,}7 - 0 - 69 = -6 \times 18{,}9 - 95 - 269 + \mathbf{86{,}7}.$$

In Augustus 1905 vingen de onderzoekingen over dit vraagstuk aan.

Bij deze proeven moesten kultuurvaten gebruikt worden, welke tegen een hoogen inwendigen druk bestand waren, wat uit de volgende berekening volgt.

2,14 gr. calciumbutyraat kan volgens formule (2) aanleiding geven tot de absorptie van 956 c.c. waterstof, waarbij dan 1418 c.c. methaan en 236 c.c. koolzuur ontstaan (bij 15° en 760 m.M. druk.) Vangt eene dergelijke gisting bij atmospherischen druk aan, dan is de druk aan het einde van het proces $\frac{1418 + 236}{956}$ $= 1\frac{3}{4}$ atmospheer, zoodat er een overdruk van $\frac{3}{4}$ atmospheer aanwezig is. Heeft echter de waterstofabsorptie niet plaats dan

is de druk aan 't einde natuurlijk juist 1 atmospheer meer dan in 't vorige geval en bedraagt de overdruk $1^3/_4$ atmospheer.

Daarom gebruikte ik champagneflesschen van goede merken, welke op een druk van 30 atm. beproefd zijn en dus zeker te vertrouwen waren.

Daar de oplosbaarheid van waterstof in water niet zeer groot is, scheen het mij voor het proces bevorderlijk de oplossing der waterstof in de kultuurvloeistof te bespoedigen door schudden. Dit bereikte ik door de champagneflesch horizontaal in den thermostaat op te hangen en door middel van een heete-lucht-motor aan een einde langzaam op en neer te trekken, zoodat zich de vloeistof in de langsrichting der flesch heen en weer bewoog.

Den 16den Augustus ving de proef aan; in eene flesch van 752 c.c. inhoud was 100 c.c. gebracht van eene oplossing van duinwater met minerale zouten en 1,457 gr. calciumbutyraat, terwijl $\pm$ 25 c.c. fermenten eener butyraatkultuur in deze oplossing waren gesuspendeerd. De flesch was voorzien van een gummistop met glazen kraanbuis. Door beurtelings leegpompen en vullen met zuivere waterstof werd alle lucht door dit gas verdrongen zoodat er 650 c.c. waterstof in de flesch aanwezig waren, welke hoeveelheid volgens formule (2) met 1,457 gr. calc. butyraat overeenstemt.

Tot den 6den September werd er nu bij 35° C. gekultiveerd en daarna de inhoud der flesch onderzocht. Voor het bepalen van de hoeveelheid gas werd de flesch verbonden met een kwikburet, doch door het springen van de verbindingsbuis ontsnapte de overdruk.

Van het in de flesch teruggebleven gas werd nog eene analyse gemaakt; het bestond enkel uit methaan en koolzuur en wel 94,5% CH_4 en 5,5% CO_2, terwijl geen spoor waterstof aanwezig was.

Het bewijs was dus geleverd, dat de waterstof in een butyraatkultuur kan verdwijnen.

De hoeveelheid koolzuur, welke volgens formule (2) 14% van het gasmengsel moest uitmaken, was echter veel geringer, wat aan de vorming van calciumbicarbonaat kon worden toegeschreven. Door het beurtelings leegpompen der flesch en vullen met

waterstof bij den aanvang der proef worden de bicarbonaten van het infectiemateriaal tot carbonaten ontleed; hierdoor vindt het koolzuur, dat gedurende het proces wordt ontwikkeld, gelegenheid zich weder aan carbonaat te binden. Ten einde het absorptieproces nader te bestudeeren, herhaalde ik de proef met drie Pasteur'sche kolven van 1 l. inhoud. Ze werden elk voorzien van 2,14 gr. calciumbutyraat, gedistilleerd water met minerale zouten en ongeveer 956 c.c. waterstofgas, na infectie met 25 c.c. entmateriaal dichtgesmolten en bij 35° krachtig geschud om de proef nog vlugger te laten verloopen. Dit onderzoek duurde van den 7den tot den 25sten September, waarna de gassen geanalyseerd werden.

In kolf 1 en 3 was slechts waterstof, in kolf 2 was 7,5% methaan en 92,5% waterstof aanwezig. De kulturen verspreidden een zeer onaangename rottingslucht; het bezinksel was slijmerig geworden en de vloeistof was lichtbruin van kleur.

De oorzaak, welke het mislukken der gistingen ten gevolge had kunnen hebben, moest gezocht worden in het heftige schudden der kulturen, aangezien dit het eenige punt van verschil met de vorige proef uitmaakte.

Drie daarna ingestelde kolven, die echter slechts kalm geschud werden, gaven geen gunstig resultaat en toch had de eerste proef bewezen, dat waterstofabsorptie in deze kulturen mogelijk was.

Den 2den October werd een proef ingezet, welke in alle opzichten eene herhaling der eerste was; den 19den October werd het gas geanalyseerd en bleek de volgende samenstelling te hebben.

13,7 % CH_4.
86,3 % H_2.
0,0 % CO_2.

De absorptie van waterstof was dus zeer gering geweest, daar er bij 't openen der flesch een gering vacuüm bleek te zijn ontstaan, zoodat slechts ongeveer 13 % waterstof moet zijn geabsorbeerd. Merkwaardig was, dat het gas totaal geen koolzuur bevatte.

Nog steeds ervan overtuigd, dat de beweging der kultuur-

vloeistof zeer bevorderlijk zou zijn voor het oplossen der waterstof en dus ook voor het proces, vervaardigde ik een toestel, waarin een zestal kultuurvaten (Fig. 3) gelijktijdig om een horizontale as roteerden met een snelheid van twee omwentelingen per minuut. Het vloeistoflaagje, dat bij deze draaiïng langs de wanden van het vat steeds zal worden vernieuwd, biedt het gas een groot oppervlak aan om op te lossen. Door deze wijze van werken zal slechts een zeer langzaam verplaatsen der bacteriën plaats hebben, zoodat de invloed van het schudden tot een minimum beperkt wordt.

Verscheiden proeven, op deze wijze genomen, gaven weder niet het gewenschte resultaat. Intusschen hadden echter twee stilliggende kulturen in champagneflesschen een betere uitkomst gegeven. Beide kulturen hadden elk 1,457 gr. butyraat en 650 c.c. waterstof ontvangen; ze waren den 3den November bij 35° ingezet.

De druk van het gasmengsel was den 17den Nov. drie c.M. hooger dan die van den atmospheer; de samenstelling was:

74,6 % CH_4.
25,4 % H_2.
0,0 % CO_2.

De kultuurvloeistof bevatte nog 0,72 gr. calc.butyraat, zoodat ± 0,7 gr. waren vergist. Deze 0,7 gr. butyraat zouden tot absorptie van 320 c.c. waterstof volgens formule (2) aanleiding kunnen geven; bij deze proef bleken echter 490 c.c. te zijn verdwenen.

Ook in dit geval was er weer geen koolzuur aanwezig.

De tweede kultuur, den 30sten November geanalyseeerd, had bijna een halve atmopheer overdruk en bevatte een gas van de volgende samenstelling:

85,2 % CH_4.
0,0 % H_2.
14,8 % CO_2.

De kultuurvloeistof bevatte geen calciumbutyraat meer.

De verhouding, waarin methaan en koolzuur hier aanwezig zijn, komt nagenoeg overeen met die, waarin ze volgens formule (2) gevormd worden. Ook de afwezigheid van waterstof beantwoordt

aan de verwachting. De druk in de flesch was echter te gering, zoodat de gevormde hoeveelheid methaan niet beantwoordde aan de verdwenen hoeveelheid waterstof.

Deze beide laatste proefnemingen toonden zonder eenigen twijfel aan, dat in de gisting van boterzure kalk de waterstof kan worden opgenomen en ook leverden ze het bewijs, dat de kunstmatige beweging een nadeeligen invloed uitoefent op de mikroben, welke deze processen bewerkstelligen.

§ 3. Waterstofabsorptie in formiaatmethaangistingen.

Intusschen was in Februari 1906 het proces der methaangisting uit calciumformiaat vastgesteld en eene beschouwing over de daarbij waarschijnlijk plaatshebbende omzettingen verschafte een beter inzicht in de wijze, waarop waterstof tot verdwijnen kan worden gebracht.

Van het verloop der calciumformiaatmethaangisting kan men zich op de volgende wijze eene voorstelling maken. Zooals in Hoofdstuk I § 4 is beschreven, geeft de volgende formule de splitsing van dit zout aan:

$$2\,C_2\,H_2\,O_4\,Ca = CH_4 + CO_2 + 2\,Ca\,CO_3. \quad (1)$$

Onder den invloed van het bacteriënprotoplasma heeft in twee moleculen formiaat eene zoodanige atoomverschuiving plaats, dat er 4 waterstofatomen met de koolstof van een der 4 carboxylgroepen één molecuul methaan vormen, terwijl de overige atomen zich samenvoegen tot één molecuul koolzuur en twee moleculen calciumcarbonaat.

Een tweede opvatting is deze, dat de gewone hydrolytische splitsing van twee moleculen calciumformiaat tot waterstof, koolzuur en calciumcarbonaat als eerste ontledingsphase in het protoplasma tot stand komt.

$$2\,C_2\,H_2\,O_4\,Ca + 2\,H_2O = 4\,H_2 + 2\,CO_2 + 2\,Ca\,CO_3. \quad (2)$$

Op deze phase zou dan oogenblikkelijk de tweede volgen, waarbij één der gevormde moleculen koolzuur tot methaan en water wordt omgezet door de vrijgekomen waterstof.

$$CO_2 + 4\,H_2 = CH_4 + 2\,H_2O. \quad (3)$$

Ook kan men zich denken, dat één van de twee moleculen

mierenzure kalk hydrolytisch gesplitst wordt en dat de daarbij beschikbaar komende waterstof met één der twee carboxylgroepen van het andere molecuul mierenzuur methaan en water vormt.

Steeds echter zijn bij deze gisting twee moleculen calciumformiaat noodig om één molecuul methaan te vormen uit één der 4 voorhanden zijnde carboxylgroepen. Er bestaat geen enkele reden, aan één dezer 4 groepen eenigen voorrang toe te kennen; ze zullen daarom alle vier even gemakkelijk in reactie treden. De beschouwing der gisting, waarbij eene hydrolytische splitsing als tusschenphase werd aangenomen, leidde mij er toe de onderstelling te opperen, dat het misschien mogelijk zou zijn, nog één der carboxylgroepen, respectieve het tweede molecuul koolzuur uit formule (2), door toevoeging van elementaire waterstof in methaan en water over te voeren. Koolzuur als zoodanig zou er dan niet vrijkomen; de twee andere carboxylgroepen dienen voor de vorming van twee moleculen calciumcarbonaat.

De volgende formule stelt dit proces voor.

$$2\ C_2\ H_2\ O_4\ Ca + 4\ H_2 = 2\ CH_4 + 2\ H_2O + 2\ CaCO_3 \quad (4).$$

Volgens deze vergelijking zou de dubbele hoeveelheid methaan ontstaan als bij eene gisting zonder deze waterstofabsorptie.

Al deze beschouwingen berusten op de onderstelling, uitgedrukt in vergelijking (2), volgens welke in eerste instantie het formiaat hydrolytisch gesplitst wordt onder vorming van waterstof en koolzuur.

Overeenkomstig de tot nog toe bekende splitsing van formiaat door mikroben, waarbij waterstof ontstaat, en katalytische splitsingen, zooals bijvoorbeeld door het rhodium plaats heeft, eveneens onder vorming van waterstof, zou dus ook hier aangenomen kunnen worden, dat steeds onder den invloed van het bacteriënprotoplasma in de eerste plaats waterstof uit formiaat ontstaat.

De proeven over de waterstofabsorptie werden, behalve in de reeds beschreven champagneflesschen en PASTEUR'SCHE kolven, ook uitgevoerd in speciaal daarvoor vervaardigde dikwandige

glazen kultuurvaten, zooals die in figuur 3 zijn afgebeeld. Deze cylindrische apparaten, die een inhoud van ± 300 c.c. hebben, zijn òf voorzien van een glazen buis (fig. 3*a*), die na het vullen met kultuurvloeistof, entmateriaal en het benoodigde gasmengsel wordt dichtgesmolten, òf voorzien van een glazen buis met een

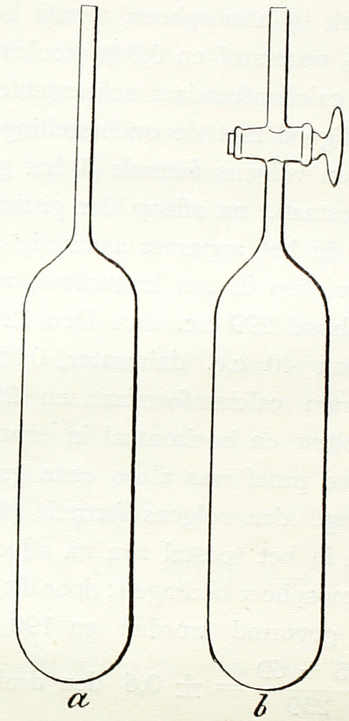


Fig. 3.

Dikwandige, glazen apparaten voor het absorbeeren van waterstof bij gistingen.

a. Kultuurvat van 300 c.c. inhoud met glazen buis, die na de vulling wordt dichtgesmolten.

b. Idem, met glazen kraan, welke na de vulling gesloten wordt.

zeer zuiver geslepen kraan (fig. 3*b*), die naderhand wordt gesloten.

Van de onderzoekingen over de waterstofabsorptie in eene formiaatgisting zal ik de drie volgende meest karakteristieke mededeelen.

I. In eene champagneflesch van 818 c.c. inhoud zijn den 12den Maart 1906, 740 c.c. waterstof, 78 c.c. duinwater, 0,05 % K_2HPO_4, 0,05 % NH_4Cl. en 2 gram calciumformiaat gebracht; in deze 78 c.c. werden ± 30 c.c. fermentenmateriaal van eene butyraatgisting gesuspendeerd. De flesch lag tot 21 Maart horizontaal in eenen thermostaat van 35°, op dien datum geanalyseerd, was de druk 1/2 atmospheer, terwijl het gasmengsel uit 99 % methaan, 1 % waterstof en 0,0 % koolzuur bestond. In de vloeistof was geen calciumformiaat achtergebleven. We zien, dat deze resultaten vrijgoed met de onderstelling overeenstemmen. Theoretisch toch zou volgens formule (4) het gas, dat slechts uit methaan moest bestaan, na afloop der gisting onder een druk van 1/2 atmospheer in het apparaat aanwezig zijn.

II. Deze gisting verliep in een kultuurvat, voorgesteld in fig. 3*a*, waarvan de inhoud 299 c.c. was. Den 12denMaart werd dit toestel voorzien van 40 c.c. duinwater, 0,05 % K_2HPO_4, 0,05 NH_4Cl., 0,515 gram calciumformiaat en 259 c.c. waterstof, daarna dichtgesmolten en horizontaal in eenen thermostaat van 35° gelegd. Bij deze proef was alzoo eene grootere hoeveelheid waterstof toegevoegd dan volgens formule (4) zou kunnen verdwijnen. De druk in het toestel zou na afloop der gisting theoretisch ± 0,6 atmospheer bedragen; door dit proces toch zouden 95 c.c. methaan gevormd worden en 190 c.c. waterstof verdwijnen, zoodat $\frac{95 + 69}{259} = \pm 0{,}6$ den druk na absorptie zou voorstellen.

Bij de analyse dezer kultuur, den 21sten Maart uitgevoerd, bedroeg de druk ongeveer 2/5 atm.; het gas bestond slechts uit methaan. Bij deze proef waren alzoo 69 c.c. waterstof te veel verdwenen en ± 20 c.c. methaan te veel gevormd.

III. Deze derde proef was het gevolg van de resultaten, met de tweede verkregen.

Zij werd geheel op dezelfde wijze ingericht als de voorgaande, alleen bevatte het apparaat meer waterstof en wel 500 c.c., welke, daar de nog beschikbare inhoud van het vat slechts 283 c.c. was, erin geperst moesten worden. Berekenen we weer op dezelfde wijze den einddruk en de samenstelling van

het gevormde gasmengsel, dan zou de eerste

$$\frac{95 + 310}{284} = \pm 1{,}4 \text{ atmospheer bedragen,}$$

terwijl de samenstelling ± 23,5% methaan en 76,5% waterstof zou moeten zijn.

De analyse gaf den 2den April geheel andere cijfers. De druk bedroeg ± 1,25 atmospheer; het gas bestond uit: 41,8% methaan en 58,7% waterstof, overeenkomende met 135 c.c. methaan en 190 c.c. waterstof. Door 0,52 gr. calc.form. kunnen slechts 190 c.c. waterstof worden geabsorbeerd, zoodat 120 c.c. waterstof te veel zijn verdwenen (500 — 380 = 120), terwijl ± 30 c.c. methaan te veel zijn ontstaan.

Uit beide laatste proeven zien we duidelijk, dat nog een tweede proces moet bestaan, waarbij eveneens waterstof wordt verbruikt en methaan geproduceerd. De eenige koolstofverbinding, welke in de kultuur nog voorkomt en dus tot methaan zou zijn overgegaan, is het koolzuur van het calciumbicarbonaat, hetwelk met het entmateriaal is medegebracht. Hieruit volgt, dat eene methaangisting uit koolzuur en waterstof zou moeten bestaan. In vergelijking gebracht zou dit zijn:

$$4\ H_2 + CO_2 = CH_4 + 2\ H_2O.$$

§ 4. Methaangisting uit koolzuur en waterstof.

Bij de volgende onderzoekingen over deze nieuwe methaangisting, waarbij door de werking van mikroben uit twee gassen, waterstof en koolzuur, een derde gas, methaan, wordt gevormd, voegde ik aan de kulturen als voedings- en energiebron slechts de beide eerstgenoemde gassen toe; de kultuurvloeistof bestond overigens uit duinwater en minerale zouten. Van deze proefnemingen zal ik het volgende mededeelen.

Ten einde eene belangrijke hoeveelheid gas in reaktie te kunnen brengen, perste ik waterstof en koolzuur in de verhouding 4 op 1 in de kultuurvaten.

Het vullen der kultuurvaten onder verhoogden druk geschiedde op navolgende wijze.

Fig. 4 is eene afbeelding van de daartoe benoodigde inrichting. Het toestel bestaat uit vier afzonderlijke deelen en wel: een meetbuis *mb* met kraan II, een driewegkraan I, het kultuurvat *Kv* met kraan IV en de kwikburet *Kb* met kraan III en de open drukbuis *Kbo*.

Voordat men het kultuurvat aan den toestel verbindt, wordt het, nadat de kultuurvloeistof en het infectiemateriaal erin gebracht zijn, beurtelings geëvacueerd en gevuld met zuiver waterstofgas, ten einde de laatste sporen zuurstof te verwijderen. Men eindigt met het kultuurvat leeg te zuigen om het daarna in het statief te klemmen en aan driewegkraan I te verbinden. Het gasmengsel (koolzuur waterstof) bevindt zich in afgemeten hoeveelheid in de meetbuis *mb*, die 500 c.c. bevatten kan. Verbindt men nu, door middel van de kranen I, II en IV, meetbuis *mb* met kultuurvat *Kb*, dan stroomt het gas gedeeltelijk in het laatste over. Nu verbindt men de meetbuis *mb* met de kwikburet *Kb*, die op dit oogenblik geheel gevuld is, door de kranen I en III in den daartoe benoodigden stand te brengen en vult de kwikburet geheel met het gas. Door de kwikburet nu in verbinding te brengen met het kultuurvat (door kraan I) en de open drukbuis *Kbo* met de hand omhoog te brengen, perst men het gas in het kultuurvat. Deze manipulatie herhaalt men met eene nieuwe hoeveelheid gas, tot de grootst mogelijke hoeveelheid in *Kv* is geperst, d.w.z. totdat het grootste niveauverschil tusschen het kwik in buis *Kb* en buis *Kbo* bereikt is. Op deze wijze kon het gas onder een overdruk van $\pm 1\frac{1}{2}$ atmospheer in het kultuurvat geperst worden.

Met dit apparaat was den 6den April 1906 in een kultuurvat zooals in fig. 3*b* afgebeeld is, met een inhoud van 302 c.c. en waarin 52 c.c. duinwater, 0,05 % NH_4Cl, 0,05 % K_2HPO_4, 20 c.c. entmateriaal eener formiaatmethaangisting, waren gebracht, 400 c.c. waterstof en 100 c.c. koolzuur geperst.

Na drie dagen kon er weer 260 c.c. waterstof en 65 c.c. koolzuur bijgeperst worden. Dit bijvullen kon nog eenige malen herhaald worden, zoodat er in negen dagen tijd de volgende hoeveelheden ingeperst waren.

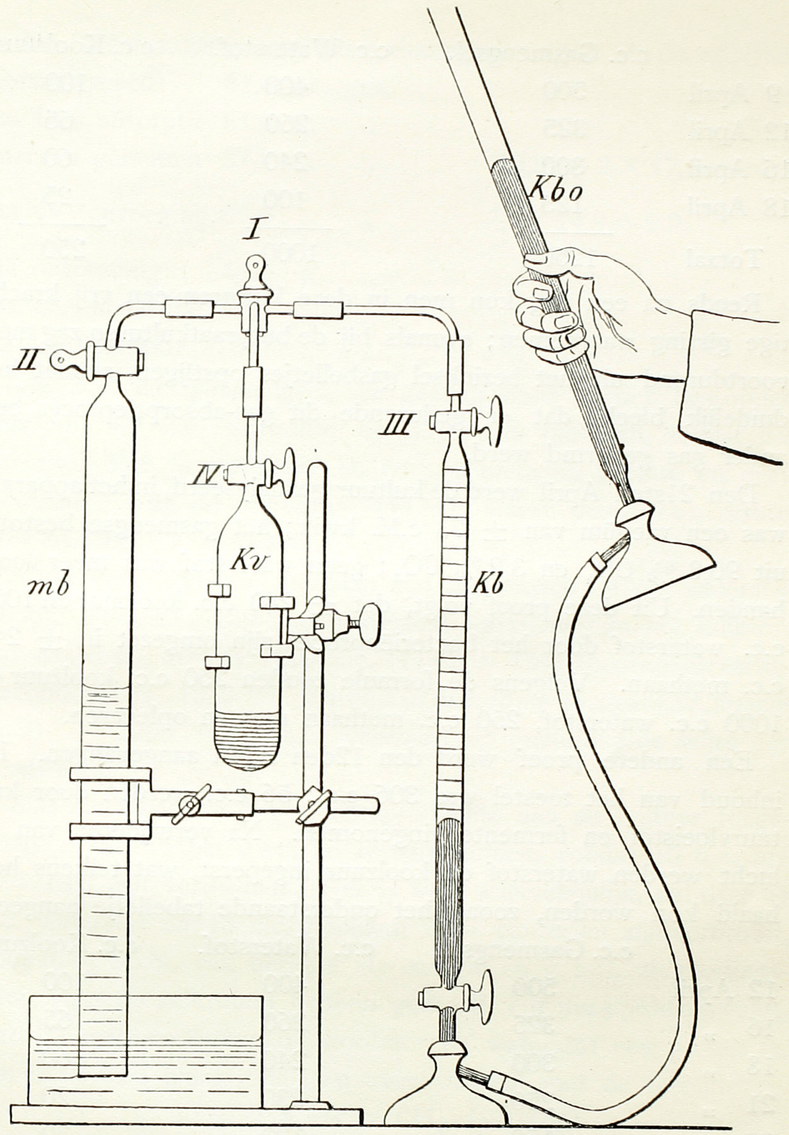


Fig. 4.

Het vullen der kultuurvaten met gas onder verhoogden druk.

I. Glazen driewegkraan.
II. III. & IV. Gewone glaskranen.
mb. Meetbuis 500 c.c.
Kv. Kultuurvat.
Kb Kwikburet.
Kbo. Open drukbuis der kwikburet.

	c.c. Gasmengsel.	c.c. Waterstof.	c.c. Koolzuur.
9 April	500	400	100
12 April	325	260	65
16 April	300	240	60
18 April	125	100	25
Totaal	1250	1000	250

Reeds na een dag kon men in deze kulturen een vrij krachtige gisting waarnemen; evenals bij de butyraatkulturen zag men voortdurend uit het bezinksel gasbelletjes opstijgen, zoodat het duidelijk bleek, dat er gedurende dit gas-absorptieproces een ander gas gevormd werd.

Den 21sten April werd de kultuur geanalyseerd, in het apparaat was een vacuüm van $\pm$ 73 c.M. kwik; het gasmengsel bestond uit 96,8 % CH_4 en 3,2 % CO_2; geen waterstof was meer voorhanden. Uit deze proef volgt, dat $\pm$ 240 c.c. koolzuur en 1000 c.c. waterstof door het bacteriënproces zijn omgezet in $\pm$ 240 c.c. methaan. Volgens de formule zouden 250 c.c. koolzuur en 1000 c.c. waterstof, 250 c.c. methaan moeten opleveren.

Een andere proef werd den 12den April aangevangen. De inhoud van het toestel was 306 c.c.; 56 c.c. werden door kultuurvloeistof en fermenten ingenomen. Na verwijderen van de lucht werden waterstof en koolzuur ingeperst, wat telkens herhaald kon worden, zooals het onderstaande tabelletje aangeeft.

	c.c. Gasmengsel.	c.c. Waterstof.	c.c. Koolzuur.
12 April	500	400	100
16 „	325	260	65
18 „	300	240	60
21 „	250	230	20
23 „	150	120	30
25 „	125	100	25
Totaal	1650	1350	300

Den 30sten April bleek hij de analyse van de kultuur, dat de druk in het toestel 135 c.m. kwik bedroeg, waarmede een volume gas van 444 c.c. bij 76 c.m. druk overeenkomt:

$$\frac{135}{76} \times 250 = 444.$$

De samenstelling van het gasmengsel volgde uit de analyse.

Geanalyseerd:	81,6 c.c. gas,		
na CO_2 absorptie	81,6 „ „		
hiervan genomen	27,7 „ „	$50,5 - 2 \times 17,8 = 14,9.$	
na O_2 toevoeging	98,6 „ „	$\frac{2}{3} \times 14,9 = 9,9.$	
na ontploffing	48,1 „ „		
na CO_2 absorptie	30,3 „ „		
na O_2 absorptie	0,0 „ „		

De 27,7 c.c. gasmengsel, die geanalyseerd werden bestonden dus uit 9,9 c.c. waterstof en 17,8 c.c. methaan, zoodat het mengsel 35,8 % waterstof en 64,8 % methaan bevatte en geen koolzuur. Van de aanwezige 444 c.c. waren dus 159 c.c. waterstof en 285 c.c. methaan.

Voor deze 285 c.c. methaan zijn theoretisch 440 c.c. waterstof noodig geweest; 159 c.c. waterstof waren nog in het kultuurvat aanwezig, zoodat 1299 c.c. (1140 + 159) theoretisch teruggevonden zijn. 1350 c.c. waren aan de kultuur toegevoegd, zoodat 1350 — 1299 = 51 c.c. waterstof op onverklaarde wijze zijn verdwenen.

300 c.c. koolzuur waren oorspronkelijk aan de kultuur toegevoegd; 285 in het methaan teruggevonden, zoodat 15 c.c. onverklaard zijn verdwenen. Het is zeer waarschijnlijk, dat deze 51 c.c. waterstof en 15 c.c. koolzuur door bakteriën zijn verbruikt, zoodat $\pm$ 95 % van het gas als energie en $\pm$ 5 % als voedingsbron voor de mikroben hebben gediend. Uit deze proeven volgt, dat de methaangisting uit koolzuur en waterstof een proces is, dat inderdaad plaats heeft en overeenstemt met de formule:

$$CO_2 + 4\ H_2 = CH_4 + 2\ H_2O.$$

Chemisch zou hierbij 61.9 Caloriën kunnen ontstaan.

$$-95 - 0 = -18,9 - 139 + \mathbf{61.9.}$$

Deze hoeveelheid warmte komt echter niet als zoodanig vrij; een deel van den beschikbaren arbeid zal gebruikt worden voor den opbouw van bacteriënlichamen, een ander deel is noodig voor de vermindering, welke het gasvolume ondergaat bij dit absorptieproces. Op welke wijze de energie-omzettingen bij biochemische processen plaats hebben, is nog een open vraag.

De arbeid, welke noodig is voor de volumevermindering van de hoeveelheid gas, is slechts gering, zooals volgt uit de berekening.

Neem aan, dat 1 l. gasmengsel, waarin de verhouding $\frac{CO_2}{H_2} = \frac{1}{4}$, bij 15° C en 760 m.M. is toegevoegd aan eene kultuur in een gesloten vat. De druk in het vat zal gedurende het proces afnemen tot deze $^1/_5$ atmospheer bedraagt. Nu kan het kultuurvat eene hoeveelheid arbeid verrichten, welke gelijk is aan die, noodig om 1 l. gas bij constante temperatuur tot $^1/_5$ l. samen te persen. Deze arbeid kan worden voorgesteld door de uitdrukking:

$$A = 2{,}3026\ P_0\ V_0 \log \frac{V_1}{V_0},$$

waarin $V_0 = {}^1/_5$ liter $= 0{,}0002$ M³.
$V_1 = 1$ „ $= 0{,}001$ „
$P_0 = 1$ atmospheer $= 10334$ K.G. per M².

Zoodat:

$$A = 2{,}3026 \times 10334 \times 0{,}0002 \log 5 \times 1 \text{ K.G.M},$$

of in gramcaloriën uitgedrukt:

$$C = \frac{2{,}3026 \times 10334 \times 0{,}2 \times 0{,}69897}{425} \times 1 \text{ gramcalorie.}$$

$C = 7{,}8$ gramcal.

In het kultuurvat zijn 200 c.c. koolzuur gebracht, wegende 0,366 gram. De arbeid, welke nu noodig is om het volume, dat 1 grammolecuul koolzuur en 4 grammoleculen waterstof innemen bij 15° C. en 760 m.M. op $^1/_5$ samen te persen bij constante temperatuur, bedraagt dan:

$$\frac{44}{366} \times 7{,}8 = 0{,}940 \text{ Caloriën.}$$

We zien dus, dat dit slechts een klein gedeelte is van de totale energie 61,9 Cal., welke bij het proces zou kunnen ontstaan.

Daar de koolzuurwaterstofgisting wordt verkregen door het bezinksel uit een oude butyraat- of formiaatmethaangisting als infecteriemateriaal te bezigen en zonder moeite op gang gaat, moeten dezelfde mikroben als die, welke de laatste processen bewerkstelligen, ook hier als de werkzame organismen beschouwd

worden, hetgeen bovendien door het mikroskopisch onderzoek gestaafd werd.

Zoowel de sarcine als de staafbakterie waren in staat deze gisting tot stand te brengen.

Gedurende de onderzoekingen over de methaangisting uit koolzuur en waterstof, waren nog eenige proeven ingezet over de waterstofabsorptie in acetaat- en butyraatkulturen en hierbij bleek, dat in eene kultuur met 1,58 gr. calc. acetaat bijna een liter waterstof kan geabsorbeerd worden onder vorming van ± 700 c.c. methaan.

Dit beantwoordt aan de formule:

$$C_4\ H_6\ O_4\ Ca + 4H_2 = 3CH_4 + CaCO_3 + H_2O.$$

Zoo werd ook gevonden, dat 2,14 gram calc.butyraat 2 liter waterstof kunnen doen verdwijnen, waarbij 1600 c.c. methaan worden gevormd, volgens de vergelijking:

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 8H_2 = 7CH_4 + CaCO_3 + H_2O.$$

Toen nu de koolzuurwaterstofgisting zekerheid had verkregen, kon naar aanleiding van dit proces de absorptie van waterstof in bovengenoemde gistingen op eenvoudige wijze verklaard worden.

De hoeveelheid koolzuur, ontstaan bij de gewone acetaat- of butyraatmethaangisting, kan juist met de in bovenstaande formules aangegeven hoeveelheden waterstof methaan vormen volgens de vergelijking der koolzuurwaterstofgisting. Men zou dus het proces der acetaatwaterstofabsorptie aldus kunnen schrijven.

Ten eerste de gewone acetaatgisting:

$$C_4\ H_6\ O_4\ Ca + H_2O = 2CH_4 + CO_2 + CaCO_3,$$

waarop volgt het proces:

$$CO_2 + 4H_2 = CH_4 + 2H_2O.$$

De butyraatwaterstofabsorptie wordt dan:

$$C_8\ H_{14}\ O_4\ Ca + 3H_2O = 5CH_4 + 2CO_2 + CaCO_3.$$
$$2CO_2 + 8H_2 = 2CH_4 + 4H_2O.$$

§ 5. De cellulosegistingen.

In de cellulosegistingen, door Omelianski uitgewerkt en beschreven in hoofdstuk II § 3 van het historisch overzicht,

verdwijnt, zooals bij de beschouwing zijner proefnemingen blijkt, eveneens waterstof. Vooral de serie L zijner proeven (blz. 40) geeft hiervan het doorslaande bewijs.

In de kulturen, zonder pasteurisatie overgeënt, komen zoowel de fermenten der cellulosewaterstofgisting als die der methaangisting voor, terwijl slechts methaan ontwikkeld wordt. Het bleek, dat zelfs tot de 9de overenting nog waterstoffermenten in de methaan-produceerende kulturen aanwezig waren, daar bijna zonder uitzondering bij overenting na pasteurisatie, eene waterstofgisting verkregen werd. Waar de waterstoffermenten aanwezig zijn en zich zoolang kunnen handhaven, moet er noodzakelijk waterstof gevormd worden en, daar deze niet in het ontwikkelde gas voorkwam, moet absorptie daarvan in de kulturen hebben plaats gehad.

Daar de beschreven butyraatmethaanfermenten, voor welke het waterstofabsorptieproces vastgesteld is, oorspronkelijk in de cellulosegistingen ook aanwezig moeten zijn, maar het overenten niet verdragen, zoo kunnen ook zij het niet zijn, die de waterstof deden verdwijnen, zoodat er aangenomen moet worden, dat de cellulosemethaanfermenten zelf deze eigenschap bezitten.

Ten einde dit te bewijzen werd elementaire waterstof toegevoegd aan eene gepasteuriseerde cellulosemethaangisting, die ik mij verschaft had door herhaald overenten van eene ongepasteuriseerde cellelosemethaangisting. Na de 7de overenting bleek de methaangisting, ook na herhaalde pasteurisatie, vasten voet gekregen te hebben, hetgeen na 9 maanden werken ten slotte bereikt was. Deze gepasteuriseerde kultuur bevatte dus practisch een reinkultuur van het cellulosemethaanferment.

De waterstof, hieraan toegevoegd, werd inderdaad geabsorbeerd.

Bij de proefneming werden twee apparaten (± 300 c.c. inhoud), zooals in fig. 3*b* afgebeeld, gebruikt, die nu, na elk voorzien te zijn van: 50 c.c. duinwater, minerale zouten, 5 gr. filtreerpapier als pap en 5 gr. krijt, gesteriliseerd werden en daarna geënt met een flinke hoeveelheid van de gepasteuriseerde cellulosemethaangisting. Door beurtelings evacueeren en vullen met waterstof, werd de lucht door waterstof vervangen. Den 9den April waren aldus 500 c.c. waterstof in beide toestellen geperst;

den 18den April konden er nog 300 c.c. aan toegevoegd worden en den 26sten April nog 200 c.c., zoodat de totaal ingeperste hoeveelheid waterstof voor beide kulturen juist 1 liter bedroeg.

Den 4den Mei werd de analyse der gassen uitgevoerd. De druk bedroeg in het eerste kultuurvat $1\frac{1}{2}$ en in het tweede $1\frac{2}{3}$ atmospheer.

De samenstelling van het gas was in

No. 1.	No. 2.
11,4 % H_2	0,0 % H_2
75,1 „ CH_4	91,5 „ CH_4
13,5 „ CO_2	8,5 „ CO_2

In de eerste kultuur was 950 c.c. waterstof, in de laatste de geheele hoeveelheid waterstof verdwenen. Hiermede was dus bewezen, dat in de cellulosemethaangisting waterstof verdwijnen kan en tevens, dat de waterstofabsorptie ook door geheel andere mikroben dan de bacterien van de gistingen der vetzure zouten plaats heeft.

De verklaring, die Omelianski geeft (zie blz. 39) van de wijze, waarop de scheiding van de methaan- en waterstofcellulosegisting plaats heeft, baseert hij op de waarneming, dat na pasteurisatie de incubatietijd van het methaanferment korter is dan die van het waterstofferment. Uit zijne eigene gegevens volgt echter, wat ik reeds in het historisch overzicht (blz. 38 en 43) heb aangetoond, dat ze over het algemeen niet noemenswaardig verschillen en zelfs in de meeste gevallen de incubatietijd van het waterstofferment de korste is. Daarom kan zijne verklaring niet de juiste zijn.

Uit zijne onderzoekingen zien we tevens, dat de groeisnelheid van het methaanferment grooter is dan die van het waterstofferment, hetgeen volgt uit de seriën H en I, waarin de tijden zijn vermeld, welke verloopen tusschen het oogenblik der overenting *(zonder pasteurisatie)* en het begin der gisting. Deze tijd is voor het waterstofferment gemiddeld ± 28 dagen en voor het methaanferment ± 10 dagen dus belangrijk korter, wat op een verschil in groeisnelheid berusten moet.

Uit het feit, dat de pasteurisatie van het ruwe infectiemateriaal of der eerste overentingen tot waterstofgisting aanleiding

geeft, volgt, dat het waterstofferment beter deze pasteurisatie doorstaat dan het methaanferment.

Met deze gegevens werd getracht eene betere verklaring te geven, welke ik in het volgende meen te hebben gevonden. Wordt eene cellulosegisting, welke beide fermenten bevat, aan eene pasteurisatie onderworpen dan blijven slechts zeer weinig van de sporen der methaanfermenten in staat zich te kunnen ontwikkelen, terwijl de sporen van het waterstofferment goed deze verhitting doorstaan. Bij de nu volgende ontkieming hebben de waterstoffermenten ver de overhand en overwoekeren de enkele ontkiemende methaanfermenten in korten tijd. Hiermede is het steeds optreden van een waterstofgisting, bij overenting na pasteurisatie van ruwkulturen of eerste overentingen, verklaard.

Door overenting zonder pasteurisatie overwoekeren de methaanfermenten, dank zij hun intensievere groei, na verloop van tijd de waterstoffermenten terwijl de waterstof, welke door deze laatsten nog wordt gevormd in de kultuur geabsorbeerd wordt. Wordt daarentegen na vele overentingen weder gepasteuriseerd, dan overtreft het aantal overgebleven levenskrachtige sporen van het sterk overheerschende methaanferment het geringe aantal der waterstoffermenten, zoodat nu de methaangisting zich kan handhaven. Eene herhaling hiervan zal tot een algeheele verdringing der waterstoffermenten leiden.

Op deze wijze is de mogelijkheid van methaangisting na pasteurisatie verklaard.

§ 6. Over de verspreiding van waterstof in natuurlijke gistingsgassen.

Gelijk reeds boven is medegedeeld, komt waterstof in de atmospheer voor. Deze geraakt daarin tengevolge van vulkanische werkingen en gistingsprocessen onder den invloed van het mikrobenleven.

De waterstof van organischen oorsprong, ontwikkelt zich overal, waar in de wateren koolhydraten of eiwitten aanwezig zijn; zeer krachtig zullen deze processen verloopen in de septic-

tanks, riolen, grachten en de afvoerkanalen van de produkten der suiker- en aardappelmeelfabrieken en wel voornamelijk in de daarin aanwezige vloeistoffen zelve en veel minder in het bezinksel.

De methaangisting daarentegen geschiedt, in tegenstelling met de waterstofgisting, in de modder op den bodem van rivieren, moerassen, meren en slooten en niet in het daarboven staande water.

Daar nu de methaanontwikkelende fermenten tevens de eigenschap bezitten, waterstof te kunnen binden, zal dit gas, al mocht het in de modder tijdelijk ontstaan, weder worden geabsorbeerd. Daarom zullen brongas, mijngas en moddergassen, welke alle in den bodem der wateren zijn ontstaan, geen waterstof bevatten. De analyses van deze gassen stemmen hiermede overeen. We behoeven slechts naar de onderzoekingen van Bunsen, Schloesing, Fouqué, Meyer, Oudemans, en v. Breukeleveen [1]) te verwijzen. De analyses van dezen laatsten zijn verricht onder leiding van Hoogewerff en Aronstein op het Scheikundig Laboratorium van de Technische Hoogeschool te Delft.

Slechts twee onderzoekers zijn mij bekend, die opgeven, waterstof gevonden te hebben. Zoo deelt Hoppe-Seyler mede, dat in de gasmonsters uit de modder van de Bodensee naast methaan, koolzuur en stikstof ook 0—10 % waterstof voorkomt. Eveneens is dit opgegeven in de gasmonsters (7, 8, 9 en 10 blz. 14), welke werden geanalyseerd op het scheik. lab. der Amsterdamsche Universiteit, onder toezicht van Bakhuis-Rooseboom, hierin zijn 0,2—6,4 % waterstof opgegeven tevens vinden we in 9 en 10 respectievelijk 0,6 en 0,8 % kooloxyd vermeld.

In elk geval komt men dus tot het besluit, dat de waterstof slechts bij uitzondering in het brongas kan worden aangetoond.

Tot heden zijn nog geen biochemische processen bekend, waarbij kooloxyd wordt gevormd. In de gassen der methaangistingen welke daarop met zorg werden onderzocht komt het niet voor; zelfs met de joodperoxyd-methode (zie blz. 7) kon geen spoor kooloxyd worden aangetoond.

---

[1]) Rec. trav. chim. Pays-Bas 15 1896 p. 280—81.

Daar nu het brongas als produkt van deze gistingen mag worden beschouwd, is het zeer onwaarschijnlijk, dat kooloxyd daarin zal voorkomen.

Teneinde mijzelf te overtuigen, van de samenstelling van brongas, voornamelijk wat betreft het al of niet aanwezig zijn van waterstof en kooloxyd, werd nog eene nauwkeurige analyse daarvan verricht. De monsters werden genomen uit de gasleiding, die op het erf van den heer DE WIT te Woubrugge het bodemgas, op drie plaatsen verzameld, naar de gebouwen voert. Deze installatie dient sedert tien jaren voor de verlichting van de geheele boerderij. Den heer NIERMEIJER, die mij bij het nemen der monsters en de uitvoering der analyses de behulpzame hand bood, breng ik hier mijn oprechten dank.

In 20 liter ter plaatse geanalyseerd brongas, welke bij 160° door een buis met joodperoxyd gevoerd werden, werd $1^2/_3$ c.c. kooloxyd of onverz. koolwaterstoffen gevonden, waaruit volgt, dat deze gassen minder dan $^1/_{10000}$ van het volume innemen, hetgeen evenveel is als men in de atmospherische lucht te Delft kan aantoonen. Men kan dus zeggen, dat in dit brongas geen kooloxyd voorkwam. Evenmin kon bij de nauwkeurigste analyses, met behnlp van de boven beschreven palladiummethode, waterstof worden aangetoond. De samenstelling van het brongas was de volgende:

85,3 % CH_4
11,1 „ CO_2
3,6 „ N_2

Ook dit brongas bevatte dus slechts methaan als brandbaar gas; waterstof noch kooloxyd waren aanwezig.

HOOFDSTUK III.

Het verdwijnen van het methaan onder den invloed van het bacteriënleven. [1]) Besluit.

Als omzettingsprodukt van de anaërobe aantasting der celwandstoffen, van de gistingen der zeer algemeen in de natuur voorkomende vetzuren, van het proces der koolzuur-waterstofgisting en van andere biochemismen, tevens door de vulkanen ontwikkeld, moet een enorme hoeveelheid methaan voortdurend worden gevormd en in de atmospheer geraken. Sedert het organische leven op onze planeet mogelijk werd, moet er dus een geweldige hoeveelheid koolstof als methaan in den dampkring zijn gekomen. Het lag dus voor de hand te onderstellen, dat onze atmospheer een percentage van dat gas zou bevatten. Verschillende onderzoekers hebben zich, om dit uit te maken, met de analyses der gassen in bodem en dampkring bezig gehouden en uit hunne resultaten zien we, dat slechts zeer weinig methaan in de lucht aanwezig is, terwijl het in de bodemgassen nog niet is kunnen worden aangetoond (historisch overzicht, hoofdstuk I, § 2 en 3).

---

[1]) Dr. KASERER publiceerde eene korte mededeeling over de voeding van bacteriën door methaan. Zeitschrift f. landw. Vers. wes. Oest. p. 786—794 24 August. 1905.

Onafhankelijk van genoemden onderzoeker was door mij dit onderwerp reeds verder uitgewerkt.

N. L. SÖHNGEN. Over bacteriën welke methaan als koolstofvoedsel en energiebron kunnen gebruiken. Verslagen van de Koninklijke Academie van Wetenschappen. 1905 blz. 289.

«Methan as carbon-food and source of energy for bacteria». Proceedings 1905 p. 327.

«Ueber Bacteriën, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen». Centralbl. f. Bakt. 2e Abt. 1905 Bd. 15 S. 513.

Nemen we de op pag. 8 vermelde cijfers van den kundigen Franschen onderzoeker GAUTIER als juist aan, dan zou de atmospheer de volgende hoeveelheden methaan bevatten:

Parijsche lucht bevat per 100 l.	22,6 c.c.	CH_4
Boschlucht	11,3 „	CH_4
De lucht op hooge bergen . .	2,16 „	CH_4
Zeelucht	0,00—0,03 „	CH_4

In de zuivere atmospherische lucht is dus het methaangehalte zeer gering, terwijl in die der groote steden en bosschen een slechts weinig grootere hoeveelheid gevonden wordt.

Ongetwijfeld bestaan er dus processen, waarbij dit gas evenals de waterstof tot verdwijnen wordt gebracht. Tegen chemische invloeden is het zoo bestand, dat langs dezen weg zeker geen verdwijnen zal plaats hebben. Daar nu bij de oxydatie van methaan door zuurstof eene groote hoeveelheid energie vrijkomt, was het aannemelijk, dat zich organismen aan deze voedings- en energiebron hadden aangepast.

Reeds BOUSSINGAULT [1]) poogde de oorzaak van het verdwijnen van het methaan op te sporen; hij onderstelde, dat dit gas, evenals koolzuur, door de planten zou kunnen worden geassimileerd, en nam teneinde dit te bewijzen de proef, welke hij als volgt beschrijft.

„Dans un mélange formé de:

Acide carbonique	22,3 c.c.
Hydrogène protocarboné	61,1 c.c.
Total	83,4 c.c.

on a placé au soleil une feuille de laurier-cerise pesant 1,9 gr., surface 86 centimètres carrés.

	Gaz.	CO_2.	Oxygène.	Hydrog. carboné.
Avant l'exposition . . .	83,4 c.c.	22,3 c.c.	0,0 c.c.	61,1 c.c.
Après 5 heures d'exposition	83,5 „	2,5 „	19,9 „	61,1 „
Différences . . .	+0,1 c.c.	—19,8 c.c.	+19,9 c.c.	0,0 c.c.

Uit deze proefneming volgt, dat slechts koolzuur werd geassimileerd, geen methaan.

[1]) Chimie agricole T 4. 1868 pag. 300.

Ik ga nu over tot de beschrijving van mijn eigen proefnemingen. Het methaan, dat ik voor dit onderzoek gebruikte, was zoowel langs biologischen als langs chemischen weg bereid.

De gassen, ontwikkeld door kulturen met calciumformiaat, acetaat of butyraat, werden boven kaliloog opgevangen en aldus van het koolzuur bevrijd. Op deze wijze kon een aanzienlijke hoeveelheid verkregen worden; de produktie kon zonder veel omslag opgedreven worden tot 1 liter methaan per dag. Wel kan men langs chemischen weg zich in korten tijd een groote hoeveelheid maken, maar de biochemische methode heeft op dit voor, dat het verkregen methaan direkt als volkomen zuiver te beschouwen is.

Methaan, verkregen uit methyljodide met het zink-koperelement van GLADSTONE-TRIBE, moet, voor het gebruikt kan worden, zorgvuldig van het giftige phosphorwaterstof, dat er door de bereiding van het joodmethyl ingekomen is, ontdaan worden. Zulk chemisch zuiver methaan werd mij door Prof. HOOGEWERFF in ruime hoeveelheid verschaft, waarvoor ik hem hier mijn dank betuig.

Bij het onderzoek over dit onderwerp meende ik met waterplanten meer succes te zullen hebben dan met landplanten, daar het methaan vooral in de modder der wateren ontstaat en dus in het medium, dat deze planten omgeeft, in hoogere concentratie voorkomt dan in de lucht. De planten werden daartoe in omgekeerde met water gevulde kolven gebracht, welke met de hals in een bekerglas stonden en daarna met gelijke volumina methaan en zuurstof werden voorzien. De planten werden zoowel in het volle daglicht als in een donkere kamer geplaatst. De uitkomsten, welke deze proeven gaven, waren inderdaad verrassend.

Verschillende soorten van waterplanten als, Callitriche stagnalis, Potamogeton, Elodea canadensis, Batrachium, Hottonia palustris en Spirogyra, absorbeerden belangrijke hoeveelheden methaan.

Zoo verbruikte bijvoorbeeld Batrachium van 1—12 Mei 1905 328 c.c. methaan, Elodea canadensis in denzelfden tijd 280 c.c. Hottonia palustris van 7—21 Mei 500 c.c. Zeer snelle absorptie werd ook verkregen bij de proeven met Hydrocharis morsus

ranae (duitblad). Voor de absorptieproeven met deze plant werd een toestel gebruikt, dat uit eene WOULFF'SCHE flesch met twee halzen bestond; in de ééne hals was een gummistop met kraanbuis, in de andere een gummistop met glazen buis, welke tot den bodem reikte, aangebracht; deze glazen buis was twee keer rechthoekig omgebogen en kwam uit in eene kolf met water. In de WOULFF'SCHE flesch dreven op leidingwater met anorganische zouten eenige duitbladplantjes; door de buis met kraan was een mengsel van methaan en zuurstof 1 op 1 toegevoegd. In dit apparaat werden soms 80 c.c. methaan per dag verbruikt.

De bovengenoemde onderzoekingen leerden, dat de absorptie zoowel in het licht als in het donker plaats had, maar tevens bleek, dat het tijdsverloop voorafgaande aan het begin der absorptie zeer verschillend was bij verschillende proefnemingen met eenzelfde soort. Was het proces een keer begonnen dan verliep het ook met groote snelheid. Deze eigenaardige aanvangsperiode schreef ik eerst toe aan de aanwezigheid van de slijmige huid, welke de meeste waterplanten bedekt en welke de absorptie in meer of mindere mate zou belemmeren.

Daarom werden de planten zorgvuldig afgewasschen met leidingswater, alvorens ze voor de proef dienden. Door deze reiniging moest de absorptie dus bevorderd worden.

Tot mijne groote verwondering echter, duurde het nu veel langer voor er eene volumevermindering van het gasmengsel kon worden geconstateerd en zelfs bleef de absorptie soms geheel uit. Eene nauwkeurige beschouwing van de verschillende proeven bracht aan het licht, dat de methaanabsorptie slechts plaats had in die kulturen, waarin een slijmige bacteriënhuid de oppervlakte der vloeistof bedekte. Ontbrak deze, dan was juist de absorptie uitgebleven.

Het was dus bewezen, dat groene planten niet in staat zijn methaan te assymileeren, maar dat het absorptieproces moet plaats hebben onder den invloed eener bacteriënflora, welke met de planten was medegebracht.

Om nu dit proces nader te bestudeeren, werd een apparaat geconstrueerd, dat mij in staat stelde, de absorptie zoowel kwalitatief als ook kwantitatief te vervolgen. Dit toestel bestaat

uit twee ERLENMEIJER-kolven van ± 300 c.c. inhoud, beide voorzien van een dubbeldoorboorde caoutchouc-stop en verbonden door een tweemaal omgebogen glasbuis, die in beide kolven tot op den bodem reikt en in het midden voorzien is van een glaskraan. De eene kolf, waarin de kultuur plaats heeft draagt bovendien eene buis met glaskraan, die voor het inlaten van

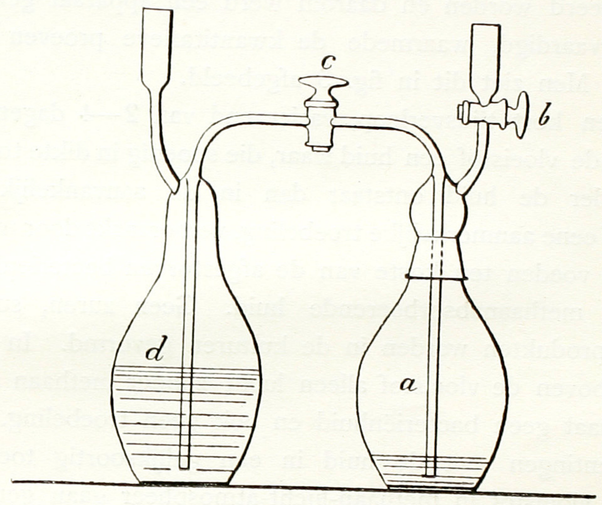


Fig. 5.

Toestel voor de kultuur in een atmospheer van methaan en lucht.

a. Kultuurkolf met opgeslepen glazen stop.
b. Kraan voor het inbrengen van gas.
c. Kraan, waarmede de verbinding tusschen het kultuurvat *a* en de overdrukkolf *d* tot stand gebracht kan worden.
d. Overdrukkolf.

het gasmengsel dient; op de andere kolf is een buisje met wattenprop aangebracht. Met dit apparaat werd nu als volgt gewerkt. Voor de ruwkultuur werd de eerstgenoemde kolf geheel gevuld met de volgende kultuurvloeistof: gedistilleerd water 100, K_2HPO_4 0,05, $MgNH_4PO_4$ 0,05, $CaSO_4$ 0,01 en geïnfecteerd met tuingrond, rioolwater of grachtwater, waarvan de twee laatstgenoemde materialen den snelsten groei gaven. Daarna werd door de toelaatkraan een bekend gasmengsel van

zuurstof en methaan ingebracht door middel van eene gasburet. De vloeistof werd daardoor naar de tweede kolf geperst en wanneer deze nu zoover gedaald was, dat nog een laag van 1 c.M. dikte in de eerste was overgebleven werd de middenkraan gesloten en vervolgens de toevoerkraan. Er werd gekultiveerd bij 30—34° C., bij welke temperatuur de snelste groei plaats had.

Deze toestellen met gummistoppen konden echter niet goed gesteriliseerd worden en daarom werd een apparaat geheel van glas vervaardigd, waarmede de kwantitatieve proeven zijn genomen. Men ziet dit in fig. 5 afgebeeld.

Na een kort tijdsverloop, varieerend van 2—4 dagen, neemt men op de vloeistof een huid waar, die spoedig in dikte toeneemt; ook onder de huid ontstaat dan in de aanvankelijk heldere vloeistof eene aanmerkelijke troebeling, veroorzaakt door mikroben, die zich voeden ten koste van de afgestorven bacterienlichamen uit de methaanabsorbeerende huid. Geen zuren, suikers of andere produkten werden in de kulturen gevormd. In de kolf, waarin boven de vloeistof alleen lucht zonder methaan aanwezig is, ontstaat geen bacteriënhuid en ook geen troebeling.

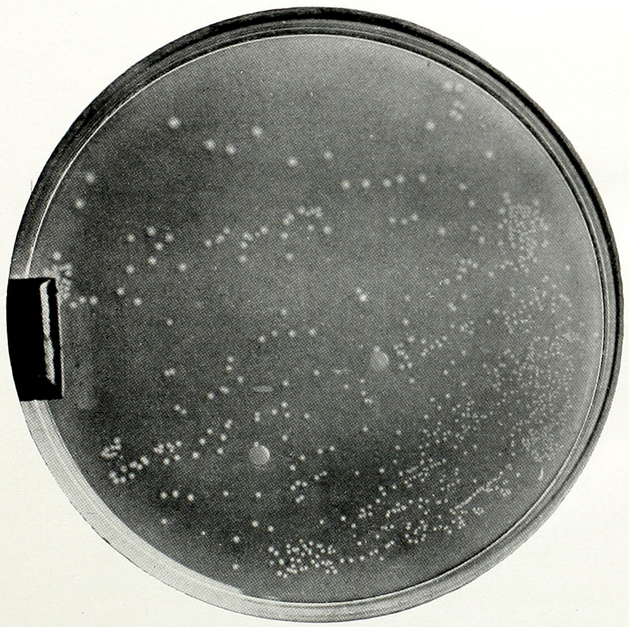
Overentingen van de huid in een gelijksoortig toestel met steriele vloeistof in methaan-lucht-atmospheer gaan gemakkelijk op gang.

Later werden ook met succes gewone glazen kolfjes als kultuurvaten gebruikt. Na van de noodige vloeistof te zijn voorzien werden zij gesloten met een wattenprop en gesteriliseerd; daarna geïnfecteerd. Nu werd de wattenprop diep in de hals geschoven en een gummistop met doorboring, waardoor een kraanbuis, op de kolf gezet. Door de kolf nu leeg te pompen kon daarna een gasmengsel van de vereischte samenstelling worden ingelaten. Hierna werd de stop met kraanbuis vervangen door een gewone gummistop en de kolf aldus in den thermostaat gezet.

Analyseert men het gasmengsel, nadat de proef b.v. een week heeft geduurd, dan vindt men, dat het methaan geheel of gedeeltelijk verdwenen en eene belangrijke hoeveelheid koolzuur gevormd is.

De bacterienhuid uit de ruwkulturen blijkt bij mikroskopisch onderzoek uit een groot aantal soorten te bestaan; ook monaden

BACILLUS METHANICUS. Vergrooting 770 ×. Opgenomen met homogene immersie 2 m.m. (HARTNACK) en projectieoculair 2 (ZEISS) op een orthochromatische plaat met gasgloeilicht en het ZETTNOW'sche lichtfilter. Praeparaat, verkregen door uitstrijken en kleuren met carbolgentianaviolet.



BACILLUS METHANICUS. Kolonienkultuur op uitgewasschen agar met zouten in een atmospheer van methaan en lucht. Op de helft der ware grootte.

en amöben hebben er zich krachtig in kunnen ontwikkelen; dit alles ten koste van methaan, dat toch de eenige koolstofbron in de kultuur is. Na eenige overentingen heeft zich vooral eene karakteristieke bacterie op den voorgrond gedrongen, die in de ruwe huid den vorm heeft van een kort dik staafje, lengte 4—5 μ, dikte 2—3 μ.

Het best brengt men deze bacterie in reinkultuur, door een weinig materiaal van de huid uit eene overenting uit te strijken op een uitgewasschen agar met anorganische zouten, die wordt gekultiveerd in een exsiccator, voorzien van een mengsel van 2 lucht en 1 methaan. Na eenige dagen verkrijgt men reine koloniën van deze onder den naam van Bacillus methanicus l.c. beschreven soort. De koloniën daarvan vallen door hun aantal en grootte onmiddellijk in het oog; zij zijn wit-troebel en zeer slijmig. Van eene koloniënkultuur op zulk een agar in eene methaan-lucht-atmospheer, is hiernaast eene photographie gegeven.

Wordt de bacterie op uitgewasschen agar met anorganische zouten, in gewone lucht, dus zonder methaan gekultiveerd, dan heeft geen groei plaats. Hierdoor is het bewijs geleverd, dat Bacillus methanicus in reinkultuur ten koste van methaan kan leven.

Door enting van zulk een zuivere kolonie in gesteriliseerde oplossing in methaanlucht-atmospheer, ontstaat na 5 tot 6 dagen een huid, welke echter nooit zoo dik wordt als die in de ruwkultuur of in de overentingen. Ook deze reinkultuur heeft den vorm van een kort dik staafje, omgeven door slijm; lengte 2—3 μ, dikte 1,5—2 μ; in de ruwkultuur zijn de afmetingen dus iets grooter. Meende ik aanvankelijk, dat deze bacterie in jonge kulturen beweeglijk was, later heb ik dit niet kunnen bevestigen. Sporenvorming kon niet opgemerkt worden, terwijl bij $\pm$ 60° C. de doodingstemperatuur ligt. Met de gewone kleuringsmethoden laat B. methanicus zich gemakkelijk kleuren; volgens GRAM was hij niet kleurbaar. Nevenstaand photogram, werd vervaardigd naar een praeparaat, gekleurd met carbol-gentianaviolet.

Den heer JACOBSEN, assistent aan het Mikrobiologisch Laboratorium, die mij bij het vervaardigen der mikrophotographieën behulpzaam was, breng ik hier mijn welgemeenden dank.

Bacillus methanicus ontwikkelt zich ook zeer goed op en in andere voedingsbodems; deze kunnen b.v. bestaan uit: moutextract, vleeschwater, pepton, asparagine met anorganische zouten, malaat, lactaat, citraat, succinaat, alle eveneens met zouten; verder in oplossingen van suikers, als: glucose, rietsuiker en melksuiker met de noodige anorganische zouten. Zeer slecht is de ontwikkeling in oplossingen, welke acetaat of formiaat bevatten. Oplossingen van vleeschwaterglucose of moutextract worden niet vergist.

Aanvankelijk bestond de meening, dat slechts één soort de eigenschap heeft methaan te kunnen verbruiken; de verdere studie echter van dit onderwerp toonde aan, dat ook andere hiertoe in staat zijn. Zoo was Bacillus pyocyanëus bij al mijne onderzoekingen een constante begeleider van B. methanicus, hetgeen blijkt bij het uitzaaien der huid op vleeschagar of duinagar met 1 % calciumlactaat en anorganische zouten. Deze bacterie kwam in de kulturen der methaanabsorptie zoo regelmatig voor, dat deze proef tevens eene uitstekende ophoopingsmethode is voor B. pyocyanëus. Ook bleek dat deze mikrobe, hoewel in zwakke mate, methaan als koolstof- en energiebron kan gebruiken. Hetzelfde kan gezegd worden van de groep der Fluorescenten en van eenige representanten der Aërobaktergroep.

Aan deze feiten is het zeker toe te schrijven, dat het bacteriënmengsel in de overentingen betrekkelijk zoo gecompliceerd blijft en dat daardoor de isolatie van B. methanicus somtijds moeilijkheden oplevert, maar tevens is bewezen, dat het verdwijnen van het methaan door verschillende mikroben tot stand komt.

Ook in de zee komt een methaanoxydeerende bacterie voor, welke in alle eigenschappen met den Bacillus methanicus overeenstemt. Overentingen van B. methanicus in kulturen met zeewater gaan evengoed op gang als overentingen van den zeemethanicus in kulturen met zoetwater. Daar geen verschil tusschen de beide mikroben kon worden waargenomen, is het zeer waarschijnlijk, dat we slechts met één soort te doen hebben.

Door de volgende kwantitatieve proefneming, die betrekking

heeft op de oxydatie van methaan door Bacillus methanicus, kan men een inzicht verkrijgen in de verhouding tusschen de hoeveelheid koolstof, welke als energiebron en die, welke als voedsel door de bacteriën wordt verbruikt.

Van 1—14 Mei 1906 werden aan eene kultuur van de ruwe methanicushuid, in een toestel, voorgesteld door fig. 5, successievelijk 293 c.c. methaan en 280,5 c.c. zuurstof toegevoegd.

Den 16den Mei waren nog 321 c.c. gas in den toestel aanwezig, bestaande uit:

117,5 c.c. CO_2
161 c.c. CH_4
42.5 c.c. O_2.

Deze bepaling was als volgt geschied. Door middel van een kwikburet werd eene hoeveelheid van 65,4 c.c. gasmengsel uit het apparaat gezogen, dat op ± 90° was verwarmd; van dit gasmengsel bedroeg de samenstelling:

23,9 c.c. CO_2
32,8 c.c. CH_4
8.7 c.c. O_2.

zoodat in de 321 c.c. van het mengsel de genoemde hoeveelheden voorkwamen.

Door oxydatie van de bacteriënmassa in de genoemde kultuurvloeistof met chroomzuur, en door opvangen en wegen van het gevormde koolzuur in een koolzuurapparaatje, kon de hoeveelheid koolstof worden bepaald, welke in de mikrobenlichamen was vastgelegd. Hierbij werd de volgende uitkomst verkregen:

Gewicht koolzuurapparaatje na de proef = 37,2540 gram.
" " voor " " = 37,2245 gram.
Gewicht koolzuur = 0,0295 gram.

zoodat $\frac{29,5}{44} \times 12 = 8$ m.G. koolstof in het bacteriënmateriaal aanwezig zijn. 293 — 161 = 132 c.c. methaan zijn verbruikt, waarin 71 m.g. koolstof voorkomen, zoodat 11 % van

de koolstof als voedsel en 89 % als energiebron gediend hebben.

De energie, welke bij dit proces zou kunnen vrijkomen, beantwoordt aan de verbrandingsformule van methaan,

$$CH_4 + 2\,O_2 = CO_2 + 2\,H_2O.$$
$$-18{,}9 - 0 = -95 - 2 \times 69 + 224{,}1,$$

waarbij dus 224,1 Caloriën zouden vrijkomen.

Verscheidene proeven werden genomen, teneinde na te gaan of methaan als oxydeerbare, organische stof tot sulfaatreductie aanleiding kan geven. Daartoe werd op de wijze geëxperimenteerd als bij de gewone methaankulturen, nu echter bestond de atmospheer in den toestel slechts uit methaan alleen, terwijl aan de kultuurvloeistof nog 0,5 % calciumsulfaat was toegevoegd.

Bij geen van deze proefnemingen onstond zwavelwaterstof, zoodat geen sulfaat was gereduceerd.

Evenmin is methaan geschikt voor denitrificatie, noch dit gas alleen, noch met weinig lucht gemengd, veroorzaakte in de toestellen eene ontleding van het aan de kultuurvloeistof toegevoegde kaliumnitraat.

Methaan kan dus slechts onder aërobe omstandigheden als koolstof- en energiebron dienen en is dan in staat eene rijke bacteriënflora te onderhouden. Deze mikroben, die wel overal zullen voorkomen, kunnen dus blijkbaar ook tot de oxydatie van het in de atmospheer aanwezige methaan aanleiding geven.

Waarmede het geringe gehalte aan dit gas in onzen dampkring verklaard schijnt.

BESLUIT.

De uitkomsten van dit onderzoek kunnen als volgt worden samengevat:

1. Calciumbutyraat vergist kwantitatief tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat:
$$C_8H_{14}O_4Ca + 3\,H_2O = 5\,CH_4 + 2\,CO_2 + Ca\,CO_3.$$
2. Calciumformiaat kan kwantitatief tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat vergisten:
$$2\,C_2H_2O_4Ca = CH_4 + CO_2 + 2\,CaCO_3.$$
3. Zouten van de vetzuren met een even aantal koolstofatomen vergisten tot methaan, koolzuur en calciumcarbonaat; zouten van die met een oneven aantal niet.
4. Eiwitten en suikers kunnen tot methaan en koolzuur vergisten.
5. In de gistingen van de vetzure zouten kan waterstofabsorptie plaats hebben.
6. Waterstof en koolzuur vergisten tot methaan en water, waarbij blijkbaar de chemische energie van de waterstof voor de koolzuurreductie dient:
$$4\,H_2 + CO_2 = CH_4 + 2\,H_2O.$$
7. De mikroben, betrokken bij de processen onder 1—6 genoemd, zijn eene sarcine en eene staafbakterie en dezelfde, welke de methaangisting uit acetaat bewerkstelligen.
8. In de kulturen der cellulose-methaangisting kan waterstofabsorptie plaats hebben.
9. Het methaan kan als energie- en koolstofbron voor verschillende mikrobensoorten dienen. De oxydatie, welke daarbij plaats heeft, verloopt volgens de formule:
$$CH_4 + 2\,O_2 = CO_2 + 2\,H_2O.$$

STELLINGEN.

I.

De Algemeene Mikrobiologie is als tak van wetenschap niet minder belangrijk dan de Bacteriologie der pathogene mikro-organismen.

II.

De tegenwerpingen door Koenigs (Journal f. prakt. Chem. Afl. no. 2 1906) gemaakt tegen de door Miethe en Book voor de cyaninen opgestelde constitutieformule (Ber. d. D. Chem. Gesell. 1904) verdienen alle aandacht.

III.

Het is zelfs niet uitgemaakt of de door Spalteholz voor het aethylrood en door Miethe en Book voor het iso amyl-cyanine gekozen moleculairformules C_{23} H_{25} N_2 I en C_{29} H_{37} N_2 I moeten worden aangenomen, dan wel of de waterstofarmere formules, welke Hoogewerff en Van Dorp uit hunne onderzoekingen afleidden niet de juiste zijn. Recueil des travaux Chimiques de Pays Bas 1, 2 en 3. Nader onderzoek is gewenscht.

IV.

Bij de fabriekmatige vlasroting, zooals die op grond zijner wetenschappelijke onderzoekingen, door Professor Beijerinck is voorgeslagen (Verslagen der Koninkl. Acad. Dl. 12 1904) kan het beginsel van den tegenstroom met vrucht worden toegepast.

V.

Men mag niet als bewezen aannemen, dat groote hoeveelheden waterstof zich in de hoogere lagen der atmosfeer bevinden.

VI.

De cholera-roodreactie wordt nog steeds, in navolging van Petri en Salkowski ten onrechte verklaard uit de aanwezigheid van nitriet, ontstaan door reductie van oorspronkelijk in den voedingsbodem voorhanden nitraat. Het is waarschijnlijk, dat de kleurstof, welke in de cholera-kulturen uit pepton ontstaat, geen nitroso-indol is.

VII.

De splitsing van ureum dient bij de ureum-bakteriën uitsluitend als energiebron; voor den opbouw van de mikrobenlichamen worden andere koolstofverbindingen gebruikt.

VIII.

Of bij de biologische reiniging van afvalwater moet worden gebruik gemaakt van een septictank of wel, dat men zal kunnen volstaan met de toepassing van oxydatiebedden alleen, moet in ieder speciaal geval worden bepaald door den aard en den toevoer van het te reinigen afvalwater.

IX.

Bij zorgvuldige keuze van de plaats der prise d'eau, een goede „zandfiltratie" en een geregelde bacteriologische contrôle, kan rivierwater voor watervoorziening van steden met goed gevolg worden gebruikt.

X.

Bij de gebruikelijke methoden der gasanalyse (volgens Bunsen en Hempel) bereiken de uitkomsten geen grootere nauwkeurigheid dan van $^1/_5$ volume procent. De resultaten daarvan moeten dan ook niet verder dan tot in de 1e decimaal worden opgegeven.

XI.

Het verdwijnen van de cellulose in het darmkanaal van herkauwers kan slechts voor een gering deel aan de werking van mikroben worden toegeschreven.

XII.

Het produkt van de ringspinbank is minderwaardiger dan dat van den self-actor. Als werktuig voor de massa produktie bezit de ringspinbank echter groote voordeelen boven laatstgenoemde machine.