

ONDERZOEKINGEN OVER DE METHAANGISTING

25-3-47

ONDERZOEKINGEN OVER DE METHAANGISTING

PROEFSCHRIFT, TER VERKRIJGING
VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN
DE TECHNISCHE WETENSCHAP AAN
DE TECHNISCHE HOOGESCHOOL TE
DELFT, KRACHTENS ARTIKEL 2 VAN
HET KONINKLIJK BESLUIT VAN 16
SEPTEMBER 1927, STAATSBLED No.
310 EN OP GEZAG VAN DEN WND.
RECTOR MAGNIFICUS IR. J. A.
GRUTTERINK, HOOGLEERAAR IN DE
AFDEELING DER MIJNBOWWKUNDE,
VOOR EEN COMMISSIE UIT DEN
SENAAT TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 26 MAART 1947, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

Charles Gerardus Theodorus Petrus Schnellen

GEBOREN TE ROTTERDAM



1012842.
DRUKKERIJ „DE MAASSTAD" — ROTTERDAM

DIT PROEFSCHRIFT IS GOEDGEKEURD DOOR DEN PROMOTOR
PROF. DR. IR. A. J. KLUYVER

AAN MIJN VROUW
AAN MIJN VADER
AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN MOEDER

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	11

HOOFDSTUK I.

Beknopt overzicht van onze kennis van de methaangisting en van de daarbij werkzame bacteriën	17
§ 1. Algemeen overzicht van de methaangisting en haar verwekkers	17
§ 2. Het inzicht in het chemisme der methaangisting	23
§ 3. De methaanvorming uit verbindingen met één koolstofatoom	34

HOOFDSTUK II.

Proefnemingen met gezuiverde cultures ter staving van de koolzuurreductie-theorie der methaangisting . . .	45
§ 1. Inleiding	45
§ 2. Ophooping en reiniging van een propylalcoholvergistende methaانبacterie	45
§ 3. De kwalitatieve analyse van de producten der propylalcoholvergisting	46
§ 4. De kwantitatieve analyse van de methaangisting van propylalcohol in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat	48
§ 5. Ophooping en reiniging van een isopropylalcoholvergistende methaانبacterie	53
§ 6. De kwalitatieve analyse van de producten der isopropylalcoholvergisting	54
§ 7. De kwantitatieve analyse van de methaangisting van isopropylalcohol	55
§ 8. Samenvatting	58

HOOFDSTUK III.

De isolatie en de belangrijkste eigenschappen der gebruikte reincultures	59
§ 1. <i>Methanobacterium Omelianskii</i> Barker . . .	59
§ 2. Ophooping van mesophile en thermophile methylalcoholvergistende methaanbacteriën . .	60
§ 3. Reincultiveering en belangrijkste eigenschappen van <i>Methanosarcina Barkerii</i>	63
§ 4. Kwantitatieve proefnemingen over de vergisting van de door <i>Methanosarcina Barkerii</i> aantastbare substraten	74
§ 5. Eenige milieufactoren, welke den groei van <i>Ms. Barkerii</i> beïnvloeden	82
§ 6. Reincultiveering en de belangrijkste eigenschappen van <i>Methanobacterium formicicum</i> nov. spec.	83

HOOFDSTUK IV.

De reductie van koolzuur met gasvormige waterstof tot methaan met behulp van reincultures van methaanbacteriën	87
§ 1. Beschrijving der toegepaste methodiek . . .	87
§ 2. Proefnemingen met <i>Methanosarcina Barkerii</i> .	88
§ 3. Proefnemingen met <i>Methanobacterium Omelianskii</i>	92
§ 4. Proefnemingen met <i>Methanobacterium formicicum</i>	94
§ 5. Samenvatting	96

HOOFDSTUK V.

Onderzoek naar de vervangbaarheid van het koolzuur als waterstofacceptor bij de methaangisting door andere verbindingen met één koolstofatoom	98
§ 1. Inleidende opmerkingen	98

§ 2. Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door mierenzuur	99
§ 3. Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door formaldehyde	101
§ 4. Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door methylalcohol	102
§ 5. Samenvatting	102

HOOFDSTUK VI.

De anaërobe verwerking van zuiver koolmonoxyde door ruwcultures	106
§ 1. Inleiding	106
§ 2. Koolmonoxyde-omzetting zonder vorming van methaan	108
§ 3. Koolmonoxyde-omzetting met vorming van methaan	112
§ 4. Samenvatting	114

HOOFDSTUK VII.

De verwerking van koolmonoxyde door reincultures van methaanbacteriën, al dan niet bij aanwezigheid van gasvormige waterstof	116
§ 1. Inleiding	116
§ 2. Proefnemingen met <i>Methanosarcina Barkerii</i> .	116
§ 3. Proefnemingen met <i>Methanobacterium formi-</i> <i>cicum</i>	122
§ 4. Proefnemingen met <i>Methanobacterium Ome-</i> <i>lianskii</i>	125
§ 5. Samenvatting	126

SAMENVATTING	128
SUMMARY	133

INLEIDING.

Het eerste proefschrift, dat aan de Technische Hoogeschool te Delft werd verdedigd, was van de hand van N. L. S ö h n g e n¹⁾ en droeg tot titel: „Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder den invloed van het organische leven”.

In dit geschrift heeft de latere hoogleeraar in de microbiologie aan de Landbouwhoogeschool te Wageningen o.m. de resultaten neergelegd van zijn fundamenteel belangrijke onderzoekingen over die gistingsprocessen, welke door een ontwikkeling van methaan zijn gekenmerkt.

Een van de belangrijkste door S ö h n g e n verrichte waarnemingen was, dat de bacteriën van de methaangisting der vetzure zouten in staat waren methaan te produceeren, wanneer zij in contact werden gebracht met een gasatmosfeer bestaande uit koolzuur en waterstof. Dit resultaat werd het uitgangspunt voor de dertig jaren later door den hoogleeraar aan Stanford University C. B. v a n N i e l opgestelde hypothese, volgens welke het bij de gistingen gevormde methaan ten allen tijde zou ontstaan door hydrogenatie van het in de gistingsmedia steeds aanwezige koolzuur, gekoppeld aan een gelijktijdige dehydrogenatie der organische gistingssubstraten.

Deze hypothese diende als basis voor de in 1935 en 1936 door B a r k e r²⁾ in het Laboratorium voor Microbiologie te Delft verrichte onderzoekingen.

Hierbij stelde B a r k e r zich tot taak het experimenteele bewijs voor de juistheid van de door v a n N i e l aangaande het wezen der methaangisting ontworpen voorstelling te leveren en hij is hierin ook op afdoende wijze geslaagd.

Hij onderwierp aethylalcohol in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat aan een methaangisting en constateerde nu het opmerkelijke feit, dat in de eerste phase van deze gisting een aan de ontweken hoeveelheid methaan aequivalente hoeveelheid koolzuur aan het medium werd onttrokken, terwijl tegelijkertijd de aethylalcohol werd gedehydrogeneerd tot azijnzuur!

Bovendien slaagde B a r k e r er in, om dank zij een juist gekozen isolatietechniek, als eerste onderzoeker in het bezit te komen van reincultures van methaanproduceerende organismen.

¹⁾ De promotie vond plaats op 6 Juli 1906; het proefschrift was gedrukt bij J. Vis Jr. te Delft. Men zie ook de samenvattende bewerking van het proefschrift in: *Recueil d. Trav. Chim.* 29, 238, 1910.

²⁾ H. A. B a r k e r, *Arch. f. Mikrobiol.* 7, 404, 1936.

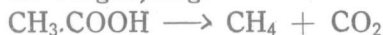
Echter dient te worden opgemerkt, dat de experimenten, waarbij de koolzuurreductie werd bewezen, niet werden uitgevoerd met deze reincultures, maar met weliswaar ver gezuiverde ruwcultures, zoodat de volledige zekerheid, dat de methaan-organismen alleen deze reductie volvoerden, nog niet was verkregen.

Hoezeer ook Barker's uitkomsten ten gunste van deze zienswijze schenen te spreken, toch was te dien opzichte in het bijzonder voorzichtigheid geboden op grond van de belangwekkende resultaten, welke eveneens in het jaar 1936 door Wieringa¹⁾ werden gepubliceerd.

Deze onderzoeker verrichtte een nadere studie van de hierboven reeds genoemde waarneming van S ö h n g e n betreffende het verdwijnen van koolzuur en waterstof, wanneer een mengsel van deze gassen in contact werd gebracht met een ruwcultuur van methaanproduceerende bacteriën. Bij een uitbreiding van deze proefnemingen, waarbij ditmaal de ruwcultures rechtstreeks door ophooping met het koolzuur-waterstof mengsel werden verkregen, kwam Wieringa tot onverwachte en belangrijke uitkomsten. Het bleek hem in de eerste plaats, dat in de verkregen ruwcultures een anaërobe sporevormende staafvormige bacterie, door hem *Clostridium aceticum* genoemd, aanwezig was, welke verantwoordelijk was voor de primaire omzetting van de gascomponenten. Deze omzetting bleek nu merkwaardigerwijze te leiden tot de vorming van azijnzuur volgens de vergelijking:



De naast deze *Cl. aceticum* in de ruwcultures voorkomende methaanbacteriën zouden dan het gevormde azijnzuur wederom ontleden volgens de vergelijking:



Het zal duidelijk zijn, dat door deze waarnemingen van Wieringa het plotseling weer onzeker werd, of de methaanproduceerende bacteriën zelve wel tot het proces der koolzuurreductie in staat waren, hetzij dan met gasvormige waterstof (S ö h n g e n), hetzij dan met organische waterstofdonatoren (Barker).

Met het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd in 1938 aangevangen. Het is begrijpelijk, dat de doelstelling daarvan geheel bepaald werd door den stand van onze kennis aangaande de methaangisting te dien tijde.

Dit leidde er toe, dat in de eerste plaats het verlangen aanwezig was de door Barker uitgewerkte methode voor de verkrijging van reincultures van methaanbacteriën te leeren

¹⁾ K. T. Wieringa, Antonie van Leeuwenhoek 3, 1, 1936.

beheerschen, teneinde ook persoonlijk met de eigenschappen dezer zoo merkwaardige bacteriën vertrouwd te geraken. Een en ander uiteraard mede in de hoop onze kennis der door Barker beschreven bacteriën te kunnen vermeederen, respectievelijk te komen tot de isolatie van nog onbekende soorten.

Hiernaast bestond toentertijd nog de behoefte nadere bewijzen bijeen te brengen voor de juistheid van Barker's theorie der koolzuurreductie, eenerzijds door uitbreiding van diens proefnemingen met ver gezuiverde ruwcultures tot andere organische substraten, anderzijds — en dit in het bijzonder met het oog op Wieringa's bovenvermelde resultaten — door vast te stellen, dat inderdaad ook reincultures der methaanbacteriën tot methaanvorming uit koolzuur in staat zijn.

Hierbij kwam dan nog het volgende.

Barker's voorstelling van de vorming van methaan uit koolzuur impliceert, dat bij deze reductie niet minder dan 8 waterstofatomen in actie moeten komen. Op het eerste gezicht lijkt het aannemelijk te veronderstellen, dat een dergelijke reductie trapsgewijze zal verlopen, of met andere woorden, dat intermediair in het proces der methaanvorming lagere reductietrappen van het koolzuur — waarbij men dan zou kunnen denken aan verbindingen als mierenzuur, formaldehyde en methylalcohol — zullen ontstaan. Weliswaar waren dergelijke verbindingen tot dusver onder de gistingproducten nimmer aangetroffen, maar anderzijds bleef het uiteraard volkomen denkbaar, dat dergelijke onvolledige reductietrappen bij toevoeging aan de gistingsmedia in staat zouden blijken, bij het gistingproces de rol van het koolzuur als waterstof-acceptor over te nemen.

Deze overweging leidde er toe het gedrag der methaanbacteriën ten opzichte van verschillende verbindingen met één koolstofatoom, al dan niet in tegenwoordigheid van voor de methaangisting deugdelijk gebleken gistingssubstraten, nader in beschouwing te nemen.

Hiertoe bestond des te meer aanleiding, omdat in 1933 door Stephenson en Stickland¹⁾ een opmerkelijke verhandeling was gepubliceerd, waarin deze onderzoekers mededeelen uit een ruwcultuur in een natriumformiaat-medium een ééncelcultuur te hebben geïsoleerd van een bacterie, welke formiaten onder methaanvorming vergist. Voor deze bacterie stelden genoemde onderzoekers voorts vast, dat zij het vermogen bezat om in een waterstofatmosfeer zoowel koolzuur, als mierenzuur, koolmonoxyde, formaldehyde (in den vorm van hexamethyleentetramine), als ook methylalcohol tot methaan te reduceeren. Daarentegen was het organisme niet in staat talrijke onderzoch-

¹⁾ M. Stephenson and L. H. Stickland, *Biochem. Journ.* 27, 1517, 1933.

te organische verbindingen met meer dan één koolstofatoom te reduceeren.

Het leek nu in hooge mate gewenscht het geheele probleem van de omzetting der verbindingen met één koolstofatoom in methaan in het licht der voorafgaande beschouwingen opnieuw te bezien.

Onder de genoemde categorie van verbindingen, was er nu bovendien één, welke om een gansch andere reden de bijzondere aandacht vroeg. Dit was het koolmonoxyde, waarvoor door Lieske, Fischer en medewerkers in de jaren 1930-1935 in een reeks van verhandelingen was vastgesteld, dat dit gas bij mede-aanwezigheid van waterstof door ruwcultures afkomstig uit slijk eener anaërobe afvalwatervergisting („Emscherbrunnen“) in methaan werd omgezet.¹⁾

Deze waarneming had in dien tijd in belangrijke mate de belangstelling van verschillende lichtgasdeskundigen getrokken, aangezien men hierin een economisch bruikbaar middel hoopte te vinden om het lichtgas met practisch behoud van zijn calorische waarde van het zoo vergiftige koolmonoxyde te bevrijden.²⁾

Aangezien de op de koolmonoxyde-verwerking betrekking hebbende proefnemingen tot dusver alle slechts met mengcultures waren verricht, leek het van veel belang het aandeel der methaانبacteriën in deze omzettingen met behulp van rein-cultures dezer bacteriën nader vast te stellen.

In de hierachter volgende bladzijden wordt nu verslag uitgebracht over de door mij bij de uitwerking van het in het voorafgaande geschetste arbeidsprogramma verkregen resultaten. De desbetreffende proefnemingen zijn alle in de periode van Januari 1938 tot October 1941 verricht.

De ingetreden oorlogstoestand heeft uiteraard het tempo van het onderzoek in hoogst ongunstige wijze beïnvloed, doch wat erger is, deze toestand heeft er toe geleid, dat de publicatie der bereikte resultaten tot na de terugkeer der normale omstandigheden moest worden verschoven.

Het is onvermijdelijk, dat door een en ander althans een deel der verrichte waarnemingen in belangrijke mate aan actualiteit heeft ingeboet. In het bijzonder is in de Vereenigde Staten het wetenschappelijke onderzoek ook gedurende de oorlogsjaren nog op vrij groote schaal voortgezet, waarbij ten deele van nieuwe methodieken is gebruik gemaakt. Dientengevolge zijn sommige van de door mij verkregen uitkomsten aldaar reeds eerder gepubliceerd.

Om deze reden hebben in het bijzonder mijn waarnemingen,

¹⁾ Men zie hiervoor het literatuuroverzicht in Hoofdstuk I.

²⁾ Men zie hiervoor bijv.: F. Schuster, Stadtgas-Entgiftung, Leipzig, 1935.

welke er op waren gericht de koolzuurreductietheorie te bevestigen, aan beteekenis verloren.

Eenerzijds heeft B a r k e r¹⁾ inmiddels reeds het onaantastbare bewijs gepubliceerd, dat inderdaad ook reincultures van methaanbacteriën tot koolzuurreductie in staat zijn. B a r k e r bewees dit zoowel voor de door hem geïsoleerde *Methanobacterium Omelianskii* als ook voor de, door mij aan hem toegezonden reincultuur van *Methanosarcina Barkerii*.

Hierbij komt dan nog het volgende. Ten tijde dat B a r k e r het zoo algemeene karakter van het koolzuurverwerkend vermogen van de methaanbacteriën vaststelde, was dit nog een zeer uitzonderlijk resultaat. Het was op dat oogenblik nog de algemeen gangbare opvatting, dat de stofwisseling der kleurlooze heterotrophe cellen leidde tot een productie van koolzuur, dat dan voor die cellen een onaantastbaar eindproduct vormde. Slechts door de photochemische koolzuurassimilatie der chlorophylhoudende cellen — afgezien van het zoo speciale geval der chemo-autotrophe bacteriën — zou een terugvorming van organische stof, d.w.z. een vorming van gereduceerde koolstofverbindingen, worden bewerkt.

Onmiddellijk voorafgaande aan de publicatie van B a r k e r's resultaten verschenen evenwel twee verhandelingen, welke eveneens het bewijs leverden, dat deze zienswijze correctie behoeft.

In de eerste verhandeling toonde W o o d s²⁾ aan, dat ook een zoo vulgaire heterotrophe bacterie als *Bacterium coli* in staat is koolzuur in haar stofwisseling te betrekken, zij het dan ook, dat dit alleen werd vastgesteld voor het speciale geval, dat naast koolzuur gasvormige waterstof aanwezig is, waarbij dan de genoemde bacterie uit dit gasmengsel mierenzuur vermag te synthetiseeren.

Veel schokkender was intusschen de inhoud van een artikel van W o o d e n W e r k m a n³⁾, waarin werd vastgesteld, dat de zoo bij uitstek heterotrophe propionzuurbacterie *Propionibacterium pentosaceum* bij de vergisting van glycerine een vrij aanmerkelijke hoeveelheid koolzuur uit het medium opnam. Aan gezien voorts de bij de gisting gevormde hoeveelheid barnsteen zuur bij benadering equivalent bleek te zijn aan de hoeveelheid opgenomen koolzuur lag de conclusie voor de hand, dat de koolstof uit dit gas bij de vorming van een nieuwe C—C-binding was betrokken.

Sindsdien is het onomstootelijke bewijs voor de juistheid van deze zienswijze geleverd door de betreffende gisting te doen

¹⁾ H. A. Barker, S. Ruben and M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. 26, 426, 1940; H. A. Barker, Journ. of Biol. Chem. 137, 153, 1941.

²⁾ D. D. Woods, Biochem. Journ. 30, 515, 1936.

³⁾ H. G. Wood and C. H. Werkman, Biochem. Journ. 30, 48, 1936.

verloopen in tegenwoordigheid van koolzuur, waarin een koolstofisotoop aanwezig was. Eenerzijds geschieden deze proefnemingen door Carson, Ruben, Foster en Barker¹⁾ onder gebruikmaking van het radioactieve C^{11} -isotoop, anderzijds door Wood, Werkman, Hemingway en Nier²⁾ onder toepassing van het stabiele C^{13} -isotoop.

Evenwel is het hierbij niet gebleven. Met behulp van de hier genoemde koolstof-isotopen is het in latere jaren mogelijk gebleken met zekerheid vast te stellen, dat dit vermogen om koolzuur in de stofwisseling — ten deele ook in de synthese der celbestanddeelen — te betrekken, een eigenschap is, welke zeer algemeen toekomt aan heterotrophe cellen van de meest uiteenlopende soort, zoowel plantaardige als dierlijke.

Het is hier niet de plaats om op al deze onderzoeken nader in te gaan, hiervoor kan bijv. naar een recente samenvatting van Kluyster³⁾ worden verwezen.

Er moge mede worden volstaan er op te wijzen, dat de vaststelling van het koolzuurverwerkend vermogen der methaانبacteriën, dat ten tijde van Barker's eerste publicatie nog een min of meer revolutionnair karakter droeg, heden ten dage een groot deel van haar opmerkelijkheid heeft verloren.

Dit alles neemt niet weg, dat ook de in dit proefschrift medegedeelde waarnemingen omtrent de koolzuurverwerking der methaانبacteriën in zooverre haar waarde behouden, dat zij er op sommige punten toe bijdragen ons inzicht in de zoo merkwaardige stofwisseling van enkele vertegenwoordigers der bewuste groep af te ronden.

¹⁾ S. F. Carson and S. Ruben, Proc. Nat. Acad. Sci. **26**, 422, 1940; S. F. Carson, J. W. Foster, S. Ruben and H. A. Barker, Proc. Nat. Acad. Sci. **27**, 229, 1941.

²⁾ H. G. Wood, C. H. Werkman, A. Hemingway and A. O. Nier, Journ. of Biol. Chem. **135**, 789, 1940.

³⁾ A. J. Kluyster, Chem. Weekbl. **43**, 1947.

HOOFDSTUK I.

BEKNOPT OVERZICHT VAN ONZE KENNIS VAN DE METHAANGISTING EN VAN DE DAARBIJ WERKZAME BACTERIËN.

§ 1. *Algemeen overzicht van de methaangisting en haar verwekkers.*

In zijn proefschrift geeft Söhnngen¹⁾ een uitvoerig „geschiedkundig overzicht” over de tot het jaar 1906 verrichte onderzoekingen over die anaërobe gistingsprocessen, welke gepaard gaan met de ontwikkeling van methaan. Voor deze onderzoekingen wordt dan ook naar dit literatuuroverzicht verwezen.

Wat het onderzoek door Söhnngen zelf verricht betreft, dit kan gezien worden als een uitbreiding meer in het bijzonder van het werk van Hoppe-Seyler²⁾ en dat van Omelianski³⁾. Eerstgenoemde bestudeerde reeds in 1886 uitvoerig de methaangisting van calciumacetaat. Hij was daarmede tevens de eerste onderzoeker, die de microbiologische vorming van methaan bij de anaërobe aantasting van organische substraten aan een eenvoudige organische verbinding toetste. Als resultaat constateerde hij, dat kennelijk azijnzuur onder deze voorwaarden kwantitatief wordt gesplitst in koolzuur en methaan. Omelianski concentreerde zijn aandacht hoofdzakelijk op de vergisting van cellulose, waarbij veelal ook belangrijke hoeveelheden methaan worden gevormd.

Opgemerkt moet worden, dat Mazé⁴⁾ in 1903 eveneens eenvoudige organische verbindingen op haar geschiktheid voor methaangisting onderzocht en wel entte hij het sediment van een gistende cultuur van boombladeren in een medium, waarin kaliumacetaat en natriumbutyraat aanwezig waren. Hij constateerde hieruit wederom de ontwikkeling van methaan en koolzuur.

Een van de door Söhnngen bereikte uitkomsten was de demonstratie, dat zeer uiteenlopende verbindingen als substraat

¹⁾ N. L. Söhnngen, Diss. Delft 1906.

²⁾ F. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. physiol. Chem. **10**, 201 en 401, 1886; Ibid, **11**, 561, 1887.

³⁾ Voor een overzicht van Omelianski's werk zij verwezen naar diens samenvattende verhandeling in: F. Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. III, 245, 1904—1906.

⁴⁾ P. Mazé, Compt. rend. Acad. Sciences **137**, 887, 1903.

voor een methaangisting kunnen dienst doen. Sö h n g e n bewees dit onder meer voor de zouten van verschillende vetzuren, zooals formiaten, acetaten, butyraten, en capron-, capryl- en caprinezure zouten, maar voorts ook voor koolhydraten: cellulose, zetmeel en verschillende suikers en tenslotte ook voor eiwitstoffen. Hierbij moet evenwel in het oog worden gehouden, dat Sö h n g e n niet met reïncultures der methaanproduceerende organismen werkte, zoodat het geenszins is uitgesloten, dat de in verschillende dezer gevallen geconstateerde methaanproductie een gevolg was van het feit, dat begeleidende organismen de bewuste samengestelde substraten tot eenvoudiger verbindingen hebben afgebroken, waarna dan eerst deze laatste de eigenlijke methaangisting hebben ondergaan.

Ook O m e l i a n s k i¹⁾ werkte later met media, waaraan als hoofdbestanddeel zouten van vetzuren waren toegevoegd en wel gebruikte hij hiervoor de calcium-, natrium- en kaliumzouten van azijnzuur en boterzuur. Als resultaat van de methaangisting stelde hij in beide gevallen een volledige omzetting van deze substraten tot koolzuur en methaan vast.

Sedertdien is het aantal der voor een methaangisting toegankelijke substraten nog met ettelijke vertegenwoordigers van geheel andere klassen van verbindingen uitgebreid. Zoo bewees M a z é²⁾ in 1915 dat aceton, O m e l i a n s k i³⁾ in 1916 dat aethylalcohol, en G r o e n e w e g e⁴⁾ in 1920 dat ook methyl- en butylalcohol aan een methaangisting kunnen worden onderworpen.

Wat de verwekkers van de methaangisting betreft, was het M a z é, die in 1903 als eerste de mogelijke veroorzaker van de methaangisting van vetzure zouten kon aanwijzen en ook koloniën van dit organisme in een voedingsmedium met agar verkreeg. M a z é beschreef dit organisme als een pseudo-sarcina. Vermeldenswaard is, dat O m e l i a n s k i¹⁾ later mededeelt, dat hij deze sarcina-koloniën in een versch medium opnieuw methaangisting te en boterzuur eveneens heeft waargenomen. Het gelukte M a z é niet om door afenting van de door hem waargenomen pseudo-sarcina koloniën in een versch medium opnieuw methaangisting te verkrijgen. Slechts door gelijktijdige enting van de kolonie der sarcina's met koloniën van twee begeleidende organismen trad wederom methaangisting op.

Sö h n g e n vermeldt in zijn dissertatie twee karakteristieke

1) W. O m e l i a n s k i, Centralbl. f. Bakt. II, 15, 673, 1906.

2) P. M a z é, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 78, 398, 1915.

3) V. L. O m e l i a n s k y, Ann. de l'Inst. Pasteur 30, 56, 1916.

4) J. G r o e n e w e g e, Meded. v. d. Burgerl. Geneesk. Dienst in Nederl. Indië 1, 2, 1920.

organismen, welke verantwoordelijk zouden zijn voor de methaangisting van de verschillende vetzure zouten en wel een sarcina en een staafvormige bacterie, waarbij dan de sarcina in de acetaatcultures sterk overheerschte, terwijl in de overige cultures laatstgenoemde bacterie het meest verbreide organisme was.

Hoewel hij deze organismen waarnam in cultures, welke zeker niet rein waren, had hij toch alle reden om de genoemde bacteriën voor de methaangisting verantwoordelijk te stellen. Door namelijk herhaaldelijk de boven het sediment staande vloeistof te decanteeren en deze te vervangen door versch bereid medium, had hij zeer actieve sedimenten verkregen, welke relatief vrij waren van verontreinigende organismen.

Sö h n g e n heeft energieke pogingen in het werk gesteld om de methaانبacteriën in reincultuur te brengen; hij slaagde hierin evenwel niet.

Dat zijn buiscultures in een hooge laag uitgekookte agar geen succes opleverden, moet zeer waarschijnlijk worden toegeschreven aan de te sterke enting van de buizen; Sö h n g e n liet blijkbaar na passende verdunningen aan te leggen. De methaanorganismen konden onder dergelijke voorwaarden niet tot koloniën uitgroeien.

Groeneweg e maakt in zijn eerdergenoemde verhandeling melding van een nieuw methaanorganisme, dat door hem als *Micrococcus* werd aangeduid. Dit zou volgens hem in staat zijn zoowel vetzuren als primaire alcoholen volledig tot methaan en koolzuur te vergisten.

In het onder leiding van Sö h n g e n bewerkte proefschrift van Coolhaas¹⁾ zijn belangwekkende waarnemingen beschreven aangaande de thermophile vergistingen van zeer uiteenlopende substraten. Onder meer geeft Coolhaas aan, dat hij er in slaagde een vergisting van calciumacetaat en calciumformiaat bij 55° C. tot stand te brengen, waarbij deze verbindingen kwantitatief in koolzuur en methaan werden omgezet. Door herhaalde overentingen verkreeg hij ver gezuiverde cultures. Onder meer op grond van het microscopisch onderzoek van de hierbij verkregen calciumcarbonaat-sedimenten besluit Coolhaas, dat de hierin aanwezige bacteriën afwijken van degene, welke bij de normale mesophile gistingen werkzaam zijn. Pogingen om deze vrij lange, dunne, staafvormige, zooals terloops wordt vermeld somtijds ook sporevormende, bacteriën in reincultuur te brengen, hadden evenwel weer geen succes.

¹⁾ C. Coolhaas, Bijdrage tot de kennis der dissimilatie van vetzure zouten en koolhydraten door thermophile bacteriën. Wageningen 1927.

Hoewel in 1930—1934 door Buswell en medewerkers uitgebreide onderzoekingen over de methaangisting werden gepubliceerd — waarop in § 2 nader zal worden teruggekomen — treft men in deze verhandelingen slechts zeer summiere gegevens aan betreffende de organismen, welke voor de door hen bestudeerde gistingen verantwoordelijk zijn. Zij vermelden terloops, dat zij de door Söhngen beschreven bacteriëntypen in de sedimenten van hun cultures hebben waargenomen.

In 1936 ondergaat onze kennis van de methaanproduceerende bacteriën voor het eerst een aanmerkelijke verdieping dank zij het fraaie, in dit jaar gepubliceerde onderzoek van Barker¹⁾. Met behulp van een in Hoofdstuk III nader toe te lichten zeer verfijnde techniek slaagde deze onderzoeker er in uitgaande van ver gezuiverde ophoopingscultures, waarbij verschillende substraten toepassing vonden, de in deze cultures aanwezige methaانبacteriën tot kolonievorming in speciale agarmedia te brengen en vervolgens uitgaande van deze koloniën te komen tot cultures, welke ondanks het nog door den schrijver zelf gemaakte voorbehoud, met practische zekerheid als reincultures mochten worden beschouwd. Dientengevolge kon Barker als eerste een min of meer volledige morphologische beschrijving van de uit de verschillende ophoopingsmedia verkregen methaanproduceerende bacteriën geven. Doordat hij tevens voor de aldus verkregen soorten het gedrag ten opzichte van verschillende gistingssubstraten kon vaststellen, was het hem mogelijk een eenigermate afgeronde soortbeschrijving van de door hem geïsoleerde bacteriën te geven.

Kort samengevat kan aangaande de vier door Barker beschreven soorten het volgende worden medegedeeld.

Methanosarcina methanica (Smit) Kluyver et van Niel werd door Barker geïsoleerd uit ophoopingscultures met calciumacetaat en is dus naar alle waarschijnlijkheid identiek met de reeds door Söhngen en Omelianski in soortgelijke cultures signaleerde sarcina. Het organisme bestaat uit relatief groote bolvormige cellen, welke grootendeels tot typische sarcina's zijn vereenigd, hoewel tetraden en zeldzamer ook diplococcen onder bepaalde voorwaarden optreden. Het organisme is onbeweeglijk en vormt geen sporen. Het vergist acetaten, mogelijk ook butyraten, maar geen aethylalcohol.

Methanococcus Mazei Barker werd door Barker éénmaal eveneens uit een ophoopingscultuur met calciumacetaat geïsoleerd. De bolvormige cellen zijn kleiner dan die van de vorige soort; zij komen somtijds afzonderlijk voor, maar zijn doorgaans tot kleinere

¹⁾ H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 7, 420, 1936.

of grotere onregelmatige, slijmige aggregaten vereenigd, waaronder ook sarcina-achtige vormen voorkomen. Karakteristiek zijn in vele gevallen scherp omgrensde cysten van verschillende vormen en afmetingen. Deze beschrijving herinnert in sterke mate aan die, welke Mazé gaf van de zgn. „pseudo-sarcina”, welke deze onderzoeker in zijn acetaat-cultures aantrof, en dit gezichtspunt is verantwoordelijk voor de door Barker aan deze soort gegeven benaming. De cellen zijn onbeweeglijk en vormen geen sporen. Het organisme vergist acetaten en butyraten, maar geen aethyl- of butylalcohol.

Methanobacterium Söhngenii Barker werd door Barker bij herhaling aangetroffen in ophoopingscultures met calciumbutyraat, hoewel dit organisme soms ook in dergelijke cultures met calcium-acetaat voorkomt. Het zijn staafvormige, onbeweeglijke, matig lange bacteriën, dikwijls eenigszins gebogen; sporen worden niet gevormd. Soms zijn zij tot lange draden vereenigd, welke typische bundels vormen. De door Söhngen gegeven beschrijving van de door hem overwegend in de butyraat-ophooping aangetroffen bacterie, laat nauwelijks twijfel aangaande de identiteit daarvan met de door Barker geïsoleerde soort, op grond waarvan deze de soortnaam *Söhngenii* koos. Het organisme vergist zoowel acetaat als butyraat, maar geen alcoholen.

Methanobacterium Omelianskii Barker werd door Barker regelmatig aangetroffen in ophoopingscultures met aethyl- en butylalcohol bij aanwezigheid van calciumcarbonaat en verschillende malen hieruit geïsoleerd. Het zijn dunne, meestal gekromde staven, welke in den regel los voorkomen, maar soms ook tot korte draden zijn vereenigd. Sporen zouden niet worden gevormd¹⁾. Acetaten worden niet vergist; aethylalcohol wordt vergist tot azijnzuur, butylalcohol tot boterzuur. Aangezien het nauwelijks twijfelachtig is, dat Omelianski hetzelfde organisme in zijn aethylalcoholgistingen waarnam en afbeeldde, werd als soortnaam *Omelianskii* gekozen.

In een volgende verhandeling beschrijft Barker²⁾ nog waarnemingen betreffende een methaanproduceerende gisting, waarbij uit aethylalcohol naast azijnzuur belangrijke hoeveelheden boterzuur en capronzuur worden gevormd. Wat de hierbij werkzame organismen betreft, komt Barker tot de conclusie, dat naast *Methanobacterium Omelianskii* een sporevormende bacterie van het plectridiumtype voor de omzetting verantwoordelijk is. In

¹⁾ Men vergelijkte evenwel hieronder.

²⁾ H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 8, 415, 1937.

hoeverre ook laatstgenoemde bacterie tot methaanvorming in staat is, moest hierbij vooralsnog in het midden worden gelaten.

In een drietal methodologische verhandelingen geven Heukelekian en Heinemann¹⁾ voorschriften voor het tellen van methaانبacteriën in anaëroob afvalwaterslib; daar hierbij niet naar reïncultures van soorten is gestreefd, moge met deze vermelding worden volstaan.

In 1940 verschijnt dan nog een uitvoerige verhandeling van Barker²⁾, welke geheel aan *Methanobacterium Omelianskii* is gewijd. In deze verhandeling vermeldt de schrijver uitgebreide proefnemingen, welke de reinheid van de door hem geïsoleerde cultures bewijzen. Hij beschrijft uitvoerig hoe dit organisme bij uitzaaiing in een passend agarmedium met aethylalcohol als eenig substraat een drietal typen koloniën vormt, namelijk *a.* vrij groote (1—2 mm diameter) compacte, min of meer lensvormige, geelachtig bruine koloniën van zachte consistentie, *b.* veel kleinere eveneens compacte, maar veel hardere koloniën, *c.* kleine diffuse koloniën, welke aan die van *Actinomyces*-soorten doen denken. Barker geeft een overtuigende bewijsvoering voor de zienswijze, dat men hier te doen heeft met drie varianten van één enkele soort.

Hierop volgt een zorgvuldige beschrijving van de morfologische eigenschappen. De dunne — diameter 0,6—0,7 μ — onvertakte staafjes, waarvan de lengte tusschen 1,5—10 μ varieert, zijn somtijds recht maar ook wel gekromd. Hoewel de meeste cellen onbeweeglijk zijn, zou bij sommige individuen ook een zwakke „end over end spinning motion” (rondwentelende? beweging) voorkomen.

Ditmaal komt Barker tot de conclusie, dat terminale op sporen gelijkende formaties aanwezig zijn. Deze veroorzaken een opzwellen van het einde van het staafje, hebben de sterke lichtbreking van endosporen en geven ook de sporekleuring volgens Wirtz. Hun thermoresistentie is evenwel gering: reïncultures gaven na 10 minuten pasteuriseeren bij 80°-C. nimmer aanleiding tot groei. De Gram-kleuring is variabel: positief en negatief gekleurde cellen komen naast elkaar voor.

Zorgvuldig zijn vervolgens de factoren nagegaan, welke den groei van *Mb. Omelianskii* beïnvloeden, hetgeen resulteert in een voorschrift voor de samenstelling van een optimaal voedingsmedium. De optimale pH ligt bij 7,0—7,2; een hooge fosphaatconcentratie tot 2 % is gunstig. Groei en alcoholverbruik zijn rechtstreeks

¹⁾ H. Heukelekian and B. Heinemann, Sewage Works Journ., 11, 426, 436, 571, 1939.

²⁾ H. A. Barker, Antonie van Leeuwenhoek 6, 201, 1940.

evenredig met de carbonaattoevoeging, althans tot een zekere concentratie. Ammoniumzouten zijn een passende stikstofbron; organische stikstofverbindingen en groeifactoren, zooals die in gistextract voorkomen, stimuleeren den groei niet.

Betreffende de stofwisselingseigenschappen van *Mb. Omelianskii* verscheen in 1941 nog een nadere verhandeling van Barker¹⁾, waarvoor evenwel naar de volgende paragraaf zij verwezen.

Hier zij voorts nog vermeld, dat Wikén²⁾ in 1940 een aantal in 1938 in Delft verrichte waarnemingen heeft gepubliceerd betrekking hebbende op door hem ingezette ophoopingcultures van methaانبacteriën. Dat hij hierbij — in tegenstelling tot Sö h n g e n's aanvankelijke opgave — een goede vergistbaarheid van propionaat vaststelde, zij hier slechts aangestipt. Hij geeft verder een kort overzicht van de door hem bij microscopisch onderzoek in het sediment van uiteenlopende ophoopingcultures waargenomen bacteriënvormen. Van denzelfden schrijver verscheen ook in 1942 nog een verhandeling³⁾, waarin naast een algemeen overzicht van onze kennis der methaangisting, mededeeling wordt gedaan van geslaagde ophoopingproefnemingen met een groot aantal uiteenlopende organische substraten. In een ophoopingproef met calciumacetaat trad *Methanosarcina methanica* op den voorgrond, waarbij Wikén er in slaagde dit organisme in rein-cultuur te verkrijgen. Men vindt in deze verhandeling ook een tweetal fraaie microphotographieën van deze bacteriesoort.

Tenslotte moge nog worden vermeld, dat Barker en Taha⁴⁾ in 1942 een uitvoerige beschrijving gegeven hebben van de hierboven vermelde, door hen *Clostridium Kluyverii* genoemde sporevormende bacteriesoort, welke naast *Mb. Omelianskii* voorkomt in de tot capronzuur leidende methaangisting van aethyl-alcohol. Overtuigend wordt aangetoond, dat deze bacterie in rein-cultuur wel in staat is tot capronzuurvorming, doch dat als gistings-gassen uitsluitend koolzuur en waterstof worden gevormd. De genoemde bacteriesoort is dus geen methaانبacterie.

§ 2. Het inzicht in het chemisme der methaangisting.

Wij zagen reeds in § 1, dat Sö h n g e n voor een groot aantal organische substraten, in het bijzonder ook voor verschillende termen van de vetzuurreeks, vaststelde, dat deze onder passende voorwaarden volledig tot koolzuur en methaan werden vergist.

¹⁾ H. A. Barker, Journ. Biol. Chem. 137, 153, 1941.

²⁾ T. Wikén, Arch. f. Mikrobiol. 11, 312, 1940.

³⁾ T. Wikén, Iva 3, 1, 1942.

⁴⁾ H. A. Barker and S. M. Taha, Journ. of Bact. 43, 347, 1942.

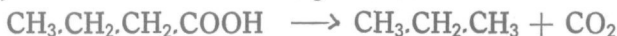
Nochtans was hiermede het interne chemisme van dit proces nog geenszins opgehelderd.

In een enkel geval scheen dit chemisme op het eerste gezicht tamelijk doorzichtig, zelfs in die mate, dat er nauwelijks behoefte aan een verdere opheldering leek te bestaan. Dit gold bijv. voor de vergisting der acetaten, waarvoor het vastgestelde chemisme:



als een eenvoudige decarboxylatie van het azijnzuur kon worden geïnterpreteerd.

Twijfel aangaande de juistheid van deze zienswijze was intuschen geboden gezien de overweging, dat men dan voor de vergisting van butyraten zou mogen verwachten, dat zich hierbij althans primair de overeenkomstige reactie:



zou afspelen.

Dit nu is kennelijk niet het geval; nimmer toch is men er in geslaagd bij eenige methaangisting ook maar de geringste aanwijzing te krijgen voor het optreden van eenige hogere koolwaterstof.¹⁾ Integendeel spreken ook in het geval der butyraatvergisting de analyseresultaten alle sterk ten gunste van de opvatting, dat deze gisting geheel verloopt volgens de vergelijking:



Meer in het algemeen mocht het opmerkelijk worden genoemd, dat bij geen enkele methaangisting het optreden van gereduceerde verbindingen is geconstateerd, welke zouden kunnen worden opgevat als een tusschenproduct tusschen het gistingssubstraat en het uiteindelijke hydrogenatieproduct: methaan.²⁾ Men moet dan ook besluiten, dat het interne chemisme der methaangisting langen tijd volledig in het duister was gehuld.

Aangezien Sö h n g e n bij zijn desbetreffende experimenten meestentijds van de calciumzouten der vetzuren uitging, geeft hij voor de omzetting dezer verbindingen de volgende formuleering:



Ca-acetaat



Ca-butyraat



Ca-capronaat

¹⁾ Vergelijk bijv.: L. A. Thayer, Bull. Amer. Ass. of Petroleum Geologists, 15, 441, 1931.

²⁾ Men zie evenwel de mogelijke uitzondering op deze uitspraak op pag. 28.

Op grond van deze bruto-formules komt Sö h n g e n tot de conclusie, dat men bij deze gistingen te doen heeft met een „hydrolytische splitsing” van het vetzure zout, met dien verstande, dat de zuurstof van een watermolecuul primair CaCO_3 doet ontstaan, waarbij dan de vrijkomende waterstof beschikbaar komt voor de reductie van de methyleen- of methylgroepen van de koolstofketen. Bij de vetzuren met meer dan twee C-atomen, zouden nog meer watermoleculen worden gesplitst, waarbij de zuurstof zich dan ook van koolstofatomen uit de $\alpha\text{-CH}_2$ -groep zou meester maken. De hierbij zoowel uit het water, als van het geoxydeerde koolstofatoom vrijkomende waterstof zou dan reduceerend werken op de resteerende methyleen- en methylgroepen onder vorming van methaan.

Ten gunste van een dergelijke zienswijze legt Sö h n g e n veel nadruk op zijn waarnemingen, volgens welke zouten van vetzuren met een oneven aantal C-atomen niet zouden worden vergist. Voor het geval van het Ca-propionaat betoogt hij, dat een „hydrolytische splitsing” met behulp van één molecuul water tot aethaanvorming moet leiden, volgens de vergelijking:



Door de ontleding van één molecuul calciumpropionaat met drie moleculen water zou daarentegen teveel waterstof worden gevormd:



Daar nu eenmaal blijkens Sö h n g e n's ervaring methaانبacteriën nimmer tot de vorming van aethaan of waterstof aanleiding geven, zou hierin de verklaring gelegen zijn voor de door hem waargenomen onvergistbaarheid der propionaten. Een soortgelijke redeneering zou ook voor de valeriaten en andere termen met oneven aantal C-atomen van kracht zijn.

Sö h n g e n heeft blijkbaar, mogelijk op grond van een ongenoegzaamheid om meer dan één molecuul van het propionaat in de vergelijking te betrekken, nimmer de heden ten dage geldende bruto-vergelijking voor een propionaat-methaangisting in overweging willen nemen:



Had hij dit gedaan, dan zou hij wellicht zijn pogingen om tot een methaangisting van propionaat en valeriaat te geraken hebben voortgezet, in welk geval hij ongetwijfeld zelf zijn inzichten zou hebben gewijzigd, aangezien hij dan zou hebben geconstateerd, dat zijn experimenteel uitgangspunt niet juist was.

Nu was het Sö h n g e n's leerling Coolhaas, die in zijn reeds eerder geciteerd proefschrift twintig jaren later als eerste aantoonde, dat propionaten wel degelijk aan methaangisting onder-

hevig zijn. Terwijl de waarnemingen van Coolhaas betrekking hadden op de thermophile modificatie van het gistingproces, hebben later zoowel Neave en Buswell¹⁾ als Thayer (l.c.), als ook Wikén²⁾ overtuigend laten zien, dat dit ook voor de mesophile gisting van propionaten en andere vetzuren met een oneven aantal C-atomen ten volle geldt. Söhngen's negatieve resultaten moeten dus aan een ongelukkig toeval — de wel eens grillige uitkomsten bij overenting van methaangistingen — worden toegeschreven.

Zooals reeds in § 1 werd aangestipt, is Söhngen's werk in vele opzichten aanmerkelijk uitgebreid door Buswell en medewerkers.³⁾ Deze onderzoekers slaagden er in door voortgezette ophoopingsproeven een zeer actief gistingssediment te verkrijgen, waarvoor zij konden aantonen, dat dit zeer verschillende organische verbindingen volledig tot methaan en koolzuur vergistte. Tot deze verbindingen behoorden zeer uiteenlopende organische zuren, alcoholen, polyalcoholen, suikers en polymere koolhydraten. Opmerkelijk was, dat er onder deze verbindingen ook verschillende met aromatisch karakter waren, waarbij kennelijk ook de benzolkern tot methaanvorming aanleiding gaf. Slechts enkele der onderzochte verbindingen zooals aethyl-, isopropyl- en butylaether bleken door de methaanbacteriën niet te worden aangetast.

Weliswaar moet bij de verkregen positieve uitkomsten worden bedacht, wat in § 1 ook reeds aangaande de proefnemingen van Söhngen werd opgemerkt, namelijk dat met ruwcultures werd gewerkt, zoodat het bewijs ontbreekt, dat de eigenlijke methaanproduceerende organismen in staat zijn de onderzochte verbindingen rechtstreeks aan te tasten.

Het eenvormige en absolute karakter van het methaangistingsproces heeft Symons en Buswell er toe gebracht voor dit proces de volgende, voor alle voor methaangisting vatbare substraten geldende, formule op te stellen:

1) S. L. Neave and A. M. Buswell, Journ. Amer. Chem. Soc. 52, 3308, 1930.

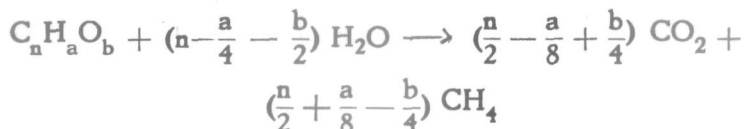
2) T. Wikén, Archiv f. Mikrobiol. 11, 312, 1940.

3) S. L. Neave and A. M. Buswell, Journ. Amer. Chem. Soc. 52, 3308, 1930;

A. M. Buswell and S. L. Neave, Ill. State Water Survey Bull. no. 30, 1930;

G. E. Symons and A. M. Buswell, Journ. Amer. Chem. Soc. 55, 2028, 1933;

D. Tarvin and A. M. Buswell, Ibid. 56, 1751, 1934.



Aan deze formule gaven zij later nog een uitbreiding voor het geval, dat de gistingssubstraten ook stikstof en zwavel bevatten, welke elementen dan uiteindelijk respectievelijk als NH_3 en H_2S plegen te worden teruggevonden.

Voor een groot aantal organische substraten toonden Buswell en medewerkers aan, dat de verhouding, waarin methaan en koolzuur bij de vergisting ontstonden, inderdaad zeer bevredigend overeenkwam met die, welke uit de algemeene formule volgde.

Wat de aard van de zich bij deze gisting afspelende chemismen betreft, accentueeren Neave en Buswell Söhnngen's opvatting van de oxydeerende werking van het water op het gistingssubstraat als het essentiele element in de gisting.

Ook Buswell's medewerker Symons¹⁾ formuleert in zijn begin 1932 in uittreksel gepubliceerd proefschrift de methaangisting nog als een anaërobe, door bacteriën gekatalyseerde hydrolyse der organische substraten.

Hoewel vooropstellende, dat men aangaande het interne chemisme der methaangisting nog geheel in het duister tastte, wees Kluyver²⁾ er in 1931 op — onder verwijzing naar het feit, dat men tot die tijd in geen enkele methaangisting eenig ander product dan methaan en koolzuur had aangetroffen — dat in deze gisting als het ware het ideaal van het gistingsbeginsel was verwezenlijkt. Bij elk gistingsproces toch wordt een deel van het substraatmolecuul geoxydeerd en een ander deel gereduceerd; het hoogst bereikbare is dus uiteraard, dat een deel van de koolstof-atomen van het substraat tot de hoogste reductietrap van de koolstof: het methaan, wordt gehydrogeneerd en het resteerende deel dier atomen tot de hoogste oxydatietrap van de koolstof: het koolzuur, wordt gedehydrogeneerd. Bij deze beschouwingswijze staat dus veel meer het interne karakter der zich afspelende oxydo-reducties op den voorgrond, terwijl de rol van het water meer naar het tweede plan wordt verschoven.

Mede onder invloed van dergelijke beschouwingen kwamen Symons en Buswell (l.c.) in 1933 tot een nader gepreciseerde

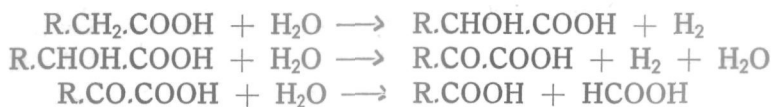
¹⁾ G. E. Symons, The anaerobic bacterial hydrolysis of carbohydrates. An Abstract of a Thesis. Urbana (Illinois), 1932.

²⁾ A. J. Kluyver, The Chemical Activities of Micro-organisms, London, 1931, p. 75.

voorstelling. Hoewel zij eenerzijds nog schrijven: "Neave and Buswell were able to show definitely that water was the oxidizing agent in the anaerobic fermentation of the fatty acid", karakteriseeren zij anderzijds het methaangistingsproces als volgt: "an oxidation-reduction reaction involving the addition of water and decarboxylation, whereby acids, carbon dioxide and hydrogen are formed, the hydrogen combining with some of the carbon dioxide to form methane".

In de in 1934 verschenen publicatie van Tarvin en Buswell (l.c.) zijn de resultaten weergegeven van uitgebreide onderzoekingen naar het optreden van tusschenproducten bij de omzetting van verschillende substraten. Men moet ten opzichte van althans een deel dezer uitkomsten wel het noodige voorbehoud maken, andermaal op grond van het feit, dat de proefnemingen niet met reincultures zijn verricht. Terwijl voor talrijke eenvoudige verbindingen zooals alcoholen en vetzure zouten geen andere anaërobe omzettingen — afgezien van de hier niet in aanmerking komende sulfaatreductie en denitrificatie — dan methaangisting bekend zijn, is er bij toevoeging van zulke gemakkelijk aantastbare substraten als suikers zeker ten volle rekening te houden met de waarschijnlijkheid, dat gansch andere in de ruwcultures aanwezige bacteriën eerst op deze substraten zullen inwerken. Wanneer de schrijvers dan ook rapporteeren, dat bij toevoeging van glucose, laevulose, saccharose en zetmeel primair vluchtige vetzuren en ook waterstof worden gevormd, dan is het zeer onwaarschijnlijk, dat methaانبacteriën hiervoor verantwoordelijk zijn geweest. Deze bezwaren gelden evenwel niet voor die proefnemingen, waarbij vetzure zouten werden vergist. Pogingen om de tusschenproducten van deze oxydatie door invoering van aromatische substituenten te merken, zooals Knoop dit destijds bij de bestudeering van de oxydatie der vetzuren in het dierlijk lichaam had gedaan, mislukten, aangezien bleek, dat de methaانبacteriën ook de aromatische componenten „met huid en haar” in koolzuur en methaan omzetten. Desniettemin slaagden Tarvin en Buswell er in om door analyse van het medium tijdens de gisting verschillende intermediair gevormde oxydatie-producten aan te toonen. Bij de vergisting van de vetzuren werd de intermediaire vorming van vetzuren met geringer aantal koolstofatomen vastgesteld. Quantitatieve gegevens dienaangaande ontbreken evenwel. Aangezien niet met reincultures is gewerkt, zou het optreden van kleine hoeveelheden van producten als azijnzuur en mierenzuur ook wel aan nevenprocessen onder invloed van verontreinigende organismen kunnen zijn te wijten.

Het door de schrijvers opgestelde reactieschema voor de oxydatie van de vetzuren:



draagt dan ook — nog afgezien van de onaantrekkelijkheid om gasvormige waterstof als tusschenproduct van de methaangisting te aanvaarden — een sterk hypothetisch karakter.

Vermeldenswaard is nog het waargenomen optreden van propionzuur bij de vergisting van melkzuur, wijnsteenzuur en appelzuur, daar dit toch een eerste geval zou zijn, dat bij een methaangisting naast methaan nog een ander reductieproduct uit een substraat zou worden gevormd. Vooralsnog lijkt het intusschen zeer denkbaar, dat ook deze reductie aan de aanwezigheid van verontreinigende organismen moet worden toegeschreven.

Hoewel men in de voorstelling van Buswell en medewerkers de hoofdpunten der hedendaagsche opvatting aangaande het chemisme der methaangisting zeker terug vindt, komt toch aan C. B. van Niel de eer toe het eerst het wezen der methaangisting scherp te hebben doorgrond. Deze stelde de hypothese op, dat de taak van het organisch substraat bij de methaangisting primair slechts die van een waterstofdonator zou zijn, waarbij dan de waterstof onder invloed van een in de bacterie aanwezig katalytisch systeem op het mede in het gistingsmedium aanwezige koolzuur zou worden overgedragen.

Karakteristiek voor deze voorstelling is dus, dat *alle* methaan uit koolzuur ontstaat, dat dus primair naast het organisch substraat aanwezig moet zijn, alhoewel uiteraard de voortgezette dehydrogenatie van dit substraat mede tot vorming van koolzuur zal leiden. Onmiddellijk springt bij deze zienswijze de verklaring van het feit in het oog, dat bij de beschouwde gistingsprocessen methaan steeds de eenige gevormde koolwaterstof is.

Zooals reeds in de Inleiding is opgemerkt, ging van Niel bij de opstelling van zijn hypothese uit van de in 1906 door Sö h n g e n gepubliceerde waarneming, dat ruwcultures van vetzure zouten vergistende methaanbacteriën in staat zijn methaan te produceeren, wanneer zij in contact worden gebracht met een gasatmosfeer bestaande uit koolzuur en waterstof.

Sö h n g e n leverde het bewijs, dat zich hierbij de volgende reactie voltrekt:



In dit geval is het dus aan geen twijfel onderhevig, dat het door de methaanbacteriën geproduceerde methaan inderdaad uit koolzuur afkomstig is. De omstandigheid, dat bij alle bekende

gistingstypen een dehydrogenatie van het substraat of van daaruit gevormde splitsingsproducten optreedt, alsmede, dat in bepaalde gevallen — sulfaat- en nitraatreductie — de hierbij beschikbaar komende waterstof op anorganische acceptoren wordt overgedragen, deed het allerm minst uitgesloten zijn, dat dit proces zich ook bij de methaangisting der organische substraten zou afspelen en dat men dientengevolge in alle gevallen het koolzuur als de directe moederstof van het geproduceerde methaan zou mogen zien.

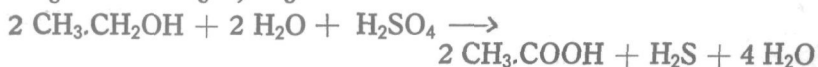
Een nadere overweging van deze mogelijkheid leidt somtijds in eerste instantie wel tot verwonderlijke consequenties. Wanneer men vaststelt, dat een methaangisting van aethylalcohol zich voltrekt volgens de vergelijking:



dan is het moeilijk zich te onttrekken aan het denkbeeld, dat o.m. de in de alcohol aanwezige methylgroep wel door hydrogenatie tot methaanvorming zal hebben aanleiding gegeven. De voorstelling, dat de alcohol integendeel bij de methaanvorming wordt gedehydrogeneerd lijkt op het eerste gezicht dan ook al heel weinig aannemelijk.

In de Inleiding is er reeds op gewezen, dat Barker¹⁾ zich desondanks tot taak stelde het experimentele bewijs voor de juistheid dezer voorstelling te leveren en dat hij hierin ook ten volle is geslaagd. Bij den opzet van zijn desbetreffende proefnemingen vond hij steun in waarnemingen, welke eenige jaren tevoren door Baars²⁾ aangaande het chemisme der sulfaatreductie waren gepubliceerd. Deze onderzoeker had vastgesteld, dat bij dit gistingsproces de dehydrogenatie van het organische substraat, welke tot de hydrogenatie van het sulfaat leidde, niet onder alle omstandigheden een volledig karakter heeft. Hij stelde namelijk vast, dat in sommige gevallen niet het volledige dehydrogenatieproduct der organische substraten, het koolzuur, ontstaat, doch dat daarentegen onvolledige dehydrogenatieproducten zich in het medium ophoopen, waarbij het koolstofskelet van het substraat somtijds geheel intact kan blijven.

Zoo vond Baars bijv., dat aethylalcohol onder den invloed van een bepaalde sulfaatreducerende bacterie met behulp van sulfaat anaëroob tot azijnzuur kan worden gedehydrogeneerd volgens de vergelijking:



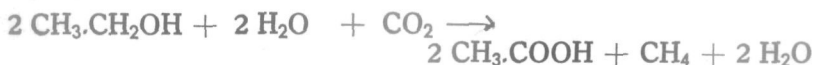
Barker ging nu uit van de veronderstelling, dat onder zekere

¹⁾ H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 7, 404, 1936.

²⁾ J. K. Baars, Over sulfaatreductie door bacteriën, Diss. Delft, 1930.

voorwaarden voor de methaangisting van aethylalcohol iets overeenkomstigs zou kunnen gelden. Het bleek hem nu, dat dit inderdaad het geval was, indien hij aethylalcohol in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat aan een methaangisting onderwierp.

Zijn gistingsbalans leerde hem, dat in zijn door voortgezette ophooping vergaand gezuiverde cultures zich de volgende reactie voltrok:

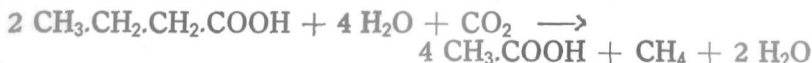


Dit resultaat is ongetwijfeld zeer opmerkelijk: het is een verrassend iets te moeten constateeren, dat uit het gistingsvat een continue stroom van nagenoeg zuiver methaan ontwijkt en tegelijk te kunnen vaststellen, dat de eenige in het gistingsmedium aanwezige organische verbinding daarin na afloop quantitatief in geoxydeerden — d.w.z. gedehydrogeneerden — toestand wordt teruggevonden.

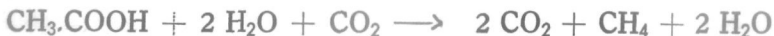
Bij de voortzetting van zijn onderzoek vond Barker, dat bij de methaangisting van butylalcohol zich primair een geheel analoge omzetting voltrekt, te weten:



In de tweede phase der gisting wordt evenwel het gevormde boterzuur op zijn beurt verder tot azijnzuur gedehydrogeneerd, waarbij de onttrokken waterstof kennelijk andermaal onder methaanvorming op koolzuur wordt overgedragen:



Tenslotte is ook het hierbij gevormde azijnzuur eveneens nog aan een methaangisting onderhevig. Het ligt voor de hand om te veronderstellen, dat dit laatste proces een analoog verloop zal hebben en zich volgens de vergelijking:



zal voltrekken. Daar evenwel in dit geval het koolzuurverbruik ten dienste der methaanvorming gekoppeld is aan een in quantitatief opzicht overheerschende koolzuurproductie is hier het bewijs voor deze veronderstelling niet rechtstreeks te leveren.

Dit neemt niet weg, dat de eerder beschreven verrassende waarnemingen van Barker een sterke steun vormen voor de door dezen onderzoeker bepleite zienswijze om de methaangisting zeer in het algemeen op te vatten als een proces, dat verloopt volgens de algemeene vergelijking:



in welke vergelijking H_2A een dehydrogeneerbare organische verbinding voorstelt.

Het opmerkelijke resultaat van deze formuleering is, dat het van ouds bekende proces der methaangisting zich hierdoor openbaart als te zijn in wezen een proces van carbonaatreductie, dat zich geheel op één lijn laat stellen met de reeds lang geleden als zoodanig herkende processen van nitraat- en van sulfaatreductie, welke respectievelijk kunnen worden weergegeven door de vergelijkingen *b* en *c*:



Kenmerkend voor de drie hier beschouwde processen is, dat hierin respectievelijk de elementen koolstof, stikstof en zwavel in hun sterkst gereduceerde toestand, te weten: CH_4 , NH_3 en SH_2 , worden overgevoerd.

Een tweede belangwekkend gezichtspunt, dat uit Barker's proefnemingen te voorschijn komt, is, dat de onderzoeker, die zich met de bestudeering van vraagstukken van de koolstofkringloop in de natuur bezig houdt, rekening zal moeten houden met de mogelijkheid van het verdwijnen van koolzuur ook bij afwezigheid van licht, dat is dus onder voorwaarden, waarbij dit tot vóór korten tijd niet of nauwelijks mogelijk werd geacht.¹⁾

Niet onvermeld mag blijven, dat Buswell²⁾ in 1938 een overzicht over „Anaerobic Fermentations” heeft gepubliceerd, waarin hij o.m. de door hem en zijn medewerkers over de methaangisting verrichte onderzoeken nog eens samenvat. Hierin vermeldt hij ook het door zijn medewerker Todd in 1936 afgesloten, niet gepubliceerde, onderzoek betreffende het optreden van tusschenproducten bij de methaangisting. Todd vond bijv., in goede overeenstemming met Barker, dat bij de vergisting van boterzuur primair belangrijke hoeveelheden azijnzuur worden gevormd, welke in tweede instantie wederom worden omgezet. Aan overeenkomstige waarnemingen omtrent de vergisting van glucose en xylose is weinig beteekenis te hechten, omdat bij deze gemakkelijk aantastbare substraten het bezwaar, dat niet met reïncultures is gewerkt, zich zeker in hooge mate storend zal hebben doen gevoelen.

Sedert zijn eerste publicatie heeft Barker nog een reeks van waarnemingen verricht, welke een nog meer rechtstreeksche bevestiging van zijn theorie der methaangisting hebben gebracht.

¹⁾ Voor de ommekeer, welke zich te dien opzichte in de laatste jaren heeft voltrokken, moge naar de Inleiding worden verwezen.

²⁾ A. M. Buswell, Illinois State Water Survey Bull. No. 32 (1938?).

In een in 1940 verschenen publicatie van Barker, Ruben en Kamen¹⁾ worden proefnemingen beschreven aangaande de methaangisting van aethylalcohol onder den invloed van de door Barker in reïncultuur verkregen bacteriesoort *Methanobacterium Omelianskii*. Bij deze proefnemingen werd als volgt tewerk gegaan. De genoemde bacteriesoort werd eerst op wat grooter schaal gecultiveerd in een medium, waarin het bicarbonaatgehalte limiteerend was gehouden, zoodat na eenigen tijd de vermeerdering tengevolge van koolzuurgebrek tot stilstand kwam. De bacteriën werden hierop afgecentrifugeerd en in een kleine hoeveelheid phosphaatbuffer gesuspenderd. Aan deze suspensie werd vervolgens wat aethylalcohol toegevoegd en hierop werd de suspensie gedurende 40 minuten in contact gebracht met een atmosfeer van koolzuur, dat uit radio-actieve koolstof (C^{11}) was verkregen. Het bleek nu onmiskenbaar, dat het tijdens het experiment gevormde methaan eveneens radio-actieve koolstof bevatte en dus uit het koolzuur — en niet uit de aethylalcohol — was ontstaan.

Weliswaar werd tevens vastgesteld, dat een klein deel van de radio-actieve koolstof werd teruggevonden in het tijdens de gisting bijgevoemde celmateriaal, maar dit gezichtspunt doet uiteraard geen afbreuk aan het rechtstreeksche bewijs, dat het gevormde methaan door hydrogenatie van het toegevoegde koolzuur is ontstaan. Het feit, dat het gevormde azijnzuur volledig inactief bleek te zijn, sluit de mogelijkheid uit, dat dit zuur als tusschenproduct bij de methaanvorming zou zijn opgetreden.

Barker c.s. verrichtten voorts nog overeenkomstige proefnemingen met een van schrijver dezes ontvangende reïncultuur van *Methanosarcina Barkerii*²⁾, bij welke proefnemingen respectievelijk methylalcohol en natriumacetaat als gistingssubstraten werden gebezigd. Daar uit deze substraten uiteindelijk koolzuur wordt gevormd, is de situatie hier gecompliceerder, wat niet wegneemt, dat het waargenomen optreden van radio-actief methaan geen twijfel laat, dat althans een deel van het methaan ook hier door hydrogenatie van koolzuur is gevormd.

In het jaar 1941 verscheen nog een tweede publicatie van Barker³⁾, waarin een uitvoerig onderzoek naar de biochemische

¹⁾ H. A. Barker, S. Ruben and M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sc. 26, 426, 1940.

²⁾ Deze cultuur werd destijds aan Barker toegezonden onder de benaming *Methanosarcina methanica* en is als zoodanig in de genoemde publicatie vermeld. Eerst later is mij gebleken, dat de cultuur in haar eigenschappen van de eerder beschreven soort afweek, weshalve ik haar als de nieuwe soort *Methanosarcina Barkerii* heb beschreven.

³⁾ H. A. Barker, Journ. Biol. Chem. 137, 153, 1941.

capaciteiten van *Mb. Omelianskii* is beschreven. Hierbij stelde Barker vast, dat deze bacterie eenvoudige primaire en secundaire alcoholen tot de overeenkomstige vetzuren en ketonen dehydrogeneert, waarbij gelijktijdig aanwezig koolzuur tot een aequivalente hoeveelheid methaan wordt gereduceerd.

Bij een nader onderzoek naar de mogelijkheid om bij de reactie $2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_4$ het koolzuur te vervangen door een ander dehydrogenatiemiddel bleek hem, dat zuurstof en nitraten toxisch waren; sulfaten en methylalcohol waren zonder effect.

Barker's waarnemingen aangaande de geschiktheid van formiaat als waterstofacceptor zullen in § 3 worden besproken.

In een latere verhandeling rapporteert Barker¹⁾ nog over de uitkomsten van een studie over de reactiesnelheid van de koolzuurreductie door *Mb. Omelianskii* bij aanwezigheid van gasvormige waterstof, waarbij hij verwijst naar mijn eerdere — destijds nog niet gepubliceerde — waarnemingen over het vermogen van genoemde bacteriesoort om het bewuste gasmengsel in methaan om te zetten. Barker komt op grond van zijn studie tot de conclusie, dat de snelheid van waterstofopneming en koolzuurreductie sterk toeneemt met de concentratie aan vrij koolzuur. Uit proefnemingen aangaande den invloed van de pH op de snelheid van de waterstofopneming bij constante totale carbonaatconcentratie besluit hij, dat deze snelheid in het pH-gebied van 6,4 tot 8,6 met toeneming van de pH snel afneemt. Anderzijds was bij constante koolzuurspanning de snelheid over een ruim gebied onafhankelijk van de pH en van de bicarbonaatconcentratie. Uit dit alles moet worden besloten, dat in de methaanbacteriën het vrije kooldioxyde met het katalytisch systeem reageert en primair de snelheid van het waterstofverbruik bepaalt.

§ 3. De methaanvorming uit verbindingen met één koolstofatoom.

Verschillende overwegingen pleiten er voor om die „methaangistingen”, waarbij uitsluitend verbindingen met één koolstofatoom in het spel zijn, aan een afzonderlijke bespreking te onderwerpen. In de eerste plaats is een aantal tot deze categorie behorende omzettingen, mede in verband met hun praktische beteekenis, in later jaren vrij diepgaand onderzocht en heeft men gemeend hierbij tot het optreden van bepaalde tusschenproducten voor de methaanvorming te mogen besluiten. In de tweede plaats behoeft het geen toelichting, dat de in de vorige paragraaf uiteengezette terugbrenging der methaangisting tot een proces van koolzuurreductie de vraag doet rijzen, of er in de literatuur wellicht aanwijzingen

¹⁾ H. A. Barker, Proc. Nat. Acad. Sc. 29, 184, 1943.

zijn te vinden, dat bij de vergisting van bepaalde substraten ook andere verbindingen met één koolstofatoom de waterstofacceptorfunctie van het koolzuur zouden kunnen overnemen.

De eerste waarnemingen op het hier beschouwde gebied zijn andermaal aan S ö h n g e n te danken. In zijn proefschrift beschrijft deze onderzoeker proefnemingen aangaande de methaangisting van mierenzure zouten, waarvoor hij vaststelde, dat het genoemde zuur hierbij practisch volledig volgens de vergelijking:



werd omgezet.

S ö h n g e n stelde deze door methaانبacteriën bewerkte methaangisting der formiaten tegenover de reeds veel eerder ontdekte, door meer gewone bacteriën als bijv. *Bacterium coli* teweeggebrachte waterstofgisting van deze zouten, waarbij het mierenzuur wordt ontleed volgens de vergelijking:



Een nadere analyse van de methaangisting der mierenzure zouten bracht S ö h n g e n er toe de mogelijkheid te overwegen, dat daarbij in de eerste plaats ook een ontleding in koolzuur en waterstof zou plaats vinden, waarop zich dan een reductie van één van elke vier gevormde koolzuurmoleculen door de vier gelijktijdig gevormde waterstofmoleculen zou aansluiten. Teneinde deze gedachtengang te toetsen ging hij er toe over de bewuste formiaatgisting in een waterstofatmosfeer te doen verlopen, met de bedoeling na te gaan of hierdoor een verhooging der methaanproductie zou worden verkregen. Dit nu bleek inderdaad het geval te zijn en deze waarneming leidde S ö h n g e n er toe de mogelijkheid te onderzoeken van methaanvorming ten koste van het systeem koolzuur—waterstof, dus bij uitsluiting van eenige organische verbinding. Het was bij deze proefnemingen, dat S ö h n g e n onmiskenbaar aantoonde, dat methaانبacteriën inderdaad in staat zijn de omzetting:



met groote activiteit te bewerkstelligen.

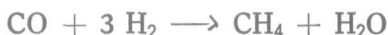
In § 2 zagen wij, dat deze vaststelling voor ons huidig inzicht in het wezen der methaangisting in het algemeen van doorslaggevende betekenis is geweest.

Terwijl het theoretisch belang van deze ontdekking eerst 30 jaren later dank zij Barker's onderzoekingen geheel tot zijn recht is gekomen, was reeds enkele jaren eerder van de zijde der practijk belangstelling voor de bewuste waarneming van S ö h n g e n ontwaakt.

In 1930 verscheen een mededeeling van Lieske en Hof-

mann¹⁾ afkomstig uit het „Kaiser-Wilhelm-Institut für Kohlenforschung“ te Mülheim, waarin in de eerste plaats werd vastgesteld, dat onder den invloed van bacteriën aanwezig in het uitgegiste slijk afkomstig van een „Emscherbrunnen“ een mengsel van koolzuur en waterstof met goed rendement en relatief groote snelheid in methaan wordt omgezet. Als nieuwe waarneming werd hieraan toegevoegd, dat hetzelfde geldt voor een mengsel van koolmonoxyde en waterstof.

Hier verloopt dus de reactie:



De genoemde onderzoekers besluiten uit hun waarnemingen, dat de werkzame bacteriën naast het koolmonoxyde geen andere koolstofbron behoeven. Anderzijds remmen niet te groote hoeveelheden organische stoffen de gasstofwisseling niet; vooral in den aanvang kunnen kleine hoeveelheden formiaten of acetaten zelfs gunstig op de ontwikkeling der cultures werken.

Van veel belang is, dat kon worden vastgesteld, dat in een besloten gas-atmosfeer de biologische koolmonoxyde-reductie ook met goed succes in lichtgas kan worden doorgevoerd, zoodat langs deze weg dit gas volledig van zijn giftige eigenschappen kan worden bevrijd.

In een tweetal hierop aansluitende artikelen van Fischer, Lieske en Winzer²⁾ wordt het vraagstuk van de biologische „Leuchtgasentgiftung“ meer gedetailleerd onder de oogen gezien.

Het bewijs wordt geleverd, dat ook in doorstrotingsproeven het koolmonoxyde volledig uit het lichtgas kan worden verwijderd. Het koolmonoxyde wordt dan, tezamen met het grootste deel van het in het gas nog aanwezige koolzuur, in methaan omgezet. De capaciteit van deze omzetting is weliswaar nog vrij beperkt: om per etmaal 150.000 m³ lichtgas bij 25—30° C. om te zetten moet worden beschikt over een met slijk gevuld reservoir van 50.000 m³ inhoud. Het blijkt, dat tot 60 % watergehalte ingedroogd slijk het best voldoet; bij hoogere watergehalten is de massa onvoldoende poreus. In de practijk blijkt de omzetting gepaard te gaan met een volumecontractie van ongeveer 30 %, waar tegenover staat dat de calorische waarde van het uittredende gas per volume-eenheid aanmerkelijk hooger is dan die van het oorspronkelijke lichtgas.

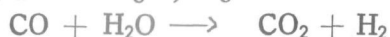
In een tweetal verdere artikelen hebben Fischer, Lieske

¹⁾ R. Lieske und E. Hofmann, Brennstoffchemie 11, 208, 1930.

²⁾ F. Fischer, R. Lieske und K. Winzer, Brennstoffchemie 11, 452, 1930; Brennstoffchemie 12, 193, 1931. Men vergelijke ook het desbetreffende overzicht in: F. Schuster, Stadtgas-Entgiftung. Leipzig, 1935.

en Winzer¹⁾ de theoretische aspecten der toegepaste biologische gasreacties behandeld. In de eerste publicatie wordt aangetoond, dat onder den invloed van goed ingewerkte cultures inderdaad een snelle hydrogenatie van koolmonoxyde tot methaan is vast te stellen, althans voor zoover het gasmengsel door een belangrijke overmaat waterstof, bijv. 10 vol. waterstof op 1 vol. koolmonoxyde, is gekenmerkt. Het voortgezette onderzoek leerde evenwel, dat ook in een atmosfeer met hooger koolmonoxydegehalte en zelfs in een atmosfeer van zuiver koolmonoxyde methaanvorming optrad.

De schrijvers meenen dit onverwachte resultaat te moeten verklaren door aan te nemen, dat onder den invloed der bacteriën zich allereerst een omzetting van koolmonoxyde en water tot koolzuur voltrekt volgens de vergelijking:



Hierop zou zich dan in tweede instantie de reactie:



aansluiten, wat dus inhoudt, dat de totale ingetreden omzetting zou kunnen worden weergegeven door de vergelijking:



Deze voorstelling werd gesteund door de waarneming, dat in een proefneming, waarbij de gasatmosfeer uit zuiver koolmonoxyde bestond, aanvankelijk een geringe, aan eerstgenoemde reactie toe te schrijven, volumevermeerdering intrad. Bovendien werd na ongeveer acht weken, toen al het koolmonoxyde was verbruikt, naast de theoretisch te verwachten hoeveelheden koolzuur en methaan een geringe hoeveelheid (circa 1 %) waterstof in het gasmengsel aangetroffen.

Op grond van deze overigens zwakke overwegingen, achten de schrijvers het waarschijnlijk, dat de biologische omzetting van koolmonoxyde in methaan onder alle omstandigheden volgens de twee genoemde opeenvolgende reacties, dus onder intermediaire vorming van koolzuur, zal plaats vinden.

Bij versch aangezette cultures in een koolmonoxyde-waterstof atmosfeer werd voorts het opmerkelijke verschijnsel geconstateerd, dat deze beide gasen aanvankelijk verdwenen zonder dat dit met een aequivalente productie van methaan gepaard ging. Hieruit moet wel worden besloten, dat er onder deze voorwaarden in den aanvang uit het gasmengsel niet-gasvormige verbindingen worden gevormd, welke eerst in een latere phase weer onder methaanvorming worden ontleed.

In het tweede reeds geciteerde artikel wordt dan het bewijs

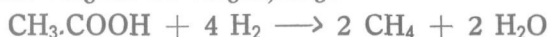
¹⁾ F. Fischer, R. Lieske und K. Winzer, *Biochem. Zeitschr.* 236, 247, 1931; *Biochem. Zeitschr.* 245, 2, 1932.

geleverd, dat het niet-gasvormige tusschenproduct azijnzuur is, dat dan blijkbaar ontstaat volgens de reactievergelijking:



Dit wordt gesteund door de waarneming, dat cultures, waarbij kolloidale stoffen als metaalsulfiden als dragers voor de bacteriën worden gebruikt, na eenigen tijd een duidelijke daling van de pH te zien geven.

Het gevormde azijnzuur ondergaat dan in tweede instantie — in eenmaal goed ingewerkte cultures onmiddellijk na zijn ontstaan — de in de vorige paragraaf reeds uitvoerig besproken methaan-gisting, waarbij Fischer c.s. nog de mogelijkheid overwegen, dat in geval van de aanwezigheid van een overmaat waterstof het niet eerst tot koolzuurvorming komt, maar het azijnzuur zich rechtstreeks omzet volgens de vergelijking:



De schrijvers trekken uit hun waarnemingen de vergaande conclusie, dat er geen directe biologische reductie van koolmonoxyde en van koolzuur tot methaan bestaat; deze reductie zou niet verder gaan dan tot azijnzuur, waaruit dan eerst geheel secundair methaan zou ontstaan.

Tenslotte moge hier nog kort melding worden gemaakt van een laatste verhandeling van dezelfde schrijvers¹⁾, welke wederom geheel aan de technische toepassing van de hierboven besproken gasreacties is gewijd. Eenerzijds hadden deze proefnemingen wederom betrekking op de „Leuchtgasentgiftung”, anderzijds op de bereiding van technisch bruikbaar lichtgas uit watergas.

Het bleek bij de ingestelde proefnemingen, dat men bij gebruik van slijk, dat tot op een watergehalte van 50 % was ingedroogd, tot goed ingewerkte cultures kon komen, welke een zeer veel grootere (ongeveer 80 ×) omzettingsscapaciteit hadden dan die, welke aanvankelijk was vastgesteld. Drukverhooging van het gasmengsel bleek niet tot een versnelling der omzetting te leiden. Koolwaterstoffen, waaronder aethyleen en benzol, bleken de biologische koolmonoxyde-reductie te remmen en de schrijvers meenen het hieraan te moeten toeschrijven, dat een slijkcultuur na negen maanden continu met lichtgas te zijn doorstroomd zijn reactiviteit verloor en blijkbaar afstierf.

Een tweede bezwaar tegen de practische doorvoering van het procédé is, dat de „brenntechnische” eigenschappen van het gas daarbij aanmerkelijk worden veranderd, waarbij in het bijzonder is te denken aan de verhooging van de calorische waarde.

¹⁾ F. Fischer, R. Lieske und K. Winzer, Brennstoffchemie 14, 301 und 328, 1933.

De oplossing van deze moeilijkheden vinden Fischer c.s. hierin, dat zij een mengsel van het cokesovengas en waterdamp eerst zuiver katalytisch converteren, waarbij het koolmonoxyde met het water wordt omgezet in koolzuur en waterstof. De hiervoor gebruikte ijzer-chroom katalysator heeft het voordeel van ongevoelig te zijn voor vergiften (zwavelverbindingen); de reactie-temperatuur is relatief laag: 350—400° C. Door nu vervolgens dit geconverteerde cokesovengas geheel of gedeeltelijk een biologische behandeling te doen ondergaan, waarbij dus uit de laatstgenoemde gasmen methaan ontstaat, is het mogelijk tot een gasmengsel te komen, dat in zijn soortelijk gewicht en calorische waarde weinig van het oorspronkelijke gas afwijkt. Het bleek bij deze proefnemingen, dat de koolzuur-reductie aanmerkelijk sneller dan de koolmonoxyde-reductie verloopt en bovendien niet of slechts weinig gevoelig is voor de aanwezigheid van kleine hoeveelheden zware koolwaterstoffen in het uitgangsgas. Met één volume ingewerkt slijk kunnen volgens deze werkwijze 400 volumina cokesovengas per dag worden omgezet.

Ook uit watergas kan langs dezen weg met goed succes een technisch alleszins bruikbaar lichtgas worden verkregen.

In tegenstelling tot het voorafgaande draagt een in 1933 gepubliceerde studie van Stephenson en Stickland¹⁾ een zuiver theoretisch karakter. Deze auteurs beschrijven allereerst hoe zij uit verontreinigd rivierwater een ophoopingscultuur verkregen in een medium, waaraan als eenig organisch substraat natriumformiaat was toegevoegd en waarin het mierenzuur werd ontleed volgens de vergelijking:



Met een door zeer talrijke overentingen ongetwijfeld vergezuiverde cultuur werden nu waarnemingen verricht aangaande het vermogen om andere organische verbindingen als mierenzuur aan te tasten. Ten deele geschiedde dit met een cultuur, waaraan de auteurs het begrip reincultuur meenen te mogen verbinden. Of deze aanspraak inderdaad gerechtvaardigd is lijkt intusschen wel twijfelachtig: er wordt toch vermeld, dat alle pogingen om het organisme op agarplaten te doen groeien mislukten. Dat een dergelijk — kennelijk streng anäeroob — organisme zich, zooals de schrijvers beweren, met behulp van een ééncelcultuur-techniek in reincultuur zou hebben laten brengen, is op zijn minst genomen zeer verrassend. Aangezien evenwel de in het vooruitzicht gestelde nadere beschrijving van de eigenschappen van het organisme nimmer is verschenen, laat zich dit punt niet verder beoordeelen. Wel is te

¹⁾ M. Stephenson and L. H. Stickland, *Biochem. Journ.* **27**, 1517, 1933.

aanvaarden, dat de gebruikte cultuur slechts één type van methaan-produceerende bacteriën zal hebben bevat en als zoodanig staat dit onderzoek in bacteriologisch en algemeen theoretisch opzicht op een geheel ander plan als de voorafgaande onderzoekingen van Fischer en medewerkers, die uitsluitend met mengcultures, zooals die aanwezig zijn in het uitgegiste afvalwaterslijk, hebben gewerkt.

Stephenson en Stickland bestudeerden het vermogen van hun cultures om in een waterstofatmosfeer verschillende verbindingen met één koolstofatoom te reduceeren en vonden, dat onder deze voorwaarde zoowel koolzuur, mierenzuur, koolmonoxyde, formaldehyde (in den vorm van hexamethyleentetramine) als ook methylalcohol practisch volledig in methaan werden omgezet. Merkwaardigerwijze stelden zij eveneens vast, dat een hunner cultures sulfaat tot zwavelwaterstof reduceerde, een eigenschap, welke tot dusver uitsluitend bekend was voor de karakteristieke bacteriën der sulfaatreductie, te weten *Vibrio desulfuricans* en verwante vormen. Dit resultaat doet dan ook het vermoeden rijzen, dat de betreffende cultuur eveneens dergelijke sulfaat-reduceerende bacteriën bevatte. Daarentegen waren hun cultures niet in staat talrijke onderzochte organische verbindingen met meer dan één koolstofatoom te reduceeren.

Van belang is tenslotte, dat een nader onderzoek leerde, dat bij de vergisting van mierenzuur in de eerste phase der gisting naast het methaan steeds ook gasvormige waterstof werd gevormd, terwijl in het uit oudere cultures ontwijkende gas geen waterstof aanwezig is. De onderzoekers besluiten hieruit — in overeenstemming met Sö h n g e n's eerder inzicht —, dat de bacteriën primair mierenzuur ontleden volgens:



waarop zich dan een methaanvorming zou aansluiten volgens de vergelijking:



Beide omzettingen zouden dan respectievelijk door de enzymen „hydrogenlyase” en „hydrogenase” worden bewerkt.

De schrijvers wijzen er intusschen zelf op, dat het geenszins bewezen is, dat ook niet een rechtstreeksche reductie van mierenzuur door de primair gevormde waterstof tot methaan zou kunnen plaats hebben.

Een geheel nieuw licht op het door Sö h n g e n vastgestelde verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaërobe voorwaarden werd — zooals reeds in de Inleiding is vermeld — evenwel gewor-

pen in een in 1936 verschenen publicatie van Wieringa¹⁾). Het door Wieringa verrichte onderzoek was een voortzetting van een proefnemingenreeks, welke Söhngen zelf nog kort vóór zijn overlijden had ingezet.

In Wieringa's publicatie wordt er op gewezen, dat in Söhngen's klassieke onderzoek, evenals bij alle tot dien tijd verrichte onderzoekingen, slechts met ruwcultures is gewerkt. Dit beteekent, dat de zekerheid ontbreekt dat de bacteriën, welke verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van het methaan in de bewuste cultures, dezelfde zijn als die, welke primair het koolzuur aangrijpen en reduceeren. Wieringa heeft om deze reden andermaal in op groote schaal verrichte proefnemingen en met behulp van een geperfectioneerde methodiek het verdwijnen van koolzuur en waterstof onder invloed van in modder voorkomende microben met groote zorgvuldigheid nagegaan. Het bleek bij deze proefnemingen, dat in overentingën slechts dan snelle omzettingen in de gasatmosfeer optraden, indien aan het overigens anorganische voedingsmedium een zekere hoeveelheid van een bicarbonaat-extract van modder werd toegevoegd. De gedurende een ruim tijdsverloop verrichte gasanalysen leerden nu, dat in de eerste dagen belangrijke hoeveelheden waterstof — in één kolf bijv. vijf liter in zeven dagen — verdwenen, terwijl toch nog maar zeer weinig methaan bleek te zijn gevormd. Het grootste deel van de waterstof moet dus in een andere reactie zijn betrokken. Bij het ouder worden der cultures trad echter de methaanvorming in toenemende mate op den voorgrond. Hieraan kon Wieringa nu een aantal zeer opmerkelijke waarnemingen toevoegen. In de eerste plaats bleek het hem, dat indien hij uit een cultuur, welke nog in de aanvangsphase der gasomzetting verkeerde, met een platina-oogje — dus zeer zwak — overentte in een kolf met steriel medium daarin na dertien dagen een duidelijke gasomzetting intrad, welke snel in intensiteit toenam. Dit resultaat is reeds daarom merkwaardig, aangezien overenting van methaanproducerende cultures alleen bij gebruik van veel entmateriaal pleegt te slagen. In overeenstemming met dit gezichtspunt bleek nu evenwel, dat door de overgeënte cultuur zelfs nadat reeds 17,5 liter waterstof was verbruikt, nog in het geheel geen methaan was gevormd. Ook een nieuwe overenting van deze cultuur bleek in staat te zijn groote hoeveelheden koolzuur en waterstof te doen verdwijnen zonder dat hierbij eenig methaan ontstond.

Het behoeft geen nadere uiteenzetting, dat deze waarnemingen een sterke aanwijzing vormen ten gunste van de zienswijze, dat de primaire reactie tusschen koolzuur en waterstof wordt bewerkt

1) K. T. Wieringa, *Antonie van Leeuwenhoek* 3, 1, 1936.

door bacteriën, welke verschillen van de eigenlijke methaanproducerende bacteriën. Deze zienswijze werd nu door Wieringa nader bevestigd, doordat hij aantoonde, dat men door pasteurisatie van entmateriaal afkomstig van methaanproducerende cultures, cultures verkrijgt, welke wederom in staat zijn koolzuur en waterstof te laten verdwijnen, maar welke daarbij wederom geen methaan produceeren.

Het bleek verder, dat in dergelijke cultures in grooten getale sporevormende staafvormige bacteriën voorkomen en Wieringa slaagde er in deze bacteriën op moutagar, waaraan 10 % steriel modderextract was toegevoegd, in reïncultuur te brengen. Ook met deze reïncultures kon een krachtige omzetting van het koolzuur-waterstofmengsel worden bewerkstelligd.

In dergelijke cultures kon nu worden nagegaan welk product bij de bewuste omzetting ontstond. Dit product bleek azijnzuur te zijn, dat in practisch de theoretisch te verwachten hoeveelheid was gevormd. Kennelijk bracht de sporevormende staafvormige bacterie de volgende omzetting teweeg:



De gevolgtrekking lag nu voor de hand, dat het primair gevormde azijnzuur in de ruwe uitgangscultures door een tweede bacteriesoort — de eigenlijke methaanbacterie — wordt ontleed volgens:



In twee latere respectievelijk in 1940 en 1941 verschenen publicaties van Wieringa¹⁾ geeft deze nog vele bijzonderheden aangaande de eigenschappen van de door hem als *Clostridium aceticum* beschreven azijnzuurvormende bacteriesoort. Van uit het hier beschouwde standpunt kunnen deze publicaties evenwel onbesproken blijven.

De hoofdzaak is toch, dat wij hier de paradoxale situatie ontmoeten, dat in hetzelfde jaar, waarin Barker besloot, dat alle methaanproductie tot koolzuurreductie met gebonden dan wel met vrije waterstof is terug te voeren, Wieringa's proeven twijfel deden ontstaan of de methaanbacteriën zelve het koolzuur wel vermogen aan te grijpen. Weliswaar volgde uit deze proefnemingen geenszins, dat genoemde bacteriën hiertoe niet in staat zijn, maar anderzijds lieten zij zien, dat in het onderzochte geval van de reductie van koolzuur met gasvormige waterstof deze reductie verliep onder den invloed van een bacterie, welke geen methaan produceerde en dus niet tot de methaanbacteriën was te

¹⁾ K. T. Wieringa, *Antonie van Leeuwenhoek* 6, 251, 1940; *Brennstoffchemie* 22, 161, 1941.

rekenen. Pijnlijk trad dus de noodzaak naar voren het bewijs te leveren, dat ook reinkultures van methaانبacteriën koolzuur konden reduceeren.

Zooals reeds in de Inleiding is opgemerkt, doet de carbonaat-reductie-theorie der methaangisting voorts de vraag aan de orde komen, of de reductie van koolzuur tot methaan al dan niet in trappen verloopt en of mitsdien ook niet bepaalde éénkoolstofverbindingen van een lagere oxydatietrap dan het koolzuur de rol van waterstofacceptor bij de methaangisting kunnen vervullen. Hierbij denkt men dan allicht aan verbindingen als HCOOH , CO , CH_2O en CH_3OH . De in de voorafgaande bladzijden beschreven ervaringen leveren inderdaad aanwijzingen ten gunste van deze mogelijkheid. In het bijzonder geldt dit voor de waarnemingen van Stephenson en Stickland, die toch aangeven, dat de genoemde verbindingen bij de door hen bestudeerde gistingen inderdaad in staat zijn in het stelsel koolzuur-waterstof het koolzuur te vervangen, waarbij zij alle in methaan worden overgevoerd.

Door Barker¹⁾ is nu een poging gedaan na te gaan, of de genoemde éénkoolstofverbindingen bruikbaar zouden zijn als waterstofacceptor voor die methaangistingen, waarbij niet gasvormige waterstof, maar organische substraten als waterstofdonator fungeeren.

Barker heeft dit punt voor de vergisting van aethylalcohol door *Mb. Omelianskii* onderzocht. Hij stelde hierbij vast, dat formiaat alleen werd verbruikt, indien in het medium behalve aethylalcohol ook nog koolzuur in den vorm van natriumbicarbonaat aanwezig was. Alleen in een dergelijk geval gaf het formiaat aanleiding tot een grootere productie van azijnzuur en methaan dan bij afwezigheid van formiaat. Hierbij bleek voorts, dat het formiaat sneller werd ontleed, naarmate de cultuur ouder werd. Het laatste wekte den indruk, dat men hier met een aanpassing te doen heeft. Indien aan het medium evenwel in het geheel geen natriumbicarbonaat werd toegevoegd, en het in de cultuur aanwezige koolzuur daaraan met KOH werd onttrokken, bleef behalve de aethylalcohol ook het natriumformiaat onveranderd in het medium achter.

Barker concludeert dan ook terecht, dat mierenzuur bij de methaangisting van aethylalcohol het koolzuur niet als eenige waterstofacceptor kan vervangen. Anderzijds moest de vraag, of formiaat bij de stofwisseling van *Mb. Omelianskii* eventueel kan optreden als waterstofdonator, eveneens ontkennend worden beantwoord; bij afwezigheid van aethylalcohol vond geen omzetting

¹⁾ H. A. Barker, Journ. Biol. Chem. **137**, 153, 1941.

plaats. In hoeverre formiaat bij zijn verwerking in tegenwoordigheid van aethylalcohol en koolzuur rechtstreeks tot methaan wordt gereduceerd, dan wel eerst een dehydrogenatie tot koolzuur ondergaat, waarbij dit dan weer tot methaan wordt gereduceerd, meent Barker in het midden te moeten laten.

Dit twijfelachtige resultaat deed in versterkte mate de behoefte naar voren komen de kwestie van de vervangbaarheid van het koolzuur als waterstofacceptor door andere verbindingen met één koolstofatoom aan een nader onderzoek te onderwerpen, waarvoor naar Hoofdstuk V wordt verwezen.

HOOFDSTUK II.

PROEFNEMINGEN MET GEZUIVERDE CULTURES TER STAVING VAN DE KOOLZUURREDUCTIE-THEORIE DER METHAANGISTING.

§ 1. *Inleiding.*

Om het experimenteele bewijs te leveren, dat methaan bij de methaangisting ontstaat door dehydrogenatie van het organische substraat ging Barker¹⁾ als volgt te werk.

Nauwmonds-stopflesschen werden geheel gevuld met een mineraal medium, waaraan 2 % aethylalcohol was toegevoegd, terwijl koolzuur in den vorm van calciumcarbonaat in overmaat werd toegevoegd.

Door enting met riool- of slootmodder gelukte het hem een methaanbacteriënflora op te hoopen, welke de aethylalcohol slechts onvolledig tot de aequivalente hoeveelheid azijnzuur bleek te dehydrogeneeren, terwijl voorts kwam vast te staan, dat een hoeveelheid methaan werd gevormd, welke aequivalent was met de hoeveelheid uit het medium verdwenen koolzuur.

Op grond van de omzetting:



was dus de reductie van koolzuur door middel van substraatwaterstof tot methaan onweerlegbaar aangetoond.

Echter deden zich, zooals reeds in Hoofdstuk I, § 1 werd vermeld, in sommige gevallen bij deze proefnemingen storende complicaties voor, welke werden veroorzaakt door de mede-aanwezigheid van een anaërobe sporevormende bacterie, welk organisme aanleiding gaf tot het ontstaan van hogere vetzuren, vooral capronzuur. In die gevallen kon uiteraard de juistheid van de hierboven genoemde omzetting niet worden getoetst.

Het was om deze reden, dat ik besloot bij mijn onderzoek ter bevestiging van de door Barker verkregen resultaten niet uit te gaan van aethylalcohol, doch van propylalcohol en iso-propylalcohol als substraat. Het gelukte mij met beide substraten methaanbacteriënophooping te verkrijgen, terwijl geen storende invloeden van andere organismen bij de gezuiverde cultures optraden.

§ 2. *Ophooping en reiniging van een propylalcohol-vergistende methaanbacterie.*

Nauwmonds-stopflesschen van ± 1 l inhoud werden gevuld met het volgende, ook door Barker gebruikte medium. Aan

¹⁾ H. A. Barker, Archiv. f. Mikrobiol. 7, 404, 1936.

leidingwater, door koken van zuurstof bevrijd, werd 0,1 % ammoniumchloride, 0,04 % dikaliumphosfaat, 0,01 % magnesiumchloride en 2 % calciumcarbonaat toegevoegd. Na afkoeling tot $\pm 30^{\circ}$ C. werd 1 % propylalcohol toegevoegd, waarna de pH met 8 %-ig zoutzuur op 7,0 werd gebracht. De met dit medium aldus gevulde flesschen werden met ongeveer 50 cm³ riool- of slootmodder geënt en bij 30° C. bebroed.

Veelal trad na 24 uur reeds gasontwikkeling op, alhoewel nog slechts spaarzaam. Na ongeveer één tot twee weken cultiveren, gedurende welken tijd een behoorlijke gasontwikkeling plaats vond, werden de flesschen overgeënt door 10 cm³ van het grauwwarte sediment bestaande uit een mengsel van krijt en modder in nieuwe 1 l flesschen gevuld met hetzelfde medium over te brengen. Hierbij was er van te voren voor gezorgd, het medium zooveel mogelijk van de laatste sporen zuurstof te bevrijden, hetgeen werd bereikt door aan iedere 100 cm³ medium 3 cm³ van een oplossing, die 1 % Na₂S bevatte, toe te voegen. Bovendien werden eveneens 3 cm³ van een 5 % natriumcarbonaat oplossing toegevoegd. Ook nu weer werd met 8 % zoutzuur de pH op 7,0 gebracht. De hierbij gevormde zwavelwaterstof nam de zuurstof weg, terwijl de kleine hoeveelheid natriumcarbonaat volgens Barker gewenscht is om voldoende opgelost koolzuur in het medium te verkrijgen, hetwelk het aanslaan en doorzetten van de gisting zou vergemakkelijken. Door deze wijze van overenten eenige malen te herhalen, krijgt men op den duur een sterk gezuiverde cultuur (Barker's „purified culture"). Nadat dit eenige malen was gebeurd, werd inplaats van over te enten de cultuurvloeistof van het krijtsediment afgeschonken en door een opgeschonken versch cultuurmedium vervangen. Bijna altijd was in die gevallen de gisting na één uur al weer duidelijk merkbaar. Vooral op deze wijze konden goede propylalcohol-vergistende cultures worden verkregen.

Bij het microscopisch onderzoek van het sediment nam ik dunne, flauw gebogen staafjes van wisselende lengte waar, welke geheel overeenkwamen met de door Barker¹⁾ bij de vergisting van aethylalcohol beschreven organismen. Echter was er dit verschil, dat de door dezen onderzoeker veelal waargenomen sporevormende bacterie geheel afwezig was.

§ 3. *De kwalitatieve analyse van de producten der propylalcohol-vergisting.*

Reeds terstond bleek mij, dat ik wat het koolzuurgehalte van het gistingsgas betrof dezelfde ervaring opdeed als Barker bij

1) H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 8, 415, 1937.

zijn methaangisting van aethylalcohol. Het bij deze gisting gevormde gas was namelijk arm aan koolzuur en naarmate de gisting voortschreed, nam het koolzuurgehalte nog steeds meer af. Zoo vond Barker voor het bij een aethylalcoholvergisting geproduceerde gistingsgas de volgende cijfers:

gistingsduur in dagen	1	2	6	11	21	30
% CO ₂	12.7	10.2	8.0	6.2	3.5	3.3
% CH ₄	87.3	89.8	92.0	93.8	96.5	96.7

Bij een der propylalcoholvergistingen, werden door mij bij de opeenvolgende analyses voor de samenstelling van het gistingsgas de volgende getallen gevonden:

gistingsduur in dagen	13	20	30	44	60
% CO ₂	9.7	7.3	5.3	3.7	2.6
% CH ₄	90.3	92.7	94.7	96.3	97.4

Bij een volledige vergisting van propylalcohol tot koolzuur en methaan zou men volgens de vergelijking:



uiteindelijk een gas van de samenstelling: 25 % koolzuur en 75 % methaan mogen verwachten. Het bleek evenwel, dat het geproduceerde gas inplaats van rijker, steeds armer werd aan koolzuur, hetwelk kennelijk een gevolg was van de steeds verder voortschrijdende reductie van het aanwezige koolzuur. Evenals Barker dit voor de methaangistingen van aethylalcohol en butylalcohol heeft vastgesteld, vond dus klaarblijkelijk in mijn proefnemingen met propylalcohol een onvolledige vergisting plaats. Om deze reden besloot ik na te gaan of bij de door mij bestudeerde gisting uit propylalcohol propionzuur was ontstaan.

Nadat de gasontwikkeling had opgehouden, werd een gedeelte van de gistingsvloeistof van het overgebleven kruit afgefiltreerd en aangezuurd met 25 % zwavelzuur tot pH = 3 en aan een stoomdestillatie onderworpen. Het destillaat werd met 0,1 n bariumhydroxyde geneutraliseerd en daarna op een waterbad ingedampt en gebruikt voor het uitvoeren van een destillatie volgens Duclaux.

De gevonden waarden, uitgedrukt in % van de eerste overgedestilleerde 100 cm³, zijn in de kolommen 2 en 3 van Tabel I weergegeven, terwijl de voor zuiver propionzuur bepaalde cijfers in

Tabel I.

Duclaux-destillatie van het bij de vergisting van propylalcohol gevormde vluchtige zuur.

aantal cm ³ overgedest. vloeistof	1ste bepaling	2de bepaling	zuiver propionzuur
20 cm ³	23.7	23.7	24.1
40 "	45.4	45.7	46.5
60 "	65.9	66.2	66.2
80 "	84.5	84.7	85.1
100 "	100.0	100.0	100.0

kolom 4 zijn vermeld. Hieruit kunnen we dus concluderen, dat het bij de methaangisting van propylalcohol gevormde zuur praktisch zuiver propionzuur is.

Bovendien werd het gevormde zuur ook nog microchemisch als propionzuur geïdentificeerd en wel:

1°. als het Ba-zout¹⁾. De afgefilterde gistingsvloeistof die dus calciumpropionaat zou moeten bevatten werd ingedampt. Op een druppel van deze vloeistof werd nu gereageerd met een verzadigde Ba-acetaat oplossing, waarna zwak aangezuurd met een 10 % azijnzuuroplossing. Hierbij ontstonden de karakteristieke pseudo-octaëders van bariumpropionaat.

2°. als mercuro-zout. Deze reactie werd uitgevoerd op de door Klein en Wenzel²⁾ aangegeven wijze. Volgens deze onderzoekers is de reactie zeer specifiek voor propionzuur. Ik kreeg inderdaad na toevoeging van mercuro-nitrat de prachtige, sterk vertakte kristalletjes van mercuro-propionaat geheel overeenkomstig de door genoemde auteurs gegeven tekening.

Andere gistingsproducten konden kwalitatief niet worden aangetoond.

§ 4. *De kwantitatieve analyse van de methaangisting van propylalcohol in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat.*

Een nauwmonds-stopflesch van bekenden inhoud (circa 1 liter) werd met het in § 2 genoemde medium gevuld en na met het

¹⁾ Behrens-Kley, Organische-Mikrochemische Analyse, 2te Aufl. Leipzig, 1922, p. 317.

²⁾ G. Klein und H. Wenzel, Mikrochemie 11, 91 u. 120, 1932.

sediment van een goed gistende cultuur te zijn geënt bij 30° C. geplaatst. Nadat in deze flesch een goede gisting was ontstaan, werden hieruit monsters genomen, waarbij er voor zorg was gedragen, dat het op den bodem liggende calciumcarbonaat door schudden zoo goed mogelijk in het cultuurmedium was gesuspenderd. In het geheel werden twee monsters genomen van 25 cm³ voor een duplo-koolzuurbepaling, twee monsters van 30 cm³ voor een duplo-propylalcoholbepaling en een monster van 100 cm³ ter bepaling van het propionzuur. Hiermede was de begintoestand van de nu voortgezette gisting kwantitatief vastgelegd. De overgebleven cultuurvloeistof werd met uitgekookt gedestilleerd water tot de op de flesch gemaakte inhoudsstreep aangevuld en het geheel, door middel van een doorboorde rubberstop voorzien van een glazen buisje waaraan een vacuumslang, verbonden met een gasburet, waarin zich kwik als afsluitvloeistof bevond.

Nadat de gasontwikkeling had opgehouden — in sommige gevallen ook eerder — werden opnieuw monsters van het medium genomen ter bepaling van het daarin aanwezige koolzuur, propylalcohol en propionzuur, terwijl tevens het gasvormige koolzuur en het methaan kwantitatief werden bepaald. Op deze wijze was dus ook de eindtoestand van de gisting vastgelegd.

Uit deze op bovenstaande wijze verkregen gegevens kon dan een kwantitatief verband worden gelegd tusschen de tijdens de gisting verdwenen hoeveelheid koolzuur en propylalcohol eenerzijds en de gevormde hoeveelheden methaan en propionzuur anderzijds.

De kwantitatieve bepaling der verschillende producten geschiedde als volgt:

a. *Koolzuur*. De hoeveelheid koolzuur in de gistingsvloeistof werd bepaald op de wijze, zooals deze door Braak¹⁾ is beschreven en welke hierop neerkomt, dat de totale hoeveelheid koolzuur met behulp van 25 % zwavelzuur en koolzuurvrije lucht uit het genomen monster werd uitgedreven en in een kali-apparaatje opgevangen en gewogen.

b. *Propylalcohol*. Daar mij op het moment van dit onderzoek geen goede methode bekend was om langs een niet al te omslachtigen weg propylalcohol in kleine concentraties, zooals die aanwezig zijn in het destillaat van het monster van de gistingsvloeistof, te bepalen, heb ik op de volgende manier getracht dit doel zoo goed mogelijk te bereiken. De gebruikte methode is analoog aan de bepaling van aethylalcohol volgens Northrop²⁾.

¹⁾ H. R. Braak, Onderzoekingen over vergisting van glycerine, Delft, 1928, p. 67 en 68.

²⁾ J. H. Northrop, Journ. of Biol. Chem. 39, 1, 1919.

In een drukfleschje van $\pm 100 \text{ cm}^3$ inhoud brengt men 15 cm^3 0,2 n kaliumbichromaat, daarna 10 cm^3 van de propylalcoholoplossing; tenslotte voegt men 20 cm^3 50 % zwavelzuur toe, sluit het fleschje en schudt goed door. Het fleschje wordt vervolgens gedurende 45 minuten in een kokend waterbad verhit. Na afloop hiervan koelt men het fleschje snel af door het in een bekersglas met koud water te plaatsen. De inhoud wordt daarna in een Erlenmeyer van 500 cm^3 gebracht, 10 cm^3 10 % kaliumjodide toegevoegd, met gedestilleerd water aangevuld tot ongeveer 300 cm^3 en daarna met 0,1 n natriumthiosulfaat getitreerd. Het bleek nu, dat het bichromaatverbruik groter was dan met de oxydatie van een afgemeten hoeveelheid propylalcohol tot propionzuur overeenkomt. Het was daarom noodig een empirische factor, welke de verhouding tusschen het bichromaatverbruik of wat het zelfde blijft: het verbruik aan 0,1 n thiosulfaat en de hoeveelheid propylalcohol aangeeft, te bepalen. De volgende betrekking bleek nu te gelden: hoeveelheid propylalcohol in mgr = verschil in aantal cm^3 0,1 n natriumthiosulfaat tusschen blanco en bepaling $\times 1,19$. Dit bleek juist te zijn voor oplossingen, waarvan het gehalte aan propylalcohol varieerde tusschen 8 en 24 mgr per 10 cm^3 . Hierbij werden namelijk de volgende waarden gevonden:

hoeveelheid propylalcohol in mgr. per 10 cm^3	gevonden factor
8.04	1.19
12.06	1.20
16.08	1.19
24.12	1.17

De grootste onderlinge afwijking bedroeg dus 1,7 %.

Voor de kwantitatieve bepaling van de propylalcohol werd daarom van een zoodanig gedeelte van de minerale gistingsvloeistof de propylalcohol afgedestilleerd en in een maatkolffje opgevangen, dat de sterkte van het tot de maatstreep aangevulde destillaat tusschen de hierboven genoemde grenzen lag.

c. *Propionzuur*. Een deel van de gistingsvloeistof werd van het aanwezige calciumcarbonaat afgefiltreerd en het propionzuur na aanzuring met 25 % zwavelzuur tot een $\text{pH} = 3$ overgestoomd en met 0,1 n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ op phenolphthaleïne getitreerd. Een deel van dit stoomdestillaat werd gebruikt voor een destillatie volgens Duclaux om gelijktijdig aan te toonen, dat steeds propionzuur als eenig vluchtig zuur was ontstaan.

d. *Het ontwikkelde gas.* De volumetrische analyse hiervan geschiedde als volgt: een gedeelte van de gemeten hoeveelheid gistingsgas werd in een gasburet gebracht en hieraan met behulp van een met geconcentreerd kaliloog gevulde pipet het koolzuur onttrokken. De volumevermindering geeft de hoeveelheid koolzuur weer; het restant werd met overmaat zuurstof gemengd en tot explosie gebracht in een explosieburet volgens Hempel, waarin zich dus de volgende omzetting voltrekt:



De halve volumecontractie geeft dus de hoeveelheid methaan, terwijl de na explosie gevonden hoeveelheid koolzuur eveneens het volume van het oorspronkelijk aanwezige methaan weergeeft. Deze beide waarden voor het methaan stemden steeds goed overeen. Volgens de analyses waren andere gassen in het gistingsgas niet aanwezig. De gevonden waarden voor het koolzuur en het methaan werden omgerekend op 760 mm Hg en 0° C.

Achtereenvolgens werden drie kwantitatieve gistingsbalansen voor propylalcohol opgemaakt, waarin resp. 27,4, 78,4 en 111,5 millimolen propylalcohol tot vergisting kwamen. De resultaten zijn weergegeven in de Tabellen II, III en IV.

In deze tabellen is in kolom 2 en 3 de begintoestand, en in 4 en 5 de eindtoestand, zooals die uit de kwantitatieve analyses is berekend, weergegeven. Kolom 6 geeft de verandering in millimolen weer, terwijl in kolom 7 en 8 de verandering in grammen is weergegeven, waarbij in kolom 8 als basis voor de theoretische berekening de verdwenen hoeveelheid propylalcohol is genomen.

De voornaamste conclusies, welke uit deze gegevens zijn te trekken, zijn de volgende:

a. tijdens de gisting is er behalve propylalcohol een groote hoeveelheid koolzuur verdwenen, terwijl er propionzuur en methaan is gevormd.

b. blijkens de gegevens uit kolom 6 is de hoeveelheid propylalcohol die verdwenen is, uitgedrukt in millimolen, gelijk aan de gevormde hoeveelheid propionzuur, terwijl de gevormde hoeveelheid methaan uitgedrukt in millimolen overeenkomt met de verdwenen hoeveelheid koolzuur. Elk molecuul methaan is zonder twijfel door reductie van een molecuul koolzuur ontstaan en elk molecuul propionzuur door oxydatie van een molecuul propylalcohol.

c. de gevonden verhouding tusschen het aantal millimolen verbruikt propylalcohol en het aantal millimolen geproduceerd methaan is volgens deze tabellen voor de drie proefnemingen resp. 1,9, 2,1 en 2,1; deze stemmen dus goed met de theoretische waarde van 2,0 overeen.

Tabel II.

Gistingsbalans eener methaangisting van propylalcohol

(27,4 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
C ₃ H ₇ OH	4.30	71.7	2.66	44.3	— 27.4	— 1.64	— 1.64
C ₂ H ₅ COOH	2.02	27.3	4.16	56.2	+ 28.9	+ 2.14	+ 2.02
CO ₂	7.39	165.7	6.63	150.7	— 15.0	— 0.66	— 0.60
CH ₄	—	—	0.23	14.1	+ 14.1	+ 0.23	+ 0.22

Tabel III.

Gistingsbalans eener methaangisting van propylalcohol

(78,4 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
C ₃ H ₇ OH	4.88	81.4	0.18	3.0	— 78.4	— 4.70	— 4.70
C ₂ H ₅ COOH	2.04	27.6	7.80	105.4	+ 77.8	+ 5.76	+ 5.80
CO ₂	3.00	68.3	1.22	27.7	— 40.6	— 1.79	— 1.73
CH ₄	—	—	0.58	36.5	+ 36.5	+ 0.58	+ 0.63

Tabel IV.

Gistingsbalans eener methaangisting van propylalcohol

(111,5 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
C ₃ H ₇ OH	6.69	111.5	—	—	— 111.5	— 6.69	— 6.69
C ₂ H ₅ COOH	1.03	13.9	9.17	123.9	+ 110.0	+ 8.14	+ 8.25
CO ₂	2.82	64.2	0.45	10.2	— 54.0	— 2.37	— 2.46
CH ₄	—	—	0.85	53.1	+ 53.1	+ 0.85	+ 0.89

Het reactieschema van deze methaangisting luidt dus:



Vorming van hoogere vetzuren, zooals die door Barker bij de methaangisting van aethylalcohol werd waargenomen en welke aan de reeds beschreven nevenwerking van een sporevormende bacterie in het sediment te danken was, werd bij de boven beschreven propylalcoholvergisting niet aangetroffen.

§ 5. *Ophooping en reiniging van een isopropylalcoholvergistende methaanbacterie.*

Alhoewel de methaangisting van propylalcohol, in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat, reeds door een grooten eenvoud is gekarakteriseerd — de primaire alcoholgroep wordt hierbij immers onder opneming van een molecuul water en afstaan van vier waterstofatomen tot de carboxylgroep gedehydrogeneerd — zou eventueel de methaangisting van een secundaire alcohol, zooals isopropylalcohol, een nog simpeler schema kunnen opleveren. Een dergelijk molecuul zou louter door het afstaan van twee waterstofatomen, dus zonder de medewerking van watermoleculen, in een keton kunnen overgaan.

Om na te gaan in hoeverre deze mogelijkheid zich laat verwezenlijken, heb ik getracht een „purified culture” te verkrijgen, welke in staat was isopropylalcohol te dehydrogeneeren tot aceton, onder gelijktijdige reductie van het koolzuur tot methaan.

Te dien einde werden ophoopingingen ingezet in het volgende minerale medium: leidingwater + 0,1 % ammoniumchloride + 0,04 % dikaliumphosfaat + 0,01 % magnesiumchloride. Na het uitkoken van de zuurstof werd hieraan 0,5 % natriumbicarbonaat en 1 % isopropylalcohol toegevoegd, waarna de pH wederom op 7,0 werd gebracht. Aangezien er bij deze gisting vermoedelijk geen zuren zouden worden gevormd werd ditmaal dus geen calciumcarbonaat maar natriumbicarbonaat als koolzuurbron gebruikt. Om toch een goed sediment voor de methaanbacteriën te verkrijgen werd zeer fijn gemalen asbest tijdens het uitkoken van het medium toegevoegd. Dit asbest werd verkregen door vermalen van langvezelige asbest in een Peppink-molen. Het bleek, dat er per liter medium slechts eenige honderden milligrammen van dit product noodig waren om een ± 2 cm dikke sedimentlaag te krijgen. Tijdens het uitkoken van het medium werd dit asbest in zulke fijne vezeltjes verdeeld, dat het zelfs bij het pipetteeren voor het bemonsteren van de gistingsvloeistof geen last veroorzaakte.

Een nauwmonds-stopflesch van 1 l met dit medium gevuld,

werd geënt met $\pm 20 \text{ cm}^3$ rioolmodder. Reeds na enkele dagen was er een goede gasontwikkeling en na twaalf dagen kon de cultuur reeds in een nieuwe flesch gevuld met hetzelfde medium worden overgeënt. Daartoe werd met een pipet $\pm 10 \text{ cm}^3$ van de vlokkige asbestsedimentlaag in een nieuwe flesch met hetzelfde minerale medium gevuld gebracht, welke op de wijze, zooals dit in § 2 voor de propylalcoholvergistingen is beschreven, zuurstofvrij was gemaakt. Door deze overenting nog eenige malen te herhalen, werd een „purified culture” van het isopropylalcohol-vergistend organisme verkregen.

Bij het microscopeeren bleek het sediment talrijke, min of meer flauw gebogen staafjes van wisselende lengte te bevatten. Ongetwijfeld was er een sterke overeenkomst met de organismen, welke in het sediment van de propylalcoholgisting voorkwamen.

§ 6. *De kwalitatieve analyse van de producten der isopropylalcohol-vergisting.*

Het bleek al spoedig, dat het bij de isopropylalcoholgisting ontwikkelde gas voor bijna 100 % uit methaan bestond, hetgeen trouwens wel te verwachten was. Immers het medium wordt tijdens de gisting ten gevolge van de onttrekking van koolzuur noodig voor de reductie tot methaan steeds meer alkalisch, terwijl bovendien hier, in tegenstelling met hetgeen voor de propylalcoholgisting geldt, geen zuur, dus ook geen neutralisatie-koolzuur ontstaat. De concentratie van het koolzuur neemt dus snel af en methaan is het eenige ontwikkelde gas.

Van 250 cm^3 uitgiste vloeistof werden de vluchtige producten, door destillatie met behulp van een spijkeropzet, in 50 cm^3 geconcentreerd en in deze vloeistof op het te verwachten aceton gereageerd. Het was namelijk reeds gebleken, dat in een proefje van de gistingsvloeistof na toevoeging van het zoutzure zout van 2,4-dinitrophenylhydrazine zich een dik geel neerslag vormde. Dit wees dus op de aanwezigheid van een keton.

Op het destillaat werden de volgende reacties op aceton uitgevoerd.

1°. De jodoformreactie volgens Gunning¹⁾. Toevoeging van jodiumtinctuur en ammoniak aan het destillaat geeft bij aanwezigheid van aceton reeds in de koude CHJ_3 . Isopropylalcohol vertoont deze reactie niet.

2°. De reactie van Légal²⁾. Aan 1 cm^3 van het destillaat voegt men toe vijf druppels versch bereide nitroprussidnatrium-

¹⁾ Zie bijv. L. Rosenthaler, *Der Nachweis organischer Verbindungen*, Stuttgart, 1914, p. 153.

²⁾ L. Rosenthaler, *l.c.* p. 155.

oplossing en 1 cm³ 15 % natriumhydroxyde-oplossing. Er ontstaat dan een robijnroode kleur, die met overmaat 10 % azijnzuur, in violet omslaat.

3°. De reactie van Frommer¹⁾. Bij 1 cm³ van het destillaat voegt men 1 g vast kaliumhydroxyde en daarna 10 druppels salicylaldehyde en verwarmt tot 70° C. Men ziet dan het vast kaliumhydroxyde aan den rand een purperroode kleur krijgen. Na het in oplossing gaan van het kaliumhydroxyde ontstaat er uiteindelijk een karmozijnroode vloeistof.

Al deze drie reacties op aceton vielen positief uit. Bij nader onderzoek bleken andere gistingsproducten, zooals vluchtige zuren in het uitgediste medium niet aanwezig te zijn.

§ 7. De kwantitatieve analyse van de methaangisting van isopropylalcohol.

Een nauwmonds-stopflesch van ongeveer 1 l inhoud werd met het in § 5 vermelde medium gevuld en daarna met 10 cm³ van een goed gistende cultuur geënt en bij 30° C. geplaatst. Nadat de gisting goed op gang was gekomen, werden de volgende monsters ter bepaling van den begintoestand genomen: twee van 30 cm³ voor een duplo koolzuurbepaling en twee monsters van 80 cm³ voor de isopropylalcohol- en acetonbepaling. Hierna werd de gistingsvloeistof weer met uitgekookt gedestilleerd water aangevuld en de flesch aangesloten aan een gasburet volgens Harden. Nadat de gisting tot stilstand was gekomen, hetgeen meestal na drie weken het geval was, werd ter bepaling van den eindtoestand in 2 × 40 cm³ gistingsvloeistof een duplo koolzuurbepaling uitgevoerd en in 2 × 80 cm³ in duplo isopropylalcohol en aceton bepaald.

De kwantitatieve bepaling der verschillende verbindingen was als volgt:

a. *Koolzuur*. Dit werd op dezelfde wijze bepaald als bij de kwantitatieve vergisting van propylalcohol.

b. *Isopropylalcohol*. Deze bepaling werd uitgevoerd overeenkomstig de door v. d. Lek²⁾ beschreven methode. Deze komt hierop neer, dat de isopropylalcohol eerst door middel van een bichromaat-zwavelzuurmengsel wordt geoxydeerd tot aceton en dit aceton hierna met 2,4-dinitrophenylhydrazine gravimetrisch wordt bepaald.

c. *Aceton*. Ook deze bepaling werd op de door van der Lek (l.c.) aangegeven wijze verricht. Alleen ondervond ik bij de

¹⁾ L. Rosenthaler, l.c. p. 155.

²⁾ J. B. van der Lek, Onderzoekingen over butylalcoholgisting, Diss. Delft, 1930, p. 30.

uitvoering van de bepaling de volgende moeilijkheid. Wanneer de oplossing van het zoutzure zout van 2,4-dinitrophenylhydrazine aan de acetonhoudende oplossing werd toegevoegd en 15 min. werd gewacht om het neerslag zich te laten vormen, kreeg dit soms een eenigszins roodachtig inplaats van een helgeel uiterlijk, hetgeen een gevolg bleek te zijn van de vorming van kleine roode kristalletjes. Deze waren blijkbaar niet van het 2,4-dinitrophenylhydrazon afkomstig en gaven bij contrôle-bepalingen afwijkende uitkomsten. Dezelfde roode kristalletjes ontstonden ook bij afkoeling van het versch bereide reagens. De beste bereiding van het reagens bleek die, waarbij 25 % zoutzuur aan de kook werd gebracht en het 2,4-dinitrophenylhydrazine in kleine hoeveelheden werd toegevoegd. Daarna liet ik even doorkoken en koelde vervolgens af. Wanneer zich nu eventueel nog donkerroode kristalletjes vormden, werden deze afgefiltreerd. Het reagens moet nog denzelfden dag worden gebruikt.

Achtereenvolgens werd het kwantitatieve verloop van drie isopropylalcohol-methaangistingen nagegaan, waarin resp. 19,3, 25,3 en 34,3 millimolen isopropylalcohol tot vergisting kwamen. Voor de balansen vergelijkte met de Tabellen V, VI en VII.

Uit deze gegevens blijkt:

a. Er is tijdens de gisting isopropylalcohol verdwenen benevens een hoeveelheid koolzuur, terwijl zich aceton en methaan hebben gevormd.

b. Indien men in kolom 6 de verandering in millimolen van de onder a. genoemde verbindingen nagaat, dan blijkt dat de verdwenen hoeveelheid isopropylalcohol gelijk is aan de gevormde hoeveelheid aceton, terwijl de verdwenen hoeveelheid koolzuur overeenkomt met de gevormde hoeveelheid methaan.

c. Het reactieverloop:

$4 \text{ CH}_3\text{CHOH.CH}_3 + \text{CO}_2 \longrightarrow 4 \text{ CH}_3\text{CO.CH}_3 + \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
eischt, dat voor elke vier isopropylalcoholmoleculen, welke verdwijnen, één molecuul methaan wordt gevormd. Dit wordt door de gistingsbalansen geheel bevestigd; er werd toch voor deze verhouding resp. gevonden: 4,5, 4,0 en 4,2. De overeenstemming is dus alleszins bevredigend te noemen.

Aan de gegevens van tabel V, VI en VII is bovendien nog de volgende bijzonderheid te ontleenen. De hoeveelheid aceton in den eindtoestand, dus op het moment waarop de gistingen tot stilstand kwamen, bleek in alle drie de gevallen even groot te zijn. Neemt men het volume van de gistingsflesschen in aanmerking, dan is zooals uit tabel VIII blijkt, de eindconcentratie van het aceton in het cultuurmedium resp.: 0,28 %, 0,27 % en 0,27 %.

Tabel V.

Gistingsbalans eener methaangisting van isopropylalcohol

(19,3 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
iso-C ₃ H ₇ OH	4.17	69.4	3.00	50.1	— 19.3	— 1.17	— 1.16
CH ₃ COCH ₃	1.81	31.2	2.89	49.9	+ 18.7	+ 1.09	+ 1.12
CO ₂	2.00	45.4	1.80	41.0	— 4.4	— 0.20	— 0.21
CH ₄	—	—	0.07	4.3	+ 4.3	+ 0.07	+ 0.08

Tabel VI.

Gistingsbalans eener methaangisting van isopropylalcohol

(25,3 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
iso-C ₃ H ₇ OH	5.05	84.1	3.53	58.8	— 25.3	— 1.52	— 1.52
CH ₃ COCH ₃	1.32	22.7	2.86	49.3	+ 26.6	+ 1.54	+ 1.47
CO ₂	1.93	43.9	1.64	37.4	— 6.5	— 0.29	— 0.28
CH ₄	—	—	0.10	6.3	+ 6.3	+ 0.10	+ 0.10

Tabel VII.

Gistingsbalans eener methaangisting van isopropylalcohol

(34,3 millimol)

	Begintoestand in		Eindtoestand in		Verandering in millimolen	Verschil in grammen	
	gram- men	milli- molen	gram- men	milli- molen		experi- menteel	theo- retisch
iso-C ₃ H ₇ OH	4.81	80.2	2.75	45.9	— 34.3	— 2.06	— 2.06
CH ₃ COCH ₃	0.98	17.0	2.87	49.6	+ 32.6	+ 1.89	+ 1.99
CO ₂	1.90	43.0	1.49	33.8	— 9.2	— 0.41	— 0.38
CH ₄	—	—	0.13	8.1	+ 8.1	+ 0.13	+ 0.14

Aangezien er nog voldoende hoeveelheden isopropylalcohol en koolzuur aanwezig zijn, moet men welhaast aannemen, dat een concentratie grooter dan 0,27 % aceton de gisting remt.

Tabel VIII.

Eindconcentratie van aceton bij de methaangisting van isopropylalcohol.

Tabel	hoeveelheid aceton in de eindtoestand in grammen	volume van de gebruikte gistings- flesch in cm ³	de concentratie van aceton in %
V	2.89	1050	0.28
VI	2.86	1060	0.27
VII	2.87	1080	0.27

§ 8. *Samenvatting.*

Het bleek mogelijk door juist gekozen cultuurvoorwaarden resp. met propylalcohol en isopropylalcohol als substraat, methaanbacteriënophooping te verkrijgen, welke zeer eenvoudige dehydrogenatie-reacties der genoemde substraten teweeg brachten en waarbij de op deze wijze verkregen waterstof het koolzuur volledig tot methaan hydrogeneerde.

De met deze gezuiverde methaancultures verrichte kwantitatieve proefnemingen hebben uitkomsten gegeven, welke een volkomen bevestiging zijn van de door B a r k e r als eerste uitgevoerde experimenten ter staving van de koolzuurreductie-theorie der methaangisting.

Hierbij moge worden aangeteekend, dat de boven beschreven resultaten, meer in het bijzonder ook de opmerkelijke vergisting van isopropylalcohol onder vorming van aceton, reeds in 1938 waren verkregen, zooals moge blijken uit de vermelding ervan in een door Prof. K l u y v e r in Maart 1939 te Helsinki gehouden voordracht¹⁾.

¹⁾ Vergel.: A. J. K l u y v e r, Suomen Kemistilehti 12, 81, 1939.

HOOFDSTUK III.

DE ISOLATIE EN DE BELANGRIJKSTE EIGENSCHAPPEN DER GEBRUIKTE REINCULTURES.

§ 1. *Methanobacterium Omelianskii* Barker.

In dit hoofdstuk zal het noodige worden medegedeeld aangaande de isolatie en de eigenschappen van de drie reincultures, welke in de Hoofdstukken IV, V en VII voor de beantwoording van eenige speciale vraagpunten van mijn werkprogramma zijn gebezigd.

In de eerste plaats wil ik hier een en ander vermelden over *Methanobacterium Omelianskii*, het eerste methaanproducerende organisme, waarvoor voldoende vaststaat, dat het in reincultuur is verkregen.

In 1936 slaagde Barker¹⁾ er in een reincultuur van dit organisme te verkrijgen. Voor de wijze, waarop hij dit resultaat bereikte, wordt naar de desbetreffende publicatie verwezen. Hoewel hijzelf ten opzichte van de reinheid van zijn cultuur toentertijd nog eenige reserve in acht nam, is achteraf wel komen vast te staan, dat het gemaakte voorbehoud overbodig voorzichtig is geweest.

In Juli 1939 ontving ik van Barker een overenting van een door hem geïsoleerde reincultuur van *Mb. Omelianskii*. Deze werd door mij direct na ontvangst in het volgende medium overgeënt: leidingwater waaraan toegevoegd 1 % dikaliumphosfaat, 0,05 % ammoniumchloride en 0,05 % magnesiumsulfaat. Na het steriliseren werd per 100 cm³, 8 cm³ van een 10 % natriumcarbonaat-oplossing, 1 cm³ van een 1 % natriumsulfide-oplossing en 1 cm³ 96 % aethylalcohol toegevoegd. Met 8 % zoutzuur werd de pH op 7,0 ingesteld. De met dit medium gevulde buizen volgens Hall gaven een wit vlokkelig sedimentlaagje te zien van ongeveer 1 cm dik, hoofdzakelijk bestaande uit calciumphosfaat.

Acht dagen na enting waren de organismen, welke iets meer dan één maand in de toegezonden buis waren geweest, in dit medium aangeslagen. Het organisme werd door regelmatige overenting, telkens na een achttal dagen, in deze buizen aangehouden.

Nadat mijn onderzoekingen over *Mb. Omelianskii* reeds waren afgesloten, verscheen in 1940 nog een publicatie van Barker²⁾, waarin deze nadere bijzonderheden aangaande de reincultuur van *Mb. Omelianskii* mededeelt.

Zoo leidde een uitvoerig onderzoek naar de levensvoorwaarden voor dit organisme o.a. tot de samenstelling van het volgende, voor

¹⁾ H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 7, 420, 1936.

²⁾ H. A. Barker, Ant. v. Leeuwenhoek 6, 201, 1940.

de cultiveering optimale medium: leidingwater, 0,6 % dikaliumphosphaat, 0,9 % kaliumdihydrophosphaat, 0,03 % ammoniumsulfaat, 0,01 % magnesiumsulfaat, 0,001 % ferrosulfaat en 1 % van een verzadigde calciumsulfaatoplossing. Na sterilisatie werd 1–2 cm³ van een 1 % natriumsulfide- en 5–8 cm³ van een 5 % natriumcarbonaatoplossing, beide versch gesteriliseerd, per 100 cm³ medium toegevoegd. De eind-pH van dit medium bedraagt dan 7,4–7,7.

Met succes maakte Barker bij het aanhouden der rein-cultures gebruik van halfvaste agarmedia, d.w.z. media, waaraan 0,3 % agar was toegevoegd. Op deze wijze kon in niet tegen de zuurstof-inwerking beveiligde buizen worden gewerkt, indien deze buizen althans direct na het steriliseeren in de autoclaaf zwaar werden geënt. Bovendien bleek het volgende: het cultiveeren van methaanorganismen in vloeistofmedia was tot nu toe gebonden aan de gelijktijdige aanwezigheid van een zekere hoeveelheid sediment-materiaal, zooals asbest of krijt. Het kwam nu vast te staan dat *Mb. Omelianskii* zeer goed gedijt in een minerale oplossing zonder eenige merkbare hoeveelheid sediment. De vloeistof was in dergelijke buizen, in tegenstelling tot de gevallen, waarin wel een sediment werd toegevoegd en waarbij de vloeistof helder bleef, egaal troebel, d.w.z. de methaanbacteriën groeiden door de geheele vloeistof heen.

Wat de biochemische eigenschappen van *Mb. Omelianskii* betreft stelde Barker¹⁾ later nog vast, dat deze beperkt blijven tot de dehydrogenatie van primaire en secundaire alcoholen tot de overeenkomstige vetzuren en ketonen. Andere organische verbindingen zooals vetzuren, melkzuur, barnsteenzuur, glucose, glycerol, mannitol en 2-3-butyleenglycol werden in het geheel niet aangetast. Voor het afwijkend gedrag ten opzichte van mierenzuur onder zeer speciale voorwaarden zij naar Hoofdstuk I, § 3 verwezen.

§ 2. Ophooping van mesophile en thermophile methylalcohol-vergistende methaanbacteriën.

Om de in de Inleiding uiteengezette redenen was het gewenscht de beschikking te krijgen over een reincultuur van een methaanbacterie, welke in staat was een verbinding met één koolstofatoom te vergisten.

Gezien de gunstige resultaten, welke Groenewege (l.c.) bij de vergisting van methylalcohol had verkregen, leek het aangewezen ophoopingsproeven met dit substraat in te zetten. Hiertoe werd allereerst een medium van de volgende samenstelling bereid: leidingwater, 0,1 % ammoniumchloride, 0,04 % dikaliumphosphaat,

¹⁾ H. A. Barker, Journ. of Biol. Chem. **137**, 153, 1941.

0,01 % magnesiumchloride en 500 mg fijn gemalen asbest per liter toegevoegd. Dit medium werd door uitkoken van de opgeloste zuurstof bevrijd en hieraan werd toegevoegd 3 cm³ van een 1 % natriumsulfide-oplossing per 100 cm³ medium en 1,5 % methylalcohol, waarna de pH met 8 % zoutzuur op 7,0 werd gebracht.

Eenige geheel met dit medium gevulde flesschen werden respectievelijk geënt met 50 cm³ rioolmodder of slootmodder en vervolgens bij 30° geplaatst. Al spoedig, meestal na 24 uur, trad een flinke gisting op, welke na eenige malen overenten in een versch medium een zeer krachtig verloop nam. Hierbij kwam het asbest-sediment tengevolge van het zich daarin ontwikkelende en vastgehouden gistingsgas als een prop tegen de stop van de flesch drijven, terwijl bovendien het geheele medium egaal troebel werd. De vergisting bleek door een sarcina te worden teweeggebracht. Door het op en neer gaan van de asbestprop werden de sarcina's uit dit sediment in de vloeistof gesuspenderd, waardoor deze troebel werd. Indien ik in plaats van asbest krijt als sediment nam, bleef de vloeistof helder. Slechts af en toe werd door het ontsnappen van gistingsgas uit het krijt een weinig hiervan in de vloeistof gesuspenderd.

In het asbestsediment kwamen de sarcina's in ontzagelijke hoeveelheden voor. Hoewel ze niet zoo'n regelmatigen pakketvorm hadden als *Sarcina ventriculi*, waren toch meer of minder goed gevormde pakketjes niet zeldzaam.

Het gistingsgas bleek uit koolzuur en methaan te bestaan en wel in de verhouding 1 : 3; er vond dus blijkbaar een volledige vergisting van de methylalcohol plaats.

Behalve bij 30° C. werden in hetzelfde medium eveneens ophoopingingen bij 55° C. ingezet. Ook bij deze temperatuur trad gisting op. Als sediment werd weer zoowel fijngemalen asbest als calciumcarbonaat gebruikt. Het bleek al spoedig dat de gistingen, welke ook nu in 1 l flesschen werden uitgevoerd, met asbest wederom sneller verliepen dan met krijt.

Bij het microscopeeren van de thermophile sedimenten bleek het, dat deze rijk waren aan korte staafjes, welke dikwijls waren voorzien van sporen. Het staafje was aan een der uiteinden sterk verdikt en de aldaar aanwezige sporen vertoonden een sterke lichtbreking; het geheel deed denken aan een kort trommelstokje. Ook de verschillende overgangsstadia van staafje tot sporedragend staafje werden aangetroffen.

Het vermoeden was dus gewettigd, dat we hier met een sporevormend methaan-produceerend thermophil organisme te doen hadden, hetgeen ik op de volgende wijze bevestigde:

- a. door pasteuriseeren van het asbestsediment, door dit gedu-

rende 18 minuten op 75° tot 80° C. te verhitten. Ongeveer 8 cm³ sediment werden hiertoe in een steriele cultuurbuis gepasteuriseerd en daarna geheel geënt in een nauwmondsflesch gevuld met 250 cm³ van het hierbovengenoemde gesteriliseerde medium, waarna de flesch bij 55° C. werd geplaatst.

b. door ongeveer 20 cm³ sediment in een Erlenmeyer van 50 cm³ inhoud gedurende een bepaalde tijd te koken en daarna 10 cm³ hiervan te enten in een flesch met 250 cm³ steriel medium en bij 55° te plaatsen. De proef werd steeds uitgevoerd in duplo. De kooktijd, d.w.z. de tijd gedurende welke de vloeistof werkelijk kookte, dus de opwarmtijd, die voor 20 cm³ echter klein is, niet inbegrepen, was resp. 2, 2,5, 3 en 3,5 minuut. Alle acht op deze wijze voorbehandelde sedimenten gaven na enting in de hierboven beschreven flesschen binnen acht dagen een krachtige gisting te zien.

De op de onder *a* en *b* beschreven wijzen verkregen gistingen konden op dezelfde wijze weer worden overgeënt; de gistingssnelheid leed hieronder niet. Steeds gaven deze gistingen sedimenten, welke rijk waren aan sporevormende staafjes.

Het blijkt dus, dat de sporen van dit thermophile methylalcoholvergistende organisme zeer resistent zijn tegen hoge temperaturen. Dit vormt dus een tegenstelling tot hetgeen Barker¹⁾ mededeelt over het gedrag der door hem bij *Mb. Omelianskii* waargenomen sporen (Vergel. Hoofdst. I, § 1).

Een nader bewijs voor het sporevormend karakter van het bewuste organisme zijn de volgende feiten. Zooals bekend is, zijn alle tot dusver bestudeerde methaanorganismen in hooge mate zuurstofgevoelig; reeds een aan de lucht blootstellen van de cellen gedurende een korte tijd doet de cellen ten gronde gaan. Ik filtreerde nu het medium van een goed gistende cultuur van 1 l nadat het sediment vooraf goed gesuspendeerd was, door een grof glasfilter, waarbij een troebele vloeistof werd verkregen, welke rijk was aan bacteriën. De asbestvezels werden door het glasfilter tegengehouden. De gefiltreerde vloeistof werd vervolgens afgecentrifugeerd en het verkregen bacteriemateriaal eenige keren met gedestilleerd water gewasschen, waarna het centrifugaat gedurende 24 uur bij 45° C. werd gedroogd.

Op deze wijze werd een harde, glasachtige, zwak geelgekleurde bacteriemassa verkregen, welke daarna in een mortier goed werd fijngewreven. Met dit materiaal werden nu weer flesschen van 250 cm³ gevuld met het steriele medium, geënt, welke bij 55° C. werden bebroed. Na resp. zeven en twaalf dagen waren de beide

¹⁾ H. A. Barker, Ant. van Leeuwenhoek 6, 201, 1940.

geënte flesschen aangeslagen en ontstond hierin een heftige gisting. Toch bedroeg de hoeveelheid entmateriaal slechts enkele milligrammen.

Toen het op boven beschreven wijze verkregen droge bacteriemateriaal vijf weken was bewaard, werd de proef met eenzelfde hoeveelheid entmateriaal herhaald en ook nu ontstond er na resp. acht en elf dagen een vlotte gisting.

Dergelijke feiten kunnen niet anders worden verklaard, dan door aan te nemen, dat wij te doen hebben met een thermophil, methylalcoholvergistend methaanorganisme, dat in staat is sporen te vormen, welke zuurstofresistent zijn.

Helaas werden bij de pogingen tot reïncultiveeren van dit organisme bij 55° C. groote moeilijkheden ondervonden. Wel werden koloniën in agar verkregen en werd de agar door de ontstane gasvorming gespleten. Echter verkreeg door het werken bij de hooge temperatuur van 55° C. de paraffineprop altijd een weeke consistentie. Een aanvankelijke splijting van de agar verdween soms in den loop van enkele dagen, door het wegdiffundeeren van het gas en de agar sloot zich weer.

De koloniën waren meestal relatief groot, de doorsnede bedroeg ongeveer 2 à 3 mm. Bij het microscopeeren bleek het, dat zij bestonden uit talrijke korte staafjes, gedeeltelijk van sporen voorzien. De overgeënte koloniën in de kleinere agarbuisjes, gaven somtijds ook weer gasvorming te zien, maar het gedrag bij overenting was zeer wisselvallig. Soms trad wel, meestal geen zichtbare gasvorming op.

Aangezien ik op dat moment voor het gestelde doel meer heil zag in het verkrijgen van een reïncultuur van het mesophile organisme, heb ik van verdere pogingen tot isolatie van het thermophile organisme afgezien.

§ 3. Reïncultiveering en belangrijkste eigenschappen van *Methanosarcina Barkerii*.

Een bij 30° C. in het methylalcohol-medium goed gistende cultuur werd door herhaaldelijk overenten gezuiverd en daarna voor het aanleggen van reïncultures gebruikt.

In een Erlenmeyer van 250 cm³ werd 100 cm³ van het volgende medium gesteriliseerd: leidingwater met 0,1 % ammoniumchloride, 0,04 % dikaliumphosfaat, 0,01 % magnesiumchloride en 2 % uitgewassen agar. Na sterilisatie werd tot circa 50° C. afgekoeld en 3 cm³ van een 1 % natriumsulfide-oplossing en 1,5 cm³ methylalcohol toegevoegd, waarna de pH met 8 % zoutzuur op 7,0 werd gebracht.

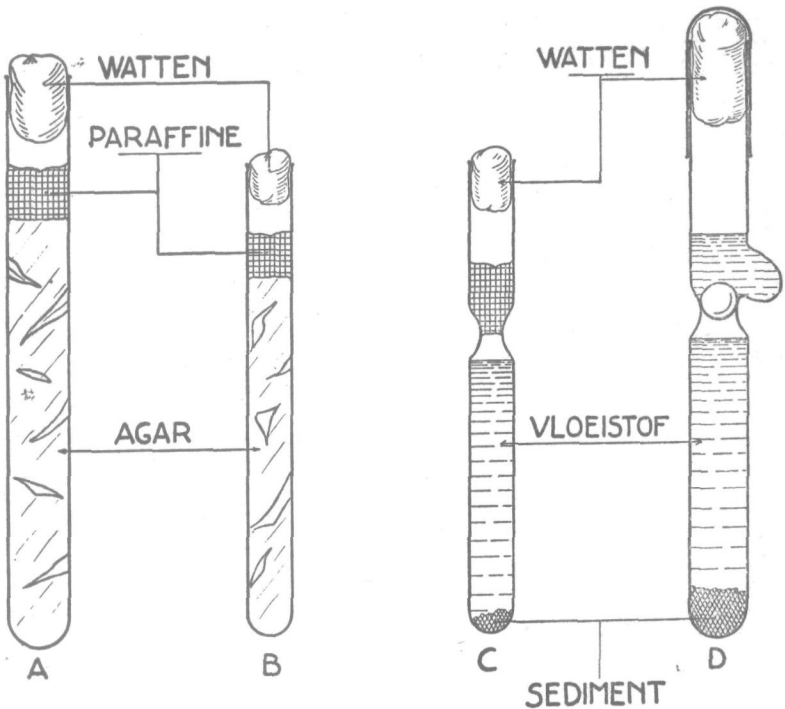


Fig. 1.

De modellen van de achtereenvolgens bij de reincultiveering van methaan-organismen gebruikte buizen. (Schaal 1 : 2)

Een zevental buizen (zie fig. 1, A) werd nu met 15 cm^3 van dit medium gevuld; de diameter der buizen was zoodanig, dat de hoogte van het medium in de buis ongeveer 10 cm bedroeg. De buizen werden daarna gezamenlijk in een bekersglas met water geplaatst, welk water op een temperatuur van 45° C . werd gehouden.

Een buis werd met 1 cm^3 sediment van de goed gistende cultuur geënt. Door op en neer bewegen van een glazen buisje, waaraan een bolletje was geblazen met een iets kleiner doorsnede dan die van de gebruikte cultuurbuis, werd het entmateriaal goed door de agar gemengd. Dit glazen roerdertje werd in 96 % alcohol bewaard en telkens voor het gebruik afgebrand en geflambeerd.

Met 1 cm^3 gesmolten agar uit deze buis werd nu een tweede buis geënt en opnieuw goed gemengd, waarna weer met 1 cm^3 gesmolten agar uit deze buis een derde buis werd geënt, en zoo achtereenvolgens nog een aantal verdere buizen.

Nadat de buizen ongeveer 15 min. in een rekje hadden gestaan

om te stollen, werd op de agar een 1 cm dikke laag van bij $\pm 45^{\circ}$ C. smeltende paraffine¹⁾ gebracht. Na het vast worden hiervan werden de buizen bij 30° C. bebroed.

Op deze wijze werden in het geheel, uitgaande van achtereenvolgens drie verschillende ophoopingscultures, van elke ophoopingscultuur vijf series van zeven buizen verkregen. Een begin van gisting verraadde zich door het splijten van de agar; steeds werd nagegaan na hoeveel tijd in een buis gisting optrad. Zodoende werden voor de drie reeksen van 5×7 buizen de in Tabel IX weergegeven gemiddelde aantallen dagen, waarna een verdunning aansloeg, vastgesteld.

Tabel IX.

Gemiddelde tijdsduur in dagen noodig voor het optreden van zichtbare gasvorming in door successievelijke overenting verkregen cultures in een methylicalcohol-agarmedium.

	1e reeks	2e reeks	3e reeks
1e verdunning	1	2	1
2e "	5	3	3
3e "	7	5	6
4e "	11	9	10
5e "	14	15	19
6e "	22	18	23

Hieruit blijkt dus, dat er weinig variatie is in het aantal dagen, waarna een bepaalde verdunning aanslaat. In maar drie van de in totaal vijftien gevallen was ook de zevende verdunning aangeslagen.

Al spoedig na het optreden van zichtbare gasvorming ontwikkelden zich nu in de hoogere verdunningen karakteristieke koloniën, welke een hoekig voorkomen hadden, wittig van kleur waren en een diameter van ongeveer 0,5 tot 1 mm bereikten. Bij het microscopereen bleken ze geheel uit samengepakte sarcina's te bestaan, welke identiek waren met de in het sediment der ophoopingscultures voorkomende sarcina's. In de lagere verdunningen waren deze sarcina's kennelijk zoo talrijk, dat ze nergens tot met het bloote oog zichtbare koloniën konden uitgroeien.

Voor de overenting van de verkregen sarcina-koloniën werd nu op de volgende, ten opzichte van Barker's voorschriften eenigszins geperfectioneerde wijze te werk gegaan.

¹⁾ Deze bij 45° smeltende paraffine werd verkregen door gelijke hoeveelheden bij 65° smeltende paraffine en vloeibare paraffine onder verwarming met elkaar te vermengen.

Ik liet de cultuurbuis op een afstand van ongeveer 1 cm van den onderkant afspringen. Indien nu aan de andere zijde met een glazen staaf tegen de paraffineprop werd gedrukt, liet zich de agarstaaf gemakkelijk uit de buis drijven en in een gesteriliseerde Petrischaal overbrengen. Van deze agarstaaf sneed ik met behulp van een steriel dun mesje schijfjes agar af, die ongeveer 2 à 3 mm dik waren en deponeerde elk schijfje op een steriel voorwerpsglas. Daar toch nog niet direct op een reine kolonie kon worden gerekend, sneed ik de sarcinakolonie zoo zorgvuldig mogelijk, met behoud van een zeer dun omhullend laagje agar, uit. Een dergelijke kolonie werd, omhuld met het agarhuidje, daarna met een steriele platina-naald opnieuw in hetzelfde agarmedium gesuspendeerd. In verband met de zwakkere enting werden nu cultuurbuisjes van kleinere afmetingen gebruikt en wel: ongeveer 12 cm lang en $\pm 0,6$ cm inwendige doorsnede (zie fig. 1, B). Deze buisjes werden maximaal tot een hoogte van 8 cm met de voedingsagar gevuld en gedurende de enting weer in een waterbad op een temperatuur van $\pm 45^{\circ}$ C. gehouden. Het kleine blokje agar, waarin zich de kolonie bevond, werd nu, nadat het in het cultuurbuisje was gebracht, fijn gedrukt tegen den bodem en gesuspendeerd met behulp van een glazen buisje, waaraan weer een bolletje was geblazen met een iets kleinere doorsnede als die van het cultuurbuisje zelf. De gestolde agar werd weer door een paraffineprop afgesloten. Meestal werd van een zoodanig geënt buisje ook nog een verdunning gemaakt, door $0,5 \text{ cm}^3$ van de gesmolten agar in een tweede buisje van dezelfde afmetingen over te enten en dit entmateriaal weer op gelijke wijze te suspendeeren.

Op deze wijze werden in totaal 30 koloniën uit de primaire schudcultures overgeënt, van welke koloniën er drie uit een zesde en één uit een zevende verdunning — welke laatste echter geen gasvorming te zien gaf — kwamen. De sarcina-koloniën waren op het moment van overenting 48 dagen oud.

In totaal gaven van deze 30 overgeënte koloniën er 26 in de secundaire schudcultures gasvorming te zien. In geen enkele der gemaakte verdunningen trad evenwel kolonie- of gasvorming op. De tijdsduur, welke verliep tusschen het moment der enting en dat waarop de eerste gasvorming werd waargenomen, was voor deze 26 gistende cultures als volgt: twee stuks na 15 dagen, vier stuks na 16 dagen en 15 stuks na 21 dagen. Gemiddeld trad dus 18 dagen na de enting gasvorming op.

Uit deze verkregen secundaire schudcultures, waarin veelal op een vijftigtal koloniën één onmiskenbare infectiekolonie voorkwam, werden eerstgenoemde koloniën met behulp van een micro-pipetje op de hieronder te beschrijven wijze overgeënt.

Het micropipetje werd verkregen door van een reageerbuis een aantal capillairen van ± 1 m lengte te trekken, welke vervolgens in stukken van ± 10 cm werden verdeeld. Een dertigtal van deze stukjes werd tezamen in een plaatbuis gesteriliseerd. Voor het maken van een micropipetje werd een dergelijke capillair na een zwakke verhitte van het middengedeelte in een micro-vlam ongeveer 4 cm uitgetrokken en daarna in tweeën gebroken. Zoo'n helft werd met het dikste gedeelte met behulp van lak in een glazen houdertje bevestigd. Dit is een glazen buisje van ongeveer 10 cm lengte en 0,5 cm doorsnede, dat aan het eene einde zoo nauw toeloopt, dat de doorsnede nog ongeveer 2 à 3 mm bedraagt, terwijl aan het andere einde een verloopstukje is aangebracht. In het nauwtolopende einde van dit houdertje wordt het pipetje met lak bevestigd.

Het uitgetrokken uiteinde van het capillairtje werd, alvorens het tezamen met het houdertje in de micromanipulator¹⁾ werd bevestigd, door zachte verwarming naast een micro-vlam op ongeveer 3 à 4 mm vanaf het einde met behulp van een praepareernaald omgebogen tot een hoek van bijna 90° was bereikt.

Nadat het geheel, d.w.z. houdertje en micropipetje, in de micromanipulator was bevestigd, sloot ik aan het verloopstuk van het houdertje met behulp van een rubber slangetje een glazen zuigertje aan. Hierdoor werd het mogelijk een kolonie uit de agar op te zuigen en deze daarna door indrukken van het zuigertje in een ander medium over te enten.

Alvorens een kolonie in een dergelijk pipetje op te zuigen werd dit in verband met de zeer groote zuurstofgevoeligheid van het organisme eerst voor een klein deel gevuld met steriel gedestilleerd water, waaraan 3 cm³ van een 1 % natriumsulfide-oplossing per 100 cm³ was toegevoegd. Dit vullen gebeurde eenvoudig door het micropipetje ongeveer 1 cm diep in deze vloeistof te dompelen.

Met een op deze wijze gereed gemaakt pipetje werden koloniën uit een secundaire schudcultuur overgeënt in een nieuwe kleine agarbuis. Daartoe werd het agarschijfje op een voorwerpsglas gelegd, het geheel met ongeveer tweehonderdvoudige vergrooting bekeken en onderwijl met het micropipetje gemanipuleerd. Duidelijk kon steeds het opzuigen van de sarcina's uit de agar in de vloeistof van het pipetje worden waargenomen.

Van een serie van 53 op deze wijze overgeënte koloniën, gaven in totaal 29 stuks gasvorming te zien, d.w.z. 56%, terwijl het tijdstip, waarop de eerste gasvorming zichtbaar was, varieerde van 17 tot

¹⁾ Gebruikt werd de micromanipulator van Zeiss volgens Janse en Péterfi.

41 dagen, dus gemiddeld 29 dagen bedroeg. Dat niet alle overgeënte koloniën aansloegen, moet waarschijnlijk aan de schadelijke invloed van de luchtzuurstof tijdens de overenting worden toegeschreven. Immers indien van dezelfde serie secundaire schudcultures 19 koloniën werden overgeënt met behoud van een dunne agar-omhulling, zooals hierboven is beschreven, dan bleken in het geheel 18 koloniën, d.w.z. 95 % aan te slaan, terwijl de cultiveeringsduur van 6 tot 15 dagen varieerde, met een gemiddelden duur dus van 10 dagen. Dit is zeer waarschijnlijk terug te voeren op de betere bescherming tegen de inwerking van de luchtzuurstof bij de laatstgenoemde werkwijze.

Uit de zoo met behulp van een micropipetje verkregen tertiaire schudcultures, werden de koloniën weer met behulp van een micropipetje overgeënt in een nieuw agarbuisje, waardoor quataire schudcultures werden verkregen. Tevens werd van deze entingen een verdunning van ongeveer 1 op 15 aangelegd.

Van een serie van 17 koloniën, welke op deze wijze werden overgeënt, gingen 11 buisjes uiteindelijk gisten en in 4 gevallen ook de verdunning. De tijdsduur van aanslaan voor deze 11 buisjes varieerde van 17 tot 60 dagen met een gemiddelde van 36 dagen, voor de 4 verdunningen van 27 tot 60 dagen met een gemiddelde van 46 dagen.

In een tweede proevenreeks gingen van de 8 overgeënte koloniën uiteindelijk alle 8 koloniën binnen 18 dagen gisten met een gemiddelde van 16 dagen. De eerste buis sloeg na 13 dagen aan. Van de verdunningen gingen er in totaal 4 gisten, met een tijdsduur, welke varieerde van 17 tot 38 dagen en een gemiddelde van 33 dagen.

In totaal werden 31 gistende quataire cultures verkregen. In het algemeen werden nu de buisjes, welke bij de vierde agar-passage geen infectiekoloniën meer vertoonden, voorloopig als reïncultures aanvaard.

Hierna werd uit deze buisjes een kolonie in een mineraal vloeistofmedium overgeënt. Dit medium bevond zich in een buisje van 12 cm lengte en ca. 0,8 cm doorsnede met op 7 à 8 cm van den onderkant af een vernauwing, welke een minimale uitwendige doorsnede had van 2 à 3 mm (zie fig. 1, C).

De buisjes werden met wattenprop gesteriliseerd en met het steriele minerale medium, dat dezelfde samenstelling had als het gebruikte agarmedium, juist tot de vernauwing gevuld, waarbij de buisjes tijdens het enten op een temperatuur van circa 35° C. werden gehouden. Als sedimentbestanddeel was fijn gemalen asbest toegevoegd, zoodat zich in het buisje na bezinken een ongeveer 1 cm hooge, dunvlokkige laag bevond. Deze was meestal

zwak grauw gekleurd, waarschijnlijk tengevolge van de vorming van eenig ferrosulfide. Na de enting werden de buisjes met een 1 cm hoge paraffineprop tegen den invloed van de luchtzuurstof beschermd. Het was noodig elke dag deze paraffinepropfen na te zien, daar ze in het begin niet zelden van den glasrand loslieten. Ze werden dan zoo noodig boven een microvlammetje even gedeeltelijk opgesmolten om zodoende weer een goede aansluiting aan den glaswand te verkrijgen.

Bij de eerste proef werden 24 buisjes, voorzien van een vernauwing, tegelijk met het versch bereide medium gevuld en in den loop van den dag met behulp van een micropipetje met één enkele kolonie geënt. Van deze serie van 24 stuks sloegen alleen de eerste 11 geënte buisjes aan en wel 6 stuks na 7 dagen, 3 na 8 dagen, 1 na 9 dagen en 1 na 16 dagen, dus gemiddeld na 8 dagen. Het medium in een dergelijk gistend buisje bleef volkomen helder. Alleen bewoog zich de asbest-sedimentlaag tengevolge van de optredende gasvorming soms naar boven. Dit sediment behield zijn grauwe kleur. Indien tijdens het bebroeden het sediment blijkbaar door oxydatie een meer witte kleur begon te krijgen, was dit meestal een aanwijzing, dat er geen kans meer op aanslaan bestond.

Bij een tweede proef werden weer 24 buisjes voorzien van een vernauwing, tegelijk met het minerale medium gevuld en alle met 1 kolonie geënt. Nu sloegen de 13 eerst geënte buisjes aan en wel 8 na 4 dagen, 1 na 5 dagen, 1 na 7 dagen en 3 na 10 dagen, gemiddeld dus na 6 dagen. Het buisje met agar, waaruit de koloniën afkomstig waren, was 65 dagen oud en giste sinds 24 dagen.

De oorzaak, dat steeds alleen de eerste helft van de geënte buisjes aansloeg, is ongetwijfeld weer de schadelijke invloed van de luchtzuurstof. Immers, nadat alle buisjes met het medium waren gevuld, duurde het meestal 4 à 5 uren voordat het laatste buisje werd geënt. Blijkbaar diffundeerde in dit tijdsverloop genoeg zuurstof uit de lucht door de nauwe opening in de vloeistof, niet alleen om de aanwezige zwavelwaterstof onwerkzaam te maken maar ook om zooveel zuurstof in oplossing te doen gaan, dat deze voor de methaanbacteriën funest werd.

Om deze reden werden in een derde proef de 24 buisjes zoowel gevuld als geënt in drie groepen van acht stuks. Uiteindelijk gingen nu alle buisjes gisten en wel het eerste buisje na 7 dagen en het laatste na 26 dagen; de gemiddelde tijdsduur bedroeg 11 dagen. Bij verdere proefneming werd dan ook van deze ervaring gebruik gemaakt en werden er nooit meer buisjes klaar gemaakt dan in maximaal twee uur konden worden geënt.

De 24 gistende cultuurbuisjes werden nu elk overgeënt in een cultuurbuis volgens Hall voorzien van hetzelfde minerale

medium (zie fig. 1, D). Ten einde het gistende buisje te kunnen overenten liet ik het ongeveer 1 cm onder de vernauwing na inkrassen met een glasmales springen en entte het sediment door opzuigen in een steriele pipet van 1 cm³ over. De door Hall aangegeven buis is door Barker¹⁾ met de door hem aangebrachte verbetering beschreven. Het is een buis van ongeveer 20 cm lengte en 1 à 1,5 cm doorsnede, waarbij op ongeveer een derde van den bovenkant een vernauwing is aangebracht en even boven die vernauwing een zijarmpje is geblazen, juist lang en breed genoeg om een glazen kraal, die de vernauwing geheel kan afsluiten, te bevatten.

De buis werd behalve met een wattenprop ook nog door een glazen kapje afgedekt om de verdamping van de cultuurvloei-stof zooveel mogelijk tegen te gaan. De buizen werden met wattenprop droog gesteriliseerd, daarna met de steriele cultuurvloei-stof tot circa 1 cm boven de vernauwing gevuld en na enting door middel van de glazen kraal gesloten.

Een bewijs voor de goede cultuurvoorwaarden voor methaan-organismen in een dergelijke buis is het feit, dat er tijdens het onderzoek gevallen voorkwamen, waarin pas na 64 dagen de eerste gasvorming optrad, wat inhoudt dat het medium toch al dien tijd in optimale conditie moet zijn gebleven.

De 24 hierboven vermelde in Hall-buizen geënte cultures gingen alle na één dag gisten. Nadat de gistingen goed op gang waren gekomen, werden de cultures op zuiverheid onderzocht. Te dien einde werden de buizen overgeënt in nieuwe Hall-buizen en tevens een weinig van het sediment op een peptonagarplaat gebracht en eveneens in een buis met gistwater, waaraan waren toegevoegd 2 % glucose en 2 % krijt. De 24 peptonagarplaten werden aëroob bij 30° C. bebroed en de gistwater-glucose-krijt buizen anaëroob eveneens bij 30° C. Het resultaat was als volgt:

aantal cultures	groei op peptonagar aëroob	groei in gistwater- glucose-krijt anaëroob
3 cultures	+	+
9 "	—	+
12 "	—	—

Op deze wijze waren dus twaalf cultures verkregen, waarvoor mocht worden besloten, dat zij inderdaad vrij waren van aërobe

¹⁾ H. A. Barker, Arch. f. Mikrobiol. 7, 428, 1936.

of anaërobe verontreinigende organismen. Ook het microscopisch onderzoek van deze cultures gaf geen nevenorganismen te zien.

Het aanhouden van de verkregen reinkultures geschiedde in buizen volgens Hall met een inhoud van 35 cm³, waarbij elke twee weken een weinig van het sediment in een versch medium werd overgeënt.

Einde October 1938 was ik zodoende in het bezit gekomen van een reinkultuur van een *Methanosarcina*-soort. Deze cultuur kwam wat de morphologische kenmerken betreft vrijwel met *Ms. methanica* overeen. De koloniën in agar hadden een hoekig voorkomen en waren scherp begrensd. Het voorkomen in pakketvorm was evenwel wat minder geprononceerd dan Barker voor *Ms. methanica* aangeeft. Indien krijt als sediment in de cultures werd gebruikt, bleven de cellen merkbaar kleiner en naderden den coccus-vorm. Sporevorming kon niet worden aangetoond; na pasteurisatie kwam de cultuur niet verder tot ontwikkeling.

Barker heeft voor zijn reinkultuur van *Ms. methanica* kunnen vaststellen, dat acetaten en waarschijnlijk ook butyraten onder methaanvorming werden vergist. Aethylalcohol werd niet vergist; andere substraten werden niet onderzocht.

Ik heb voor de door mij geïsoleerde *Methanosarcina* de volgende substraten op hun aantastbaarheid onderzocht:

1°. de primaire alcoholen: aethylalcohol, propylalcohol en butylalcohol, de tweewaardige alcoholen: glycol en trimethyleenglycol; de driewaardige alcohol: glycerol en de zeswaardige alcohol: mannitol. Deze alcoholen werden aan het medium toegevoegd in een concentratie van 1 % onder gelijktijdige toevoeging van 2 % calciumcarbonaat, voor het geval dat bij onvolledige vergisting zuurvorming zou optreden.

2°. de calciumzouten van de monocarbonzuren: mierenzuur, azijnzuur, propionzuur, boterzuur, valeriaanzuur, glycolzuur en melkzuur, alsmede van de dicarbonzuren: oxaalzuur en barnsteen-zuur. Alle zouten werden in een concentratie van 1 % aan het beschreven minerale medium toegevoegd.

3°. de volgende verbindingen: glucose, aceton, methylal (methyleendimethylaether: $[\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2]$) en methylacetaat. Deze verbindingen werden in een concentratie van 1 % toegevoegd.

Alle gistingsproeven werden in buizen volgens Hall uitgevoerd, waarbij steeds een buis met methylalcohol als contrôle op de deugdelijkheid der werkwijze diende.

Methylacetaat werd beproefd, om na te gaan of een ester door het organisme kon worden verzeept, in welk geval er twee vergistbare producten, n.l. methylalcohol en azijnzuur, zouden

ontstaan. Het methylal werd onderzocht, om na te gaan of de hierin voorkomende aetherbinding zou worden aangetast, waarbij dan methylalcohol en formaldehyde zouden worden gevormd en eventueel vergist.

Van al deze substraten bleek tenslotte alleen het calcium-acetaat vergistbaar te zijn. Maar ook dit ging allerm minst vlot; werd een deel van het sediment van een goed gistende methylalcohol-cultuur in een medium met 1 % calciumacetaat geënt, dan trad geen gisting op.

Werd echter een medium bereid, waarin zoowel methylalcohol als calciumacetaat als substraat aanwezig waren, beide in een concentratie van 0,75 %, en werd nu dit medium met het sediment van een goed gistende cultuur geënt, dan trad spoedig gisting op. De methylalcohol werd dan eerst vergist; blijkbaar pas nadat dit substraat geheel was verbruikt, werd het calciumacetaat aangetast. Een aanwijzing hiervoor was, dat na verloop van een veertiental dagen er zich plotseling kristalletjes van calciumcarbonaat tegen den glaswand en eveneens op de vloeistof-oppervlakte begonnen af te zetten. Nader bleek de acetaatvergisting uit het volgende.

Er werd een dergelijke vergisting ingezet in een nauwmonds stopfleschje van 50 cm³ inhoud waarbij ik elken dag het percentage koolzuur in het opgevangen gasmengsel naging. De lijn, die dit percentage koolzuur weergeeft, liep bij circa 23 % koolzuur eenigen tijd horizontaal, om dan plotseling een scherpe stijging te vertoonen. De verklaring is ongetwijfeld deze, dat de vergisting van methylalcohol theoretisch een gas met maximaal 25 % koolzuur levert, die van calciumacetaat daarentegen een gas met maximaal 33¹/₃ % koolzuur. In fig. 2 is een dergelijke kromme weergegeven, welke duidelijk laat zien, dat er een successievelijke vergisting van de beide substraten plaats vindt. Eerst wordt de methylalcohol en daarna het calciumacetaat vergist.

Werd uit een aldus verkregen acetaat vergistende cultuur direct in een medium, waaraan alleen 1 % calciumacetaat was toegevoegd, geënt, dan trad hierin spoedig, hoogstens na twee of drie dagen, gisting op.

Later bleek mij, dat bij enting met een groote hoeveelheid bacteriën, zoogenaamde „resting bacteria”, van mijn *Methanosarcina* in een medium met enkel calciumacetaat als substraat eveneens direct vergisting van het acetaat plaats vond. Blijkbaar slaat, indien er maar zwaar genoeg wordt geënt, de gisting in calciumacetaat toch ineens aan.

Hoewel ik uitvoerig heb nagegaan of ook de calciumzouten van andere vetzuren, zooals mierenzuur, propionzuur en boterzuur, door de *Methanosarcina* op de voor calciumacetaat beschreven

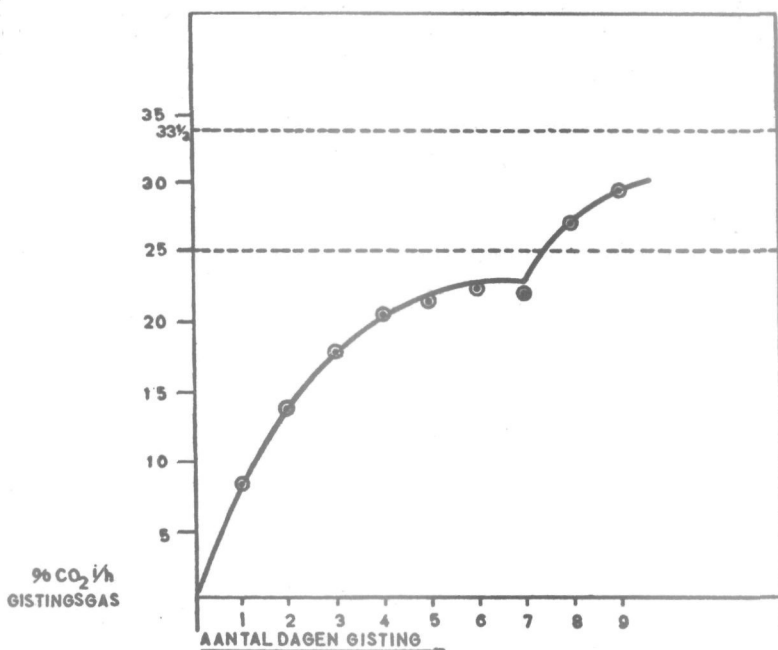


Fig. 2.

Het verloop van de vergisting van een mengsel van methylalcohol en calcium-acetaat door *Ms. Barkerii*.

wijzen konden worden vergist, moest ik uiteindelijk vaststellen, dat het organisme daartoe ten eenen male niet in staat was.

Ook voor methylal en methylacetaat bleven de op dezelfde wijzen uitgevoerde proeven zonder succes.

Resumeerend kan, wat de biochemische eigenschappen van de door mij geïsoleerde reïncultuur betreft, worden gezegd dat ze methylalcohol vlot vergist, acetaten daarentegen alleen na een zekere periode van aanpassing en overigens geen enkele van de meer gebruikelijke organische substraten.

Ten opzichte van *Ms. methanica*, welke door Barker wordt beschreven als identiek te zijn met het organisme, dat bij Söhn-
gen's proefnemingen verantwoordelijk was voor de vergisting van de lagere vetzuren, moet de door mij geïsoleerde *Methanosarcina*, welke de vetzuren met uitzondering van het moeilijk vergistbare calciumacetaat, niet vergist, als een andere soort worden beschouwd. Ik besloot daarom aan dit organisme den naam *Methanosarcina Barkerii* te geven, ter eere van den onderzoeker, die zulke belang-

rijke bijdragen tot onze kennis der methaanbacteriën heeft geleverd. Verdere eigenschappen van *Ms. Barkerii* zullen nog in de Hoofdstukken IV, V, VII worden besproken.

§ 4. *Kwantitatieve proefnemingen over de vergisting van de door Methanosarcina Barkerii aantastbare substraten.*

a. Toegepaste methodiek.

De kwantitatieve vergistingen van methylalcohol en natriumacetaat door de reincultuur van *Ms. Barkerii* werden in het hieronder te beschrijven reactievaatje uitgevoerd, dat een geperfectioneerde uitvoering is van het reactievaatje volgens Eldredge¹⁾.

Hoewel de voordeelen van dit apparaatje eerst tot hun recht komen bij de bestudeering van microbiologische omzettingen van gasmengsels (men zie hiervoor de hoofdstukken IV tot VII), was het ook voor het hier beschreven onderzoek zeer bruikbaar.

In de door mij gebezigde uitvoering (zie fig. 3) bestaat het uit twee horizontale, evenwijdige buisjes ter lengte van 13 cm en met een diameter van 20 mm met gesloten uiteinden, welke in het midden aan den bovenkant elk waren voorzien van een verticaal buisje ter lengte van 10 cm en met een diameter van 14 mm, welke verticale buisjes door een horizontaal buisje, lang circa 5 cm, met denzelfden diameter op halve hoogte met elkaar waren verbonden. De twee verticale buisjes waren aan hun bovenuiteinde resp. van een geslepen glazen stopje en van een glazen kraan, welke door middel van een slijpstuk op dit buisje was aangesloten, voorzien. De reactievaatjes werden zonder kraan en stop, voorzien van wattenpropjes droog gesteriliseerd. Voor de enting werd de bacteriesuspensie met een pipet in een der beenen gebracht, waarna het zich hierboven bevindende verticale buisje met het glazen stopje en het andere buisje met het slijpstuk werd afgesloten. Zoodoende was het mogelijk om de reacties met behulp van reincultures onder aseptische voorwaarden te doen verlopen.

Voor de kwantitatieve vergistingen van natriumacetaat werd dit als oplossing in het tweede been van het reactievaatje gebracht. Na evacuatie van het toestel werd voor passende vermenging met de bacteriesuspensie zorg gedragen.

Voor de kwantitatieve vergisting van methylalcohol werden apparaatjes gebruikt, welke aan het eene been waren voorzien van twee boven elkaar geplaatste kranen, zooals in fig. 3 is weergegeven. Hierdoor was het mogelijk om in het eene kraantje (het

¹⁾ Mie zie hiervoor: Manual of methods for pure culture study of bacteria. Geneve (N.Y.). Leaflet VI, 8th edition, 1940.

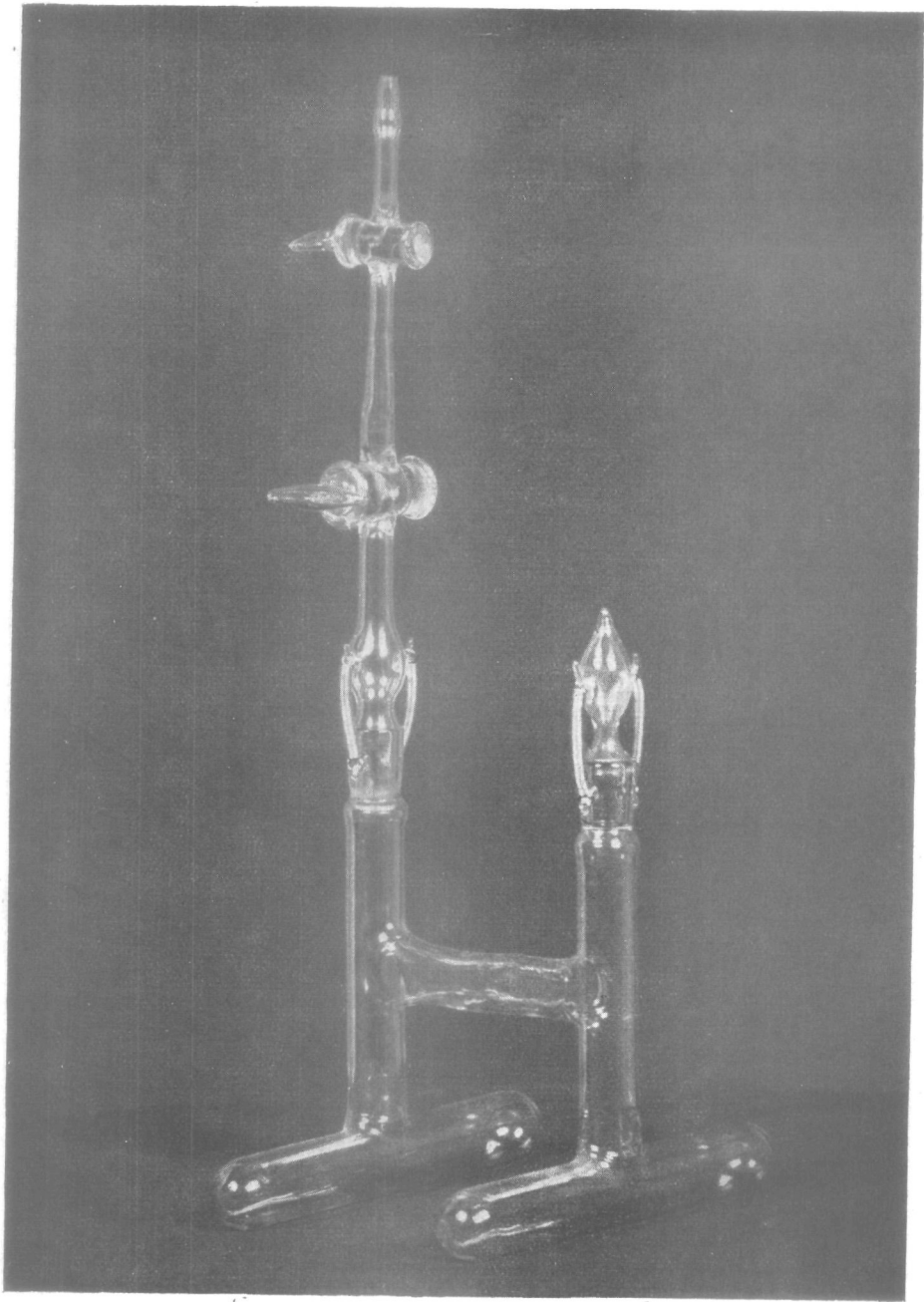


Fig. 3.

Het bij de proefnemingen gebruikte reactievaatje.

onderste) een toegesmolten capillairtje, voorzien van een bolvormig middenstuk en gevuld met absolute methylalcohol, aan het haakvormige omgebogen uiteinde op te hangen en het reactievaatje via de bovenste kraan te evacueeren.

Na evacuatie van het apparaatje met een oliepomp en vervolgens afsluiten van het apparaat met behulp van de bovenste kraan, werd door omdraaien van de onderste kraan het toegesmolten capillairtje gebroken, waardoor de hierin aanwezige methylalcohol gelegenheid kreeg om te verdampen en geleidelijk in de zich in het toestel bevindende vloeistof op te lossen.

b. De kwantitatieve vergisting van methylalcohol door *Ms. Barkerii*.

Het sediment van tien uitgegiste buizen volgens Hall werd door opzuigen in 2 cm³ pipetten hieruit verwijderd en afgecentrifugeerd. Na wasschen met zuurstofvrij gedestilleerd water en afcentrifugeeren, werd het sediment in iets meer dan 10 cm³ water gesuspendeerd. Van deze suspensie werd nu precies 10 cm³ in het eene been van het onder a. beschreven reactievaatje gebracht, terwijl in de onderste kraan van het andere been het met methylalcohol voorziene capillairtje was opgehangen.

Het totale volume van het gebruikte reactievaatje bedroeg 104,4 cm³.

De hoeveelheid methylalcohol, welke in het capillairtje aanwezig was, werd op de volgende wijze bepaald. Nadat het capillairtje gereed gemaakt en aan het eene uiteinde was toegesmolten, werd het gewogen en daarna met het open einde in een buis, waarin zich wat absolute methylalcohol bevond, gebracht en het geheel in een exsiccator geplaatst, welke werd geëvacueerd. Na op deze wijze te zijn gevuld werd het open einde van het capillairtje dichtgesmolten en het gevulde capillairtje plus het bij de dichtsmelting afvallende glas opnieuw gewogen. Hierdoor was dus de hoeveelheid van de in het gesloten capillairtje aanwezige methylalcohol nauwkeurig bekend. In twee proeven werd op deze wijze resp. 78,1 en 86,7 mg methylalcohol toegevoegd.

De gisting was in beide gevallen na acht dagen beëindigd, hetgeen duidelijk was te zien aan het ophouden van de gasontwikkeling uit het sediment. Hierna werd nog twee dagen gewacht, waarna de proefnemingen werden afgebroken. Vervolgens werden de gevormde gistingsproducten op de volgende wijze bepaald.

1. De samenstelling van het gasmengsel. Hiertoe werd eerst het gedeeltelijke vacuüm door toevoeging van een afgemeten hoeveelheid waterstof opgeheven en wel zoodanig, dat de druk binnen het reactievaatje gelijk werd aan den buitendruk. Aangezien het

volume van het reactievaatje bekend is, is dus eveneens het volume van het geproduceerde gistingsgas bekend. Temperatuur en barometerstand werden waargenomen en het gas, op de reeds in Hoofdstuk II, § 4, aangegeven wijze, geanalyseerd. De hoeveelheden geproduceerd methaan en gasvormig koolzuur werden omgerekend op 760 mm Hg en 0° C.

2. De gistingsvloeistof. In 5 cm³ van de gistingsvloeistof werd de hoeveelheid opgelost koolzuur bepaald.

De volgende resultaten werden verkregen: zie Tabel Xa.

Plaatsen we de gevonden en theoretische uitkomsten der balansen in millimolen naast elkaar, dan komen we tot het in Tabel Xb samengevatte overzicht.

Uit de fraaie overeenstemming tusschen de kolommen 6 en 7 blijkt dus, dat *Ms. Barkerii* inderdaad in staat is om methylalcohol kwantitatief te vergisten volgens de vergelijking:



Dit is wel een van de eenvoudigst denkbare gistingsprocessen, welke door bacteriën kunnen worden uitgevoerd. Immers hier wordt een vloeibare C₁-verbinding omgezet in twee gasvormige C₁-verbindingen.

De vraag hoe men zich het interne chemisme der zich hierbij afspelende reacties moet denken, is niet eenvoudig te beantwoorden. Het lijkt waarschijnlijk, dat de methylalcohol eerst tot koolzuur zal worden gedehydrogeneerd, waarna het koolzuur weer wordt gehydrogeneerd tot methaan. Om dit reactieschema te kunnen aanvaarden, moet men wel aannemen, dat beide reacties, d.w.z. de dehydrogenatie van methylalcohol tot koolzuur en de hydrogenatie van koolzuur tot methaan geen tusschenproducten gemeen hebben.

Indien men *Ms. Barkerii* methylalcohol laat vergisten onder voorwaarden, waarbij de cellen zich kunnen vermeerderen, dus door een zwakke enting in een methylalcoholhoudend voedingsmedium, dan wordt, in tegenstelling tot de hierboven beschreven methylalcoholgisting door „resting bacteria”, een gedeelte van het substraat gedurende de gisting in celmateriaal omgezet. Daar de methylalcoholgisting als eenige producten slechts koolzuur en methaan kent, kan men uit het tekort aan deze beide producten tot de empirische samenstelling van het gevormde celmateriaal besluiten.

Voor dit onderzoek werd een fleschje van ongeveer 50 cm³ inhoud, met het hierboven reeds beschreven medium gevuld, echter werd slechts ¾ % methylalcohol toegevoegd. Als sediment diende weer fijn gemalen asbest. Daar ten behoeve van elk fleschje 100 cm³ steriel medium werd bereid, kon in het resteerende medium de

Tabel Xa.

Kwantitatieve vergisting van methylalcohol door Ms. Barkerii.

toegevoegde hoeveelheid methylalcohol in:		gevonden hoeveelheid methaan in:		gevonden hoeveelheid koolzuur				totale hoeveelheid koolzuur in:		verhouding CH ₄ : CO ₂
milligrammen	millimolen	milligrammen	millimolen	gasvormig in:		opgelost in de vloeistof in:		milligrammen	millimolen	
				milligrammen	millimolen	milligrammen	millimolen			
78.1	2.44	28.2	1.76	15.6	0.35	8.4	0.19	24.0	0.54	3.2
86.7	2.71	30.7	1.92	16.2	0.37	12.0	0.27	28.2	0.64	3.0

Tabel Xb.

Vergelijkende cijfers voor de gevonden en de theoretisch te verwachten uitkomsten van de kwantitatieve vergisting van methylalcohol door Ms. Barkerii.

hoeveelheid verbruikte methylalcohol in millimolen	hoeveelheid geproduceerd methaan in millimolen		hoeveelheid geproduceerd koolzuur in millimolen		verhouding CH ₄ : CO ₂	
	gevonden	theoretisch	gevonden	theoretisch	gevonden	theoretisch
2.44	1.76	1.83	0.54	0.61	3.2	3.0
2.71	1.92	2.03	0.64	0.68	3.0	3.0

beginconcentratie van methylalcohol volgens von Fellenberg¹⁾ worden bepaald.

Hiertoe werd van 15 cm³ van het medium, na verdunning tot 80 cm³ en toevoeging van enkele druppels verdunde kaliloog de alcohol afgedestilleerd tot ongeveer 60 cm³ destillaat was overgegaan en opgevangen in een maatkolfje van 100 cm³. Na aanvulling tot dit volume werd in hoeveelheden van 1 tot en met 5 cm³ de methylalcohol volgens de genoemde colorimetrische methode bepaald.

Het fleschje werd geënt met 0,35 cm³ sediment van een uitgegiste cultuur en daarna door middel van een gebogen capillair aangesloten aan een kwikburet van 50 cm³ inhoud, welke met het open einde in een bekersglasje van 100 cm³ stond, waarna het geheel bij 30° C. werd geplaatst. Het opgevangen gas werd geanalyseerd en de verkregen hoeveelheden op 760 mm Hg en 0° C. omgerekend. Na afloop van de gisting werd het koolzuurgehalte van de vloeistof bepaald en tevens met behulp van de reactie van von Fellenberg gecontroleerd, of inderdaad alle methylalcohol was verbruikt. Hiertoe werden aan 3 cm³ van de uitgegiste vloeistof, 1 cm³ alcoholische zwavelzuur en 1 cm³ kaliumpermanganaatoplossing toegevoegd. Na twee minuten wachten werd met 1 cm³ oxaalzuuroplossing de overmaat kaliumpermanganaat weggenomen en tenslotte 1 cm³ sterk zwavelzuur en 5 cm³ fuchsinezwaveligzuuroplossing toegevoegd. Aanwezigheid van methylalcohol is kenbaar aan het ontstaan van een meer of minder intensief violette kleur. In de beide verrichte proefnemingen was bij het beëindigen der proef geen methylalcohol meer in de gistingsvloeistof aan te toonen.

De volgende resultaten werden verkregen: zie Tabel XI.

Tabel XI.

Kwantitatieve vergisting van methylalcohol door een groeiende cultuur van Ms. Barkerii.

verbruikte methylalcohol in milligrammen	hoeveelheid gevonden methaan in milligrammen	hoeveelheid gevonden koolzuur in milligrammen
296.5	91.1	51.6
330.6	108.1	66.4

Indien we deze gegevens omwerken in millimolen en ze tevens met de theoretische cijfers vergelijken, krijgen we het volgende beeld: zie Tabel XII.

¹⁾ Th. von Fellenberg in: G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, 2ter Band, 1ster Teil, Wien, 1932, p. 223.

Wij zien dus, dat er in de beide gevallen een tekort is, zoowel aan methaan als aan koolzuur. De hoeveelheden van de beide producten, die te weinig gevonden zijn, verhouden zich tot elkaar, in het eerste geval als $1,25/1,15 = 1,09$ en in het tweede geval als $0,99/1,07 = 0,93$. Wij mogen dus bij benadering hiervoor aannemen 1,0. Daar geen andere producten dan koolzuur en methaan worden gevormd, leidt dit tot de conclusie, dat het gevormde celmateriaal bij benadering de empirische samenstelling heeft van:



Deze uitkomst is in overeenstemming met de waarden, welke vrij algemeen voor de empirische samenstelling van celmateriaal zijn gevonden.

Wij moeten dus besluiten, dat *Ms. Barkerii* in staat is een gedeelte van de methylalcohol voor den opbouw van zijn celmateriaal te benutten. Vermoedelijk wordt een deel van het koolzuur tijdens het reductieproces tot methaan hieraan in het formaldehydstadium onttrokken en voor den celopbouw benut.

Volgens de koolstofbalans zijn de volgende hoeveelheden koolstof voor den celopbouw gebruikt: zie Tabel XIII.

Van de te verwachten hoeveelheid methaankoolstof is in het eerste experiment 15,1 mg = 18 % en in het tweede experiment 11,9 mg = 13 % te weinig gevormd en voor den celopbouw gebruikt. Van de te verwachten koolzuur-koolstof is in het eerste experiment 13,7 mg = 49 % en in het tweede 12,9 mg = 42 % minder gevormd dan theoretisch was te verwachten.

Getracht werd het in celmateriaal omgezette substraat als bacteriemateriaal of door autolyse daarvan als organische stof in de gistingsvloeistof terug te vinden.

In de uitgegiste vloeistof werd, nadat het anorganische koolzuur er uit verdreven was, in een aliquoot deel de nog aanwezige koolstof door middel van de verbranding langs de natte weg bepaald, volgens de door Friedemann en Kendall¹⁾ aangegeven methode. De volgende eindresultaten werden verkregen:

In het eerste experiment werd in de geheele gistingsvloeistof 39,3 mg koolstof en in het tweede experiment 38,6 mg koolstof teruggevonden. Hoewel deze waarden aan den hoogen kant zijn, immers er werd 28,8 resp. 24,8 mg koolstof verwacht, is dit resultaat, de bij de enting ingebrachte hoeveelheid organische stof in aanmerking genomen, zeker bevredigend te noemen.

Volgens de in Tabel XIII weergegeven resultaten zien we dus, dat *Ms. Barkerii* van de totale hoeveelheid substraatkoolstof in het

¹⁾ Th. E. Friedemann and A. S. Kendall, Journ. Biol. Chem. 82, 45, 1925.

eerste experiment 28,8 mg koolstof of wel 26 % en in het tweede experiment 24,8 mg koolstof of wel 20 % gebruikt voor den opbouw van zijn celmateriaal. Gemiddeld dus 23 %.

c. De kwantitatieve vergisting van natriumacetaat door *Ms. Barkerii*.

Het sediment van 10 uitgegiste buizen volgens Hall werd na pipetteeren, centrifugeeren en wasschen en opnieuw afcentrifugeeren in iets meer dan 5 cm³ uitgekookt, zuurstofvrij water gesuspenderd. Van deze suspensie werd precies 5 cm³ in het eene been van het reactievaatje gebracht, waarna 10 cm³ van een oplossing, welke in totaal 90,3 mg natriumacetaat bevatte in het andere been werd gepipetteerd. Hierop volgde evacuatie en vermenging. Celvermeerdering is in een dergelijk medium, waarin voedingszouten ontbreken, practisch uitgesloten. Aangezien bij de vergisting van calciumacetaat het moeilijk oplosbare calciumcarbonaat zou ontstaan, hetwelk moeilijkheden bij de analyse van het koolzuur zou kunnen geven, werd als substraat natriumacetaat gekozen.

Het totale volume van het reactievaatje bedroeg 89,3 cm³, het na vulling overblijvende gasvolume bedroeg dus 74,3 cm³. Na evacuatie van het reactievaatje werd dit bij 30° C. geplaatst. Na drie dagen werd een duidelijke gasontwikkeling waargenomen. Nadat de gisting was beëindigd, hetgeen uiterlijk na twee weken het geval was, werden de gevormde gistingsproducten op de reeds onder b. beschreven wijze geanalyseerd.

De volgende kwantitatieve resultaten werden verkregen: zie Tabel XIV.

In millimolen werden dus gevonden:

1,10 m.mol azijnzuur $\rightarrow$ 1,12 m.mol methaan + 1,16 m.mol koolzuur.

Deze hoeveelheden zijn dus in goede overeenstemming met de verwachting, dat *Ms. Barkerii* in staat zou zijn azijnzuur kwantitatief volgens de vergelijking:



te vergisten.

In het onderhavige geval hadden we dus feitelijk te doen met de volgende reactie-vergelijking:



waarbij het grootste deel van het gasvormige koolzuur door het natriumcarbonaat werd gebonden en als natriumbicarbonaat in de oplossing bleef.

Tabel XII.

Vergelijkende cijfers voor de gevonden en de theoretisch te verwachten uitkomsten van de kwantitatieve vergisting van methylalcohol door een groeiende cultuur van *Ms. Barkerii*.

verbruikte methylalcohol in millimolen	hoeveelheden methaan in millimolen		verschil in millimolen	hoeveelheden koolzuur in millimolen		verschil in millimolen	verhouding $\text{CH}_4 : \text{CO}_2$	
	gevonden	theoretisch		gevonden	theoretisch		gevonden	theoretisch
9.27	5.70	6.95	—1.25	1.17	2.32	—1.15	4.9	3.0
10.33	6.76	7.75	—0.99	1.51	2.58	—1.07	4.5	3.0

Tabel XIII.

Het tekort aan methaan- en koolzuurkoolstof t.o.v. de theoretische hoeveelheden bij de vergisting van methylalcohol door een groeiende cultuur van *Ms. Barkerii*.

hoeveelheid substraat koolstof in milligrammen	hoeveelheid methaan koolstof in milligrammen		verschil in milligrammen	hoeveelheid koolzuur-koolstof in milligrammen		verschil in milligrammen
	gevonden	theoretisch		gevonden	theoretisch	
111.2	68.3	83.4	—15.1	14.1	27.8	—13.7
124.0	81.1	93.0	—11.9	18.1	31.0	—12.9

Tabel XIV.

Kwantitatieve vergisting van natriumacetaat door *Ms. Barkerii*.

toegevoegde hoeveelheid azijnzuur in: milligrammen millimolen		gevonden hoeveelheid methaan in: milligrammen millimolen		gevonden hoeveelheid koolzuur opgelost in de gistingsvloeistof in:				totale hoeveelheid koolzuur in: milligrammen millimolen		verhouding $\text{CO}_2 : \text{CH}_4$
				gasvormig in: milligrammen	in millimolen	in milligrammen	in millimolen			
66.1	1.10	17.9	1.12	8.5	0.19	42.9	0.97	51.4	1.16	1.0

§ 5. *Eenige milieufactoren, welke den groei van Ms. Barkerii beïnvloeden.*

Door Barker¹⁾ is de invloed nagegaan, die eenige milieuomstandigheden op den groei van de door hem geïsoleerde rein-cultuur van *Mb. Omelianskii* hadden.

Tot deze onderzochte factoren behoorde ook de aard van het aangeboden stikstofvoedsel. Zoo bleek de aanwezigheid van ammoniumsulfaat in het voedingsmedium als eenige stikstofbron de ontwikkeling van het organisme bij de talloze overentingen te waarborgen. Het gebruik van leidingwater, waarin nog kleine hoeveelheden organische stof voorkwamen, was bij de bereiding van het medium niet absoluut noodzakelijk. Immers bij gebruik van dubbel gedestilleerd water bleek het organisme zich even goed te kunnen ontwikkelen.

Nitraat had, uitgezonderd in zeer kleine concentraties een toxische invloed²⁾. Zoo remde een concentratie van 0,05 % kaliumnitraat merkbaar, terwijl toevoeging van 0,1 % kaliumnitraat een absoluten stilstand van de gisting tengevolge had.

Ms. Barkerii bleek eveneens in staat te zijn zich met ammoniumsulfaat als eenige stikstofbron te kunnen ontwikkelen. Ook in een medium met dubbel gedestilleerd water bereid, bleek het organisme met ammoniumsulfaat als eenige stikstofverbinding voor-treffelijk te kunnen groeien.

Om de stikstofbehoefte voor *Ms. Barkerii* na te gaan, bereidde ik wederom het voor dit organisme gebruikelijke medium. In een deel hiervan werd als stikstofbron 0,05 % ammoniumsulfaat gebruikt, in een tweede deel 0,05 % ammoniumnitraat en in een derde deel 0,05 % natriumnitraat. Met elk dezer media werden nu twee buizen volgens Hall gevuld, waarbij telkens één van de twee met 0,5 cm³ sediment van een uitgegiste methylalcoholcultuur werd geënt.

In de buizen, waarin ammoniumsulfaat en ammoniumnitraat aanwezig waren, trad een goede ontwikkeling van het organisme op. In de buis met natriumnitraat bleef dit beperkt tot de ontwikkeling van eenige kleine gasbelletjes gedurende de eerste zeven dagen, daarna stond de gisting in deze buis stil; nitraatstikstof is dus blijkbaar niet assimileerbaar. Nadat de buizen waren uitgegist, werd op de toegevoegde ammoniumzouten en nitraten gereageerd en de uitkomsten met die der niet geënte buizen vergeleken. In die gevallen, waarin ammoniumzouten waren toegevoegd, was de sterk positieve reactie in een merkbaar zwakkere veranderd. De nitraat-

¹⁾ H. A. Barker, Ant. van Leeuwenhoek 6, 201, 1940.

²⁾ H. A. Barker, Journ. of Biol. Chem. 137, 153, 1941.

reactie daarentegen gaf geen verandering te zien, ook niet in het geval van de gelijktijdige aanwezigheid van het ammonium-ion. De methylalcoholvergisting gaat onder de gekozen voorwaarden kennelijk gepaard met een verbruik aan ammoniumstikstof; de gelijktijdige aanwezigheid van het nitraat-ion in de toegepaste concentratie is niet schadelijk voor het organisme. Dat dit evenwel bij hogere concentraties wel het geval is bleek uit de volgende proefneming.

Ik bereidde een aantal voedingsmedia, welke naast 0,05 % ammoniumsulfaat, resp. 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 en 0,4 % kaliumnitraat bevatten. Met elk dezer media werden twee buizen volgens Hall gevuld en vervolgens geënt. Het bleek nu, dat in alle buizen aanvankelijk gisting optrad, echter was in die met 0,3 % en 0,4 % kaliumnitraat de remmende invloed duidelijk merkbaar. Na ongeveer vier weken eindigde bij deze concentraties de trage gisting; de methylalcohol was toen nog niet geheel vergist. De buizen met 0,2 % kaliumnitraat gistten langer door, doch ook hierin kwam de gisting na een zestal weken tot stilstand, ofschoon nog methylalcohol aanwezig was. Alleen in de buizen met 0,05 % en 0,1 % kaliumnitraat werd de methylalcohol volledig vergist, alhoewel ook hier de gisting langzamer verliep dan in het normale medium zonder nitraat.

Voor *Mb. Omelianskii* was door Barker daarentegen gevonden, dat 0,1 % kaliumnitraat de vergisting van aethylalcohol practisch volledig remde. Beneden 0,02 % nitraat nam hij geen remming waar.

§ 6. *Reincultiveering en de belangrijkste eigenschappen van Methanobacterium formicum nov. spec.*

In Hoofdstuk I, § 3 vermeldde wij, dat reeds Söhngen uitgebreide waarnemingen verrichtte over de methaangisting van formiaten. Terzelfder plaatse bespraken wij uitvoerig een publicatie van Stephenson en Stickland¹⁾, waarin deze onderzoekers mededeelen een reincultuur te hebben geïsoleerd, welke in staat was natriumformiaat kwantitatief tot methaan en koolzuur te vergisten en bovendien een aantal 1-koolstofverbindingen, zooals methylalcohol, mierenzuur, formaldehyde, koolmonoxyde en koolzuur kwantitatief met behulp van gasvormige waterstof tot methaan te reduceeren. Om deze reden was er mij veel aan gelegen een methaanbacterie met overeenkomstige eigenschappen in handen te krijgen.

Hiertoe werden ophoopingingen ingezet, met rioolmodder als

¹⁾ M. Stephenson and L. H. Stickland, Biochem. Journ. 27, 1517, 1933.

entmateriaal in het volgende medium: leidingwater, 0,4 % di-ammoniumphosfaat, 0,1 % monokaliumphosfaat, 0,1 % natriumchloride, 0,07 % magnesiumsulfaat, een spoor ferrosulfaat, terwijl als sedimentmateriaal fijn gemalen asbest werd toegevoegd. Na opkoken en afkoelen werd hieraan nog 0,035 % natriumsulfide en 0,75 % natriumformiaat toegevoegd en het medium tenslotte met 8 % zoutzuur op een pH van 7,0 gebracht.

Flesschen van 1 l met dit medium gevuld, werden met 50 cm³ rioolmodder geënt, goed doorgeschud en de flesschen bij 30° C. geplaatst.

Nadat in een dergelijke flesch een behoorlijke gisting was opgetreden, en de cultuur door eenige malen over te enten in een versch medium was gezuiverd, werd met 1 cm³ van het verkregen sediment een zevental opeenvolgende verdunningen in agarbuizen ingezet, geheel op de wijze zooals in § 3 uitvoerig voor *Ms. Barkerii* is beschreven. Voor de verdere reincultiveering werd ook nu weer van kleine agarbuisjes en vloeistofbuisjes met vernauwing gebruik gemaakt. Hierbij zijn ten opzichte van de resultaten die voor *Ms. Barkerii* werden verkregen, geen essentiële verschillen te vermelden. Zoo gaf een drietal ingezette series van verdunningen in groote agarbuizen uitkomsten te zien, welke bijna niet van die met *Ms. Barkerii* verkregen, afweken. De gasvorming in de eerste zes verdunningen trad bij deze drie series gemiddeld op na resp.: 1, 2, 8, 16, 19 en 22 dagen.

Dikwijls waren de koloniën reeds goed zichtbaar, voordat er nog voldoende methaan was gevormd, om de agar te doen splijten. Dit moet waarschijnlijk worden geweten aan de ongunstige verhoudingen tusschen het aantal moleculen substraat en het aantal moleculen hieruit gevormd methaan.

Immers de vergisting van natriumformiaat verloopt volgens de vergelijking:



Er ontstaat dus per vier moleculen vergist natriumformiaat slechts één molecuul methaan.

Koloniën werden uit de primaire schudcultures overgeënt in kleine agarbuisjes en van hieruit weer in de kleine vloeistofcultuurbuisjes met vernauwing. De aangeslagen vloeistofcultuurbuisjes werden opnieuw in agarbuizen gebracht en via overentingen in kleine agarbuisjes en tenslotte weer in vloeistofcultuurbuisjes. Op deze wijze werd een tweetal reincultures verkregen. Deze cultures werden weer op reinheid onderzocht door na te gaan of groei optrad bij aëroob cultiveeren op peptonagar en bij anaëroob cultiveeren in gistwater met 2 % glucose en 2 % kriet, hetgeen niet het geval bleek te zijn.

De koloniën van de geïsoleerde reïncultuur hebben in het agarmedium een min of meer grauw uiterlijk, waarschijnlijk tengevolge van ferrosulfidevorming. Het medium wordt namelijk alkalisch door de vorming van natriumcarbonaat. De grootte van de koloniën kan soms bijna 3 à 4 mm bedragen.

Bij het microscopeeren van het sediment van een vloeistofcultuur zijn de dunne flauw gebogen staafjes, welke onregelmatig van lengte zijn, goed zichtbaar. Soms zitten de bacteriën als een kluwen op elkaar. Sporevorming werd nooit waargenomen. Over het algemeen zijn de staafjes dunner en langer dan die van *Mb. Omelianskii*.

Tot de substraten, waarvoor nader werd nagegaan of zij door deze reïncultures werden vergist, behoorden de natriumzouten van azijnzuur, propionzuur, boterzuur en valeriaanzuur. Bovendien werd de vergistbaarheid van methyl- en aethylalcohol nagegaan. De wijze waarop dit werd nagegaan was identiek met de bij *Ms. Barkerii* toegepaste methode.

Geen der onderzochte substraten werd echter vergist. Naar aanleiding van het specifieke vermogen tot vergisting van mierenzure zouten werd voor het geïsoleerde organisme de naam: *Methanobacterium formicicum* nov. spec. gekozen.

De vergisting van mierenzuur door *Mb. formicicum* werd nu aan een kwantitatieve analyse onderworpen.

Hiertoe werd het volgende medium bereid: aan leidingwater werd 1 % dikaliumphosfaat, 0,05 % ammoniumsulfaat, 0,02 % magnesiumsulfaat en een spoor ferrosulfaat toegevoegd. Na het steriliseeren werd per 100 cm³ medium 3,5 cm³ van een 20 % steriele natriumformiaatoplossing en 3 cm³ van een 1 % natriumsulfideoplossing toegevoegd en de pH op 7,0 gebracht.

In dit medium werd het organisme in buizen volgens Hall met een inhoud van 35 cm³ gekweekt. Het sediment bestond evenals bij *Mb. Omelianskii* ook hier uit neergeslagen fijnvlokkelig fosfaat, dat onder in de buis een laag van 0,5 à 1 cm dikte vormde.

Voor elke kwantitatieve vergisting van natriumformiaat, werd het sediment van vier à vijf uitgegiste buizen gebruikt. Dit sediment werd afgecentrifugeerd en daarna gesuspenderd in door uitkoken zuurstofvrij gemaakt gedestilleerd water en na centrifugeeren in circa 10 cm³ van dit water gesuspenderd. Van deze suspensie werd een precies afgemeten hoeveelheid, meestal 5 cm³, in het reeds genoemde reactievaatje gebracht en hieraan een afgemeten hoeveelheid van een natriumformiaatoplossing toegevoegd. Door deze hoeveelheid en tevens de hoeveelheid gewasschen suspensie te varieeren werd de vergisting nagegaan bij een concentratie van 1,71 tot 3,21 % natriumformiaat.

De volgende resultaten werden verkregen.

Tabel XV.

Kwantitatieve vergisting van natriumformiaat door Mb. formicum.

toegevoegde hoeveelheid mierenzuur in:		hoeveelheid koolzuur geprodu- ceerd in:		hoeveelheid methaan geprodu- ceerd in:		verhouding koolzuur- methaan	concen- tratie van het natrium- formiaat
mgr.	m.mol.	mgr.	m.mol.	mgr.	m.mol.		
136.8	2.97	95.1	2.16	11.0	0.69	3.1	1.76%
136.8	2.97	94.3	2.14	11.2	0.70	3.0	2.13%
182.4	3.97	128.8	2.93	14.8	0.93	3.1	2.23%
182.4	3.97	127.8	2.90	14.7	0.92	3.1	2.69%
228.1	4.96	164.9	3.75	18.3	1.14	3.3	3.21%
228.1	4.96	163.4	3.71	18.3	1.14	3.2	3.21%

Volgens de uitkomsten van kolom 2 en 4 is de verhouding tusschen de hoeveelheid verbruikt mierenzuur en geproduceerd koolzuur als 4 : 3, terwijl uit kolom 2 en kolom 6 voor de verhouding tusschen verbruikt mierenzuur en geproduceerd methaan volgt 4 : 1.

Wij mogen hieruit besluiten, dat mierenzuur inderdaad door *Mb. formicum* kwantitatief wordt vergist tot koolzuur en methaan volgens de vergelijking:



Over het gedrag van *Mb. formicum* ten opzichte van de reeds hierboven genoemde 1-koolstofverbindingen bij aanwezigheid van gasvormige waterstof zal in de Hoofdstukken IV, V en VII nader worden gerapporteerd.

HOOFDSTUK IV.

DE REDUCTIE VAN KOOLZUUR MET GASVORMIGE WATERSTOF TOT METHAAN MET BEHULP VAN REINCULTURES VAN METHAANBACTERIËN.

§ 1. *Beschrijving der toegepaste methodiek.*

In Hoofdstuk I, § 3 is de wenschelijkheid naar voren gebracht om aan te toonen, dat ook reincultures van methaانبacteriën de door ruwcultures van deze bacteriën teweeggebrachte reactie tusschen koolzuur en gasvormige waterstof kunnen bewerkstelligen.

De aldaar vermelde onderzoeken van Wieringa hadden toch het bewijs geleverd, dat in de door hem bestudeerde ruwcultures de waargenomen koolzuurreductie eerst met behulp van een niet-methaانorganisme tot azijnzuur voerde, welke daarna werd gevolgd door een methaانgisting van het gevormde azijnzuur. Op deze wijze werd een eindresultaat verkregen, dat geheel identiek was met hetgeen bij een directe reductie van het koolzuur door de methaانبacteriën zou worden verkregen.

Dat ook deze laatste hiertoe in staat zouden zijn, was door de onderzoeken van Barker wel zeer waarschijnlijk geworden; echter bleef er dit verschil, dat Barker aantoonde, dat het koolzuur kon worden gereduceerd met waterstof afkomstig van de dehydrogenatie van daarvoor geschikte organische verbindingen, terwijl er nu sprake is van een reductie met gasvormige waterstof.

Bij de ingestelde proefnemingen gebruikte ik wederom de in het vorige hoofdstuk beschreven reactievaatjes volgens Eldredge.

De volumina van de gebruikte vaatjes werden tot op 0,1 cm³ nauwkeurig uitgewogen en varieerden van circa 90 tot 125 cm³. Aangezien in de vaatjes meestal 10 cm³ bacteriënsuspensie werd gebracht, kon dus gemiddeld met circa 100 cm³ gasmengsel worden gewerkt.

De reactievaatjes werden na het inbrengen van de bacteriënsuspensie geëvacueerd tot de aanwezige vloeistof begon te koken; op deze wijze werd de aanwezige lucht volledig verwijderd.

Onderwijl werd in een gasburet met kwik als afsluitvloeistof een mengsel van de verlangde gasatmosfeer bereid, en het reactievaatje na het tot stand brengen van een verbinding met behulp van een driewegkraan gevuld tot de druk binnen gelijk was aan die van de heerschende barometerstand, waarna de totale hoeveelheid toegevoegd gas werd omgerekend op een barometerstand van 760 mm en een temperatuur van 0° C.

Vervolgens werden de reactievaatjes bij een temperatuur van 30° C. geplaatst en hierbij voortdurend in horizontaal schuddende beweging gehouden.

Hiertoe was elk reactievaatje met de beide horizontaal liggende deelen in de gleuven van een houten bakje geplaatst en hierin met behulp van horizontaal draaibare latjes vastgeklemd; vier van deze houten bakjes werden na plaatsing in een lange smalle houten bak gezamenlijk op de schudmachine bevestigd.

Na beëindiging van een proefneming werd doorgaans het reactievaatje met een nauwkeurig bekende hoeveelheid zuivere waterstof bijgevuld, tot de druk wederom gelijk was aan de barometerstand, waarna de inhoud werd geanalyseerd. Voordien was door plaatsing gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur gezorgd, dat het apparaatje en zijn inhoud deze temperatuur had aangenomen. De reden, dat steeds de onderdruk in het apparaatje door bijvullen met waterstof werd weggenomen, was deze, dat daardoor de monsterneming door een eventueel te groot vacuum niet werd bemoeilijkt, terwijl bovendien door de vermeerdering van de aanwezige hoeveelheid gas met de waterstof een duplo-analyse van het gasmengsel werd mogelijk gemaakt.

Een tweede voordeel was, dat op deze wijze de hoeveelheid van het gasmengsel bij het einde van de reactie op eenvoudige wijze was te berekenen, zonder dat eerst de druk in het apparaatje behoefde te worden gemeten. Immers bijvulling geschiedde tot den heerschenden barometerstand en hierdoor was dus de totale hoeveelheid gas na deze bijvulling bij een druk van 760 mm Hg en 0° C. te berekenen. Door hiervan dan de bijgevoegde hoeveelheid waterstof af te trekken, verkrijgt men de hoeveelheid gasmengsel bij het eind van de reactie bij een druk van 760 mm Hg en 0° C.

§ 2. Proefnemingen met *Methanosarcina Barkerii*.

Ms. Barkerii werd in het eerder beschreven medium in buizen volgens Hall met een inhoud van circa 35 cm³ gecultiveerd.

Waren de buizen uitgegist, dan werd het sediment met behulp van een steriele 2 cm³ pipet daaruit verwijderd en voor de proeven gebruikt.

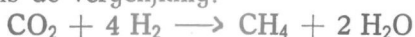
Meestal werd elk apparaatje voorzien van 10 cm³ suspensie, d.w.z. ongeveer de hoeveelheid bacteriën materiaal, welke ontstaat bij de vergisting van 175 cm³ medium. Soms werd de op de beschreven wijze verkregen 10 cm³ suspensie eerst nog afgecentrifugeerd, het centrifugaat opnieuw in ruim 10 cm³ steriel voedingsmedium gesuspenseerd en van de nieuwe suspensie 10 cm³ in het apparaatje gebracht.

Hierna werd het vaatje geëvacueerd en met een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding van ongeveer 1 : 5 gevuld.

De na vijf dagen bepaalde resultaten van een tweetal proefnemingen zijn in Tabel XVI weergegeven.

Het aantal verbruikte millimolen waterstof bedraagt resp. 2,07 en 2,40; de geproduceerde millimolen methaan resp. 0,51 en 0,62. De verhouding tusschen de verdwenen hoeveelheid waterstof en de geproduceerde hoeveelheid methaan bedraagt dus resp. 4,0 en 3,9 in goede overeenstemming met de theoretische waarde van 4,0.

Hiermede is dus inderdaad het experimenteele bewijs geleverd, dat een reïncultuur van *Ms. Barkerii* in staat is het koolzuur met behulp van gasvormige waterstof kwantitatief over te voeren in methaan volgens de vergelijking:



Dit bleek niet alleen het geval, indien de waterstof in overmaat aanwezig was, maar ook indien werd gewerkt met een gasmengsel met een overmaat aan koolzuur (zie Tabel XVII).

De resultaten van twee dergelijke proeven spreken voor zichzelf. Na afloop van de reactie werd, behalve het gasvormige koolzuur, ook het in de vloeistof opgeloste koolzuur kwantitatief bepaald. Dit gebeurde door uit 5 cm³ vloeistof het koolzuur uit te drijven en dit op te vangen in een gewogen kali-apparaatje.

De verdwenen hoeveelheid waterstof in millimolen bedroeg bij de twee experimenten resp. 1,74 en 1,11; de geproduceerde hoeveelheden methaan resp.: 0,43 en 0,30. De verhouding tusschen de verdwenen hoeveelheid waterstof en de geproduceerde hoeveelheid methaan is dus resp. 4,0 en 3,7.

De verkregen resultaten wijzen op een geheel normaal verloop van de koolzuurreductie.

Men kan zich nu afvragen of *Ms. Barkerii* in staat is zich bij de reactie tusschen koolzuur en waterstof te vermeerderen ten koste van de in den vorm van koolzuur aangeboden koolstof.

Hiertoe werden de bacteriën gesuspenderd in een medium, dat alle benodigde minerale voedingsbestanddeelen bevatte. Bovendien werden de proeven langer voortgezet, waarbij telkens opnieuw de ontstane onderdruk door toevoeging van een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding 1 : 4 werd weggenomen.

Na zestien dagen werd het resterende gasmengsel geanalyseerd, waarbij de volgende uitkomsten werden verkregen (zie Tabel XVIII).

De in kolom 7, 8 en 9 vermelde „theoretisch berekende veranderingen” zijn verkregen, door uit te gaan van de gevonden hoeveelheid methaan en de voor de vorming hiervan benodigde hoeveelheid waterstof en koolzuur daaruit af te leiden.

Tabel XVI.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels door Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof		toegevoegde hoeveelheid koolzuur		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheid					
	in		in		waterstof		koolzuur		methaan	
	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen
207	63.0	2.84	12.2	0.55	17.0	0.77	—	—	11.4	0.51
208	59.8	2.69	14.6	0.66	6.3	0.29	—	—	13.9	0.62

Tabel XVII.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels, waarin overmaat koolzuur aanwezig is, door Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof		toegevoegde hoeveelheid koolzuur		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheid					
	in		in		waterstof		koolzuur		methaan	
	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen	cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	milli-molen
205	50.3	2.26	38.5	1.73	11.5	0.52	27.7	1.25	9.7	0.43
206	27.1	1.22	51.8	2.33	2.5	0.11	43.3	1.95	6.7	0.30

Tabel XVIII.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels door een groeiende
cultuur van *Ms. Barkerii*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in millimolen		experimenteel gevonden veranderingen in millimolen			theoretisch berekende veranderingen in millimolen			meer H ₂ en CO ₂ verbruikt dan berekend op gevormde methaan in millimolen	
	H ₂	CO ₂	H ₂	CO ₂	CH ₄	H ₂	CO ₂	CH ₄	H ₂	CO ₂
102	4.81	1.19	— 3.04	— 0.89	+ 0.65	— 2.61	— 0.65	+ 0.65	0.43	0.24
104	5.18	1.30	— 3.41	— 1.04	+ 0.68	— 2.74	— 0.68	+ 0.68	0.67	0.36
106	6.28	1.55	— 4.66	— 1.36	+ 0.96	— 3.85	— 0.96	+ 0.96	0.81	0.40
108	5.23	1.29	— 3.47	— 0.99	+ 0.72	— 2.88	— 0.72	+ 0.72	0.59	0.27

91

Tabel XIX.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels door *Mb. Omelianskii*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof in		toegevoegde hoeveelheid koolzuur in		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheid					
	cm ³ bij 760mm/0° C.	milli-molen	cm ³ bij 760mm/0° C.	milli-molen	waterstof in		koolzuur in		methaan in	
					cm ³ bij 760mm/0° C.	milli-molen	cm ³ bij 760mm/0° C.	milli-molen	cm ³ bij 760mm/0° C.	milli-molen
119	164.0	7.38	37.1	1.67	18.2	0.82	—	—	37.0	1.66
125	143.9	6.48	25.7	1.15	44.3	1.99	—	—	24.6	1.10
154	58.6	2.64	14.5	0.65	1.6	0.07	—	—	14.3	0.64

De in kolom 10 en 11 vermelde cijfers geven de hoeveelheden waterstof en koolzuur aan, welke bij het experiment meer zijn verdwenen dan op grond van de methaanvorming was te verwachten. Deze hoeveelheden waterstof en koolzuur verhouden zich practisch voor elk experiment als 2 : 1.

Sterk wordt hierdoor de indruk gewekt, dat deze hoeveelheden koolzuur en waterstof hebben bijgedragen tot de vorming van celmateriaal, bij welke synthese het primaire assimilatieproduct dus de empirische samenstelling CH_2O zal hebben.

Men zou zich kunnen voorstellen, dat assimilatie en dissimilatie van de methaanbacteriën processen zijn, welke aanvankelijk denzelfden weg volgen. Een groot gedeelte van het primaire reductieproduct, mogelijk formaldehyde, zou dan verder worden gereduceerd tot methaan, terwijl een kleiner gedeelte als uitgangspunt voor verschillende syntheses ten behoeve van den celopbouw zou dienen.

§ 3. Proefnemingen met *Methanobacterium Omelianskii*.

Mb. Omelianskii werd in het eerder beschreven aethylalcohol-medium in Hall-buizen gecultiveerd.

Met behulp van steriele pipetten van 2 cm³ werd wederom het sediment der uitgegiste cultuurbuizen in de beschreven reactievaatjes overgebracht, welke daarna met een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding 1 : 5 werden gevuld. Op deze wijze werd een drietal proefnemingen uitgevoerd, welke na vijf dagen schudden bij 30° C. de in de Tabel XIX weergegeven resultaten opleverden.

De hoeveelheden verbruikte waterstof bedragen blijkens de cijfers in kolom 3 en 7 resp. 6,56, 4,49 en 2,57 millimolen. De gevormde hoeveelheden methaan volgens kolom 11 resp. 1,66, 1,10 en 0,64. De verhouding tusschen de verbruikte hoeveelheden waterstof en de geproduceerde hoeveelheden methaan is resp.: 4,0, 4,1 en 4,0, welke waarden weer zeer goed met de theoretische waarde van 4,0 overeenstemmen.

Evenals dit voor *Ms. Barkerii* het geval is, is dus ook *Mb. Omelianskii* in staat om koolzuur met gasvormige waterstof tot methaan te reduceeren.

Alvorens nader op eenige factoren, welke invloed uitoefenen op de snelheid, waarmede de reductie van koolzuur door middel van waterstof verloopt, in te gaan, dient over de snelheid van omzetting in het algemeen nog het volgende te worden vermeld.

Bij de in deze paragraaf vermelde proefnemingen met suspensies van methaanbacteriën werden de reactievaatjes tijdens de proefnemingen bij 30° C. steeds geschud. Dit is absoluut nood-

Omzettingen van koolzuur-waterstof mengsels door *Mb. Omelianskii* in geschudde en niet-geschudde cultures.

Tabel XX.

Proef No.	duur der proef in dagen	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			maximaal te verwachten hoeveelheid methaan in cm ³	hiervan gevormd in %	verhouding —H ₂ /+CH ₄
		H ₂	CO ₂	H ₂	CO ₂	CH ₄			
154	1	58.6	14.5	1.6	—	14.3	14.5	99	4.0
156	1	54.6	13.8	—	—	13.4	13.8	97	4.1
157*)	5	57.1	14.2	11.1	1.3	11.9	14.2	84	3.9

*) niet geschud

Invloed van het medium op de omzettingssnelheid van koolzuur-waterstof mengsels door *Mb. Omelianskii*.

Tabel XXI.

Proef No.	duur der proef in dagen	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			gevonden hoeveelheid methaan in % v.d. theorie	verhouding —H ₂ / +CH ₄
		H ₂	CO ₂	H ₂	CO ₂	CH ₄		
10 cm ³ gewasschen suspensie van <i>M. b. Omelianskii</i> in voedingsmedium gesuspenderd.								
509	3	63.5	12.5	15.5	—	12.1	97.6	4.0
512	3	60.8	14.7	4.9	—	13.7	93.2	4.1
10 cm ³ gewasschen suspensie van <i>M. b. Omelianskii</i> in leidingwater gesuspenderd.								
503	3	65.6	13.0	26.2	1.5	10.1	77.7	3.9
504	3	63.0	15.7	22.5	3.6	10.0	63.7	4.1
10 cm ³ gewasschen suspensie van <i>M. b. Omelianskii</i> in gedestilleerd water gesuspenderd.								
501	3	65.4	13.0	39.3	4.5	6.9	53.1	3.8
502	3	62.6	15.3	34.0	6.5	7.4	48.4	3.9
10 cm ³ gewasschen suspensie van <i>M. b. Omelianskii</i> in gedestilleerd water +0.05% (NH ₄) SO ₄ gesuspenderd.								
507	3	59.1	11.7	16.8	—	10.7	91.6	4.0
508	3	57.1	13.9	2.7	—	13.4	96.4	4.1

zakelijk voor een snel verloop van de reactie, hetgeen duidelijk blijkt uit de in Tabel XX weergegeven uitkomsten van een drietal proefnemingen met *Mb. Omelianskii*.

In de beide proefnemingen genummerd 154 en 156 werd het reactievaatje intensief geschud, bij de laatste proef (no. 137) werd het schudden achterwege gelaten. In de beide eerste gevallen is de reactie in één dag bijna voltooid en in het laatste geval is zelfs na vijf dagen de reactie nog slechts voor 84 % verlopen.

De snelheid, waarmede CO_2 en H_2 door *Mb. Omelianskii* worden omgezet, bleek bovendien afhankelijk te zijn van het medium, waarin de gewasschen methaanbacteriën werden gesuspenderd. In Tabel XXI treden deze verschillen duidelijk naar voren.

Zooals uit de gegevens van Tabel XXI blijkt, geeft suspendering van de methaanbacteriën zoowel in gedestilleerd water als in leidingwater vertraagde reductie van het koolzuur in methaan. De beste resultaten zijn verkregen bij suspendering in het gebruikelijke voedingsmedium. Een dergelijk resultaat is ook bereikt door aan het gedestilleerde water enkel een zelfde hoeveelheid ammoniumsulfaat toe te voegen als in het voedingsmedium aanwezig is. De reactie verloopt dan practisch even snel.

Indien het gasmengsel in het reactievaatje een overmaat aan koolzuur bevatte t.o.v. de hoeveelheid waterstof, dan werden de in Tabel XXII weergegeven resultaten verkregen.

Ook hier moeten wij besluiten, dat de reductie van een deel van het aanwezige koolzuur volledig doorgaat tot het uiteindelijke reductieproduct methaan.

§ 4. Proefnemingen met *Methanobacterium formicicum*.

Evenals de beide eerder onderzochte bacteriën werd ook *Mb. formicicum* gecultiveerd in Hall-buizen van circa 35 cm^3 inhoud.

Van de uitgegiste cultures werd het sediment afgecentrifugeerd en na wassching opnieuw in het voedingsmedium gesuspenderd, dat evenwel geen natriumformiaat bevatte.

De in Tabel XXIII opgenomen uitkomsten werden verkregen in een viertal proefnemingen met koolzuur-waterstof mengsels.

In alle onderzochte gevallen, ook die waarbij overmaat koolzuur aanwezig is, wordt de theoretische hoeveelheid methaan gevormd. Immers de hoeveelheid verbruikte waterstof bedraagt resp. 59,2, 62,8, 39,0 en $25,2 \text{ cm}^3$. Hiermede kunnen dan theoretisch resp.: 14,8, 15,7, 9,8 en $6,3 \text{ cm}^3$ methaan worden verkregen. Deze waarden stemmen goed overeen met de in kolom 7 vermelde gevonden waarden.

Tabel XXII.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels, waarin een overmaat koolzuur aanwezig is, door *Mb. Omelianskii*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.		gehalte aan koolzuur in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.			verhouding —H ₂ /+CH ₄
	H ₂	CO ₂		H ₂	CO ₂	CH ₄	
515	40.2	40.3	50.1	4.3	29.6	9.3	3.9
516	26.4	52.9	66.7	2.5	45.6	6.3	3.8

Tabel XXIII.

Omzetting van koolzuur-waterstof mengsels door *Mb. formicum*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.		gehalte aan koolzuur in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.			verhouding —H ₂ /+CH ₄
	H ₂	CO ₂		H ₂	CO ₂	CH ₄	
316	61.9	15.2	19.7	2.7	—	14.9	4.0
351	64.3	15.3	19.2	1.5	—	14.5	4.3
359	41.3	39.1	48.6	2.3	29.6	9.8	4.0
360	27.2	53.7	66.4	2.0	46.7	6.4	4.0

Tabel XXIV.

Omzetting van als carbonaat gebonden koolzuur met gasvormige waterstof door *Mb. formicum*.

Proef No.	duur der proef in dagen	toegevoegde hoeveelheid waterstof in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0 ^o C.		gevonden verhouding —H ₂ /+CH ₄	eind-pH
			H ₂	CH ₄		
323	5	77.9	49.6	7.1	4.0	10.1
327	10	81.1	55.5	6.3	4.0	10.1
328	15	80.8	56.5	6.0	4.0	9.7

Bij de vergisting van natriumformiaat door *Mb. formicicum* gaat een gedeelte hiervan over in natriumcarbonaat, waardoor de pH van het medium belangrijk stijgt. Soms werden zelfs pH-waarden waargenomen van circa 9,0. Teneinde na te gaan of de reductie van koolzuur door waterstof ook bij deze hoge alkaliteit — dus bij praktische afwezigheid van vrij koolzuur — kon plaats vinden, werden niet-gewasschen sedimenten van *Mb. formicicum* in het gebruikelijke medium in een reactievaatje gebracht. Vervolgens werd nagegaan in hoeverre het hierin in den vorm van natriumcarbonaat aanwezige koolzuur, welke hoeveelheid in totaal ongeveer 16 mg bedroeg, bij aanwezigheid van waterstof in methaan zou worden omgezet.

De aanvankelijke pH van het medium varieerde in deze proeven tusschen 8,5 en 9,0.

De in tabel XXIV samengevatte uitkomsten laten zien, dat *Mb. formicicum* in staat is ook als carbonaat gebonden koolzuur met gasvormige waterstof te reduceeren en dat dientengevolge de alkaliteit van het medium somtijds zelfs tot een $\text{pH} = 10,1$ wordt opgevoerd.

Dit resultaat is zeer opmerkelijk, omdat het geheel afwijkt van de door Barker voor *Mb. Omelianskii* verkregen resultaten. Zooals in Hoofdstuk I, § 2 toch is vermeld, zou door laatstgenoemd organisme alleen het vrije koolzuur worden gereduceerd.

§ 5. Samenvatting.

Uit de in dit hoofdstuk vermelde proefnemingen is onmiskenbaar komen vast te staan, dat de door Wieringa op alleszins gerechtvaardigde gronden opgeworpen hypothese, volgens welke de methaanbacteriën niet in staat zouden zijn het koolzuur rechtstreeks met behulp van gasvormige waterstof tot methaan te reduceeren, terzijde kan worden gesteld.

Alle drie onderzochte reïncultures van uiteenlopende soorten van methaanbacteriën bleken in staat koolzuur met behulp van gasvormige waterstof rechtstreeks en kwantitatief in zijn uiteindelijke reductieproduct: methaan om te zetten.

Hiermede is het door Sö h n g e n reeds veertig jaren geleden uitgesproken — doch slechts op uitkomsten verkregen met ruw-cultures gebaseerde — inzicht, dat methaanbacteriën tot deze omzetting in staat zouden zijn, thans definitief bevestigd.

Nog zij opgemerkt, dat de in dit hoofdstuk beschreven proefnemingen alle reeds in den zomer van 1939 zijn verricht. Dr. H. A. Barker, dien ik met de verkregen uitkomsten in kennis had gesteld, heeft deze dan ook reeds in een zijner verhandelingen,

waarin hij eveneens het bewijs voor het vermogen der methaanbacteriën tot reductie van koolzuur met gasvormige waterstof brengt, kort vermeld¹⁾.

¹⁾ Zie: H. A. Barker, Proc. Nat. Acad. Sci, 29, 184, 1943.

HOOFDSTUK V.

ONDERZOEK NAAR DE VERVANGBAARHEID VAN HET KOOLZUUR ALS WATERSTOFACCEPTOR BIJ DE METHAANGISTING DOOR ANDERE VERBINDINGEN MET ÉÉN KOOLSTOFATOOM.

§ 1. *Inleidende opmerkingen.*

Zooals reeds in Hoofdstuk I, § 3 is uiteengezet, doet de carbonaatreductie-theorie der methaangisting de vraag aan de orde komen, in hoeverre het koolzuur bij de methaangisting als waterstof-acceptor door andere verbindingen met één koolstofatoom kan worden vervangen.

Wij vermeldden ter aangegeven plaatse reeds, dat Barker er naar gestreefd heeft vast te stellen, of bij de vergisting van aethylalcohol door *Mb. Omelianskii* het door deze bacteriesoort niet vergiste formiaat in de plaats van het koolzuur zou kunnen treden. Het resultaat van deze proefnemingen was twijfelachtig. Eenerzijds bleek afdoende, dat van een volledige vervangbaarheid van het koolzuur geen sprake was; indien koolzuur aan het medium werd onttrokken trad ook bij aanwezigheid van formiaat naast de aethylalcohol geen gisting in. Anderzijds bleek, dat indien bij aanwezigheid van een gelimiteerde koolzuurhoeveelheid formiaat werd toegevoegd er op den duur meer methaan ontstond dan met deze hoeveelheid koolzuur overeenkwam. Dit resultaat zou nu kunnen inhouden, dat de bacteriën na een zekere aanpassingsperiode inderdaad het formiaat als waterstofacceptor bij de voortgezette dehydrogenatie van aethylalcohol zijn gaan gebruiken, doch het zou evenzeer kunnen beteekenen, dat zij door aanpassing het vermogen hebben verkregen het formiaat te vergisten, d.w.z. deze verbinding onder gedeeltelijke koolzuurvorming te dehydrogeneeren.

Een nader onderzoek van deze situatie leek dus in hooge mate gewenscht en hierbij lag het voor de hand de vervangbaarheid van het koolzuur als waterstofacceptor bij de methaangisting te toetsen aan het uit substraat-oogpunt zoo eenvoudige systeem, dat in het vorige hoofdstuk uitvoerig is onderzocht. De methaanvorming uit een koolzuur-waterstof mengsel is toch welhaast de meest doorzichtige vorm van het methaangistingsproces en de vervanging in dit systeem van het koolzuur door andere éénkoolstof-verbindingen biedt het meeste uitzicht om op de gestelde vraag een scherp antwoord te verkrijgen.

Een dergelijk tot alle mij ter beschikking staande reïncultures uit te breiden onderzoek was nu des te meer aangewezen, omdat

uit de reeds meermalen vermelde, in 1933 verschenen, publicatie van Stephenson en Stickland zou volgen, dat deze onderzoekers de bewuste vervangbaarheid van het koolzuur door andere éénkoolstof-verbindingen voor de door hen bestudeerde bacteriesoort inderdaad hebben vastgesteld. Eenerzijds bestond er om de eerder uiteengezette redenen behoefte deze waarnemingen ook voor de door mij geïsoleerde formiaat-vergistende methaانبacterie te bevestigen, anderzijds leek het van groot belang voor ons inzicht in het wezen der methaangisting in het algemeen vast te stellen, of de bewuste vervangbaarheid van het koolzuur ook voor andere — formiaat niet vergistende — methaانبacteriën zou gelden. Juist omdat alle door mij in reincultuur verkregen soorten ten opzichte van het systeem koolzuur-waterstof zeer actief waren gebleken te zijn, zou aan de te verkrijgen uitkomsten groote waarde mogen worden gehecht.

De voor het onderzoek in aanmerking komende verbindingen zijn wel in de eerste plaats: mierenzuur, koolmonoxyde, formaldehyde en methylalcohol. Van deze verbindingen zal intusschen het koolmonoxyde in dit hoofdstuk niet ter sprake komen, aangezien er termen aanwezig waren om op het gedrag der methaانبacteriën ten opzichte van dit gas in een volgend hoofdstuk uitvoerig in te gaan.

§ 2. Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door mierenzuur.

Hoewel Stephenson en Stickland hun positieve resultaten over de waterstofacceptorwerking van formiaten juist hebben nagegaan voor een organisme, dat ook formiaten op zich zelf reeds tot methaan vergist, heb ik juist gemeend in dit verband mijn cultuur van *Mb. formicicum* buiten beschouwing te moeten laten. Het te verwachten positieve resultaat zou toch voor de vraagstelling geheel zonder betekenis zijn. Aangezien toch genoemde bacteriesoort formiaat vergist tot CO_2 en CH_4 in de verhouding 3 : 1 zou een extra verbruik aan waterstof niets anders behoeven te beteekenen dan dat het primair bij de vergisting gevormde koolzuur verder met de toegevoegde waterstof tot methaan zou worden gereduceerd. Eenige aanwijzing aangaande het vermogen der bacterie om formiaten rechtstreeks tot methaan te reduceeren zou hieraan niet zijn te ontleenen.

Veel belangrijker was het na te gaan, op welke wijze *Mb. Omelianskii* en *Ms. Barkerii*, welke beide soorten formiaten niet vermogen te vergisten, zich ten opzichte van het systeem formiaat-waterstof zouden gedragen. Vooral voor eerstgenoemde soort was dit van veel belang in verband met de in § 1 vermelde waarneming

van Barker, die voor de ook door mij gebruikte cultuur een verhooging van de methaanopbrengst door toevoeging van formiaat aan een aethylalcoholhoudend medium had vastgesteld.

Met het oog op de mogelijkheid, dat het in te stellen experiment een negatief resultaat zou opleveren, leek het van de grootste betekenis vast te stellen, dat een dergelijke uitkomst niet het gevolg zou zijn van een in slechte conditie verkeeren van het gebruikte bacteriën materiaal. Om deze reden heb ik bij alle in dit hoofdstuk te beschrijven proefnemingen steeds een parallelproef ingezet, waarbij naast de op haar bruikbaarheid als waterstof-acceptor te onderzoeken verbinding ook een bekende hoeveelheid koolzuur ter beschikking van de bacteriën werd gesteld. Hierbij was dan de toegevoegde hoeveelheid waterstof steeds in overmaat aanwezig, zoodat de bacteriën als het ware in de verleiding werden gebracht na het verbruik van het koolzuur ook de onderzochte verbinding als acceptor te gaan gebruiken.

Indien zoowel in de proefnemingen zonder koolzuur, als ook in de hierboven aangegeven parallelproefneming geen methaanvorming uit de toegevoegde éénkoolstof-verbinding werd vastgesteld, mag wel met zekerheid tot de onbruikbaarheid van deze verbinding als waterstofacceptor voor de methaangisting worden besloten.

Alle proefnemingen werden geheel uitgevoerd op de wijze, zooals dit in Hoofdstuk IV voor het onderzoek van de waterstof-koolzuur omzetting is beschreven.

Bij de eerste proefneming voegde ik aan 10 cm³ bacteriën-suspensie van *Mb. Omelianskii*, waarbij de bacteriën in het gebruikelijke minerale voedingsmedium waren gesuspenderd, 5 cm³ van een oplossing, welke 17 mg natriumformiaat per cm³ bevatte, dus in totaal 85 mg natriumformiaat, d.w.z. 1,25 millimolen mierenzuur, toe.

Het reactievatje werd na evacueering gevuld met waterstof en in de parallelproef met een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding 1 : 6.

De volgende, in Tabel XXV vermelde, resultaten werden verkregen. (Zie pag. 104-105)

Uit de tabel blijkt afdoende, dat niet de minste reductie van het toegevoegde formiaat heeft plaats gehad en dat bij de parallelproef al het toegevoegde koolzuur in methaan is omgezet (zie kolom 12). De aanwezigheid van het formiaat leidt er dus in dit laatste geval niet toe, dat er een extra hoeveelheid methaan wordt gevormd, zooals dit in de experimenten van Barker met aethylalcohol wel het geval was.

Mijn overeenkomstige proefnemingen met *Ms. Barkerii* hadden

geheel hetzelfde verloop; ook hier bleef het formaat in de beide parallelproeven kennelijk geheel onaangetast.

§ 3. *Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door formaldehyde.*

Uiteraard is het formaldehyde een alleszins denkbaar tusschen-product bij de reductie van koolzuur tot methaan. Anderzijds is de groote vergiftigheid van deze verbinding voor alle levende cellen maar al te zeer bekend.

Een oplossing van de hierin gelegen moeilijkheid is o.m. door Stephenson en Stickland aangegeven, die bij hun proefnemingen gebruik maakten van urotropine (= hexamethyleentetramine, $C_6H_{12}N_4$), zijnde dit een verbinding, welke in waterige oplossing gemakkelijk kleine hoeveelheden formaldehyde afsplitst.

De eerste proefnemingen leerden, dat ook van een 0,1 % oplossing van urotropine nog een merkbare remmende invloed op de methaangisting uitging. Bij een concentratie van 0,05 % bleken evenwel de methaانبacteriën hun volle activiteit te behouden, zoodat deze concentratie bij de verdere proefnemingen werd aangehouden. In dit verband dient te worden opgemerkt, dat Stephenson en Stickland aangaven, dat het door hen onderzochte organisme zelf een concentratie van 0,16 % nog verdroeg en onder deze voorwaarden een reductie van het formaldehyde constateerden.

Bij de proefneming werd een hoeveelheid van 8 cm³ bacteriën-suspensie in het reactievaatje gebracht, waarna 8 cm³ van een 0,1 % hexamethyleentetramine-oplossing, overeenkomend met 0,34 millimolen formaldehyde, werd toegevoegd.

Op deze wijze werden twee reactievaatjes klaar gemaakt, waarbij het eene met zuivere waterstof, en het andere met een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding 1 : 8 werd gevuld.

De uitkomsten zijn in Tabel XXVI samengevat.

Uit de verkregen uitkomsten blijkt, dat alleen bij aanwezigheid van koolzuur een aan de toegevoegde hoeveelheid koolzuur aequivalente hoeveelheid methaan wordt gevormd en dat dus blijkbaar formaldehyde niet tot methaan kan worden gereduceerd.

Geheel op dezelfde wijze zoowel met *Ms. Barkerii* als met *Mb. Omelianskii* uitgevoerde proefnemingen hadden een volkomen overeenkomstig resultaat.

Voor *Ms. Barkerii* werd bovendien nog een ander formaldehydederivaat in de proefnemingen betrokken, n.l. het reeds in Hoofdstuk III genoemde methylal of methyleendimethylaether [$CH_2(OCH)_3$]₂ dat in een concentratie van 0,7 % werd toege-

voegd. Echter leverden ook deze proeven wat betreft de verwerking van dit formaldehydederivaat een volkomen negatief resultaat op.

§ 4. Proefnemingen over de vervangbaarheid van het koolzuur door methylalcohol.

Voor deze proefnemingen werd weer gebruik gemaakt van de reeds in Hoofdstuk III, § 4 beschreven reactievaatjes met de twee boven elkaar aangebrachte kranen. Hierdoor werd het mogelijk een nauwkeurig bekende hoeveelheid methylalcohol aan de bacterie-suspensie toe te voegen.

Op deze wijze werd in twee vaatjes aan 10 cm³ bacterie-suspensie resp. 51,9 mg, overeenkomende met 1,62 millimolen en 85,2 mg, overeenkomende met 2,66 millimolen methylalcohol toegevoegd.

Het eerste vaatje werd verder met waterstof en het tweede met een mengsel van koolzuur en waterstof in de verhouding van 1 : 6 gevuld.

Bij deze proefnemingen werden de in Tabel XXVII vermelde resultaten verkregen.

Andermaal in tegenstelling met hetgeen door Stephenson en Stickland voor het door hen geïsoleerde organisme is geconstateerd, n.l. een vlotte reductie van de toegevoegde methylalcohol, was er in de door mij verrichte proefneming geenerlei sprake van eenige omzetting van de alcohol. De gevonden factor voor de verhouding $-H_2/+CH_4$ van 4,1 in de controleproef laat geen twijfel, dat de geheele hoeveelheid methaan door reductie van koolzuur is ontstaan.

Op dezelfde wijze als hier van *Mb. formicicum* is beschreven, werd eveneens voor *Mb. Omelianskii* de mogelijkheid van de reductie van methylalcohol nagegaan. Ook hier was het resultaat in bedoeld opzicht geheel negatief.

Naar het gedrag van *Ms. Barkerii*, welk organisme in staat is de methylalcohol als zoodanig te vergisten, werd uiteraard geen onderzoek ingesteld.

§ 5. Samenvatting.

De in de voorafgaande paragrafen beschreven proefnemingen leeren onmiskenbaar, dat voor geen der drie onderzochte soorten van methaanbacteriën het koolzuur als waterstofacceptor door éénkoolstof-verbindingen als mierenzuur, formaldehyde en methylalcohol kan worden vervangen. Althans niet voor zoover gasvormige waterstof als waterstofdonator wordt toegepast.

Het verloop der steeds verrichte parallelproefnemingen, waarbij naast de onderzochte koolstofverbinding tevens nog een beperkte

hoeveelheid koolzuur werd toegevoegd, leert enerzijds, dat dit negatieve resultaat niet kan worden toegeschreven aan een minder goede activiteit van het gebruikte bacteriën materiaal, dan wel aan een onvolmaaktheid der gekozen proefvoorwaarden. Anderzijds is aan bedoelde proefnemingen te ontleenen, dat bij het op gang brengen der methaangisting met koolzuur geen geleidelijke aanpassing aan de verwerking der éénkoolstof-verbindingen — zooals die door Barker in het geval van formiaat bij de vergisting van aethylalcohol door *Mb. Omelianskii* is vastgesteld — plaats heeft gevonden.

De door mij verkregen negatieve resultaten contrasteeren intusschen het scherpst met de door Stephenson en Stickland voor het door hen onderzochte formiaatvergistende organisme verkregen uitkomsten Wij moeten hieruit wel besluiten, dat dit helaas niet nader beschreven organisme niet identiek was met onze eveneens formiaatvergistende cultuur van *Mb. formicicum*.

Hoe dit ook zijn moge, in elk geval houden onze uitkomsten een ernstige waarschuwing in om de door de Engelsche onderzoekers beschreven resultaten niet te interpreteren als een aanwijzing, dat in het algemeen bij de methaangisting mierenzuur, formaldehyde en methylalcohol optreden als tusschenproducten bij de reductie van koolzuur tot methaan.

Tabel XXV.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof in		toegevoegde hoeveelheid koolzuur in		cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.
	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	
521	80.9	3.64	—	—	80.9
524	62.6	2.87	11.4	0.51	18.2

Tabel XXVI.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof in		toegevoegde hoeveelheid koolzuur in		cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.
	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	
321	71.0	3.20	—	—	71.4
320	64.2	2.89	8.1	0.36	33.3

Tabel XXVII.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid waterstof in		toegevoegde hoeveelheid koolzuur in		cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.
	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0 ⁰ C.	milli- molen	
371	80.2	3.61	—	—	83.6
372	72.3	3.25	12.2	0.55	18.2

Van natriumformiaat voorziene suspensies van Mb. Omelianskii, waaraan resp. waterstof en een mengsel van waterstof en koolzuur is toegevoegd.

bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden					
of milli- molen	koolzuur		methaan		verhouding —H ₂ / /+CH ₄
	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	
3.64	—	—	—	—	—
0.82	—	—	11.2	0.50	4.0

Van hexamethyleentetramine voorziene suspensies van Mb. formicum, waaraan resp. waterstof en een mengsel van waterstof en koolzuur is toegevoegd.

bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden					
of milli- molen	koolzuur		methaan		verhouding —H ₂ / /+CH ₄
	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	
3.21	—	—	—	—	—
1.50	—	—	7.8	0.35	4.0

Van methylalcohol voorziene suspensies van Mb. formicum, waaraan resp. waterstof en een mengsel van waterstof en koolzuur is toegevoegd.

bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden					
f milli- molen	koolzuur		methaan		verhouding —H ₂ / /+CH ₄
	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	
3.71	—	—	—	—	—
0.82	—	—	13.1	0.59	4.1

HOOFDSTUK VI.

DE ANAEROBE VERWERKING VAN ZUIVER KOOLMONOXYDE DOOR RUWCULTURES.

§ 1. *Inleiding.*

Het werk van Lieske en Hofmann en dat van Fischer betreffende de anaërobe omzetting van koolmonoxyde is reeds in Hoofdstuk I, § 3 besproken. Naar aanleiding hiervan en mede in verband met het onderzoek, dat ik naar de aantastbaarheid van koolmonoxyde door reincultures van methaanbacteriën wilde instellen, kwam het mij gewenscht voor eerst zelf eenige ervaring op te doen aangaande de verwerking van zuiver koolmonoxyde door ruwcultures onder anaërobe voorwaarden.

Alvorens tot een bespreking van de verkregen resultaten over te gaan, wil ik hier in herinnering brengen, dat Lieske en Hofmann¹⁾ reeds in 1930 aantoonde, dat ruwcultures, verkregen door sloopmodder of ander anaëroob rottingsmateriaal te brengen in een mineraal voedingsmedium, in staat zijn om koolmonoxyde met behulp van waterstof te verwerken volgens de vergelijking:



Voorts zij er aan herinnerd, dat Fischer en zijn medewerkers Lieske en Winzer in een tweetal verhandelingen²⁾ nader op het mechanisme van deze omzetting ingingen en hierbij o.m. twee belangrijke feiten vaststelden:

In de eerste plaats bleek het hun bij proefnemingen, waarin zoowel biologische reductie van koolzuur, alsmede ook die van koolmonoxyde, met behulp van gasvormige waterstof werd bestudeerd, dat niet zelden aanvankelijk een verdwijnen van de genoemde gassen plaats vond, zonder dat hiertegenover een aequivalente hoeveelheid methaan of ander gasvormig omzettingsproduct werd gevormd. Dit wees er dus op, dat in deze gevallen uit de genoemde gassen primair een niet-gasvormig tusschenproduct ontstond, dat dan evenwel later weer in koolzuur en methaan werd omgezet.

Dit tusschenproduct kon vervolgens door Fischer en medewerkers als azijnzuur worden geïdentificeerd, dat dan uit koolzuur zou zijn ontstaan volgens de vergelijking:



Wat het koolmonoxyde betreft meenen de genoemde onder-

¹⁾ R. Lieske und E. Hofmann, Brennstoffchemie 11, 208, 1930.

²⁾ F. Fischer, R. Lieske und K. Winzer, Biochem. Zeitschr. 236, 247, 1931 en Biochem. Zeitschr. 245, 2, 1932.

zoekers in hun proefnemingen voldoende aanwijzingen te vinden om te besluiten, dat de primaire omzetting van koolmonoxyde door de bacteriën steeds een reactie met water is volgens de vergelijking:



Hierop zou zich dan de zooeven genoemde reactie, welke tot azijnzuur leidt, aansluiten, dat dan uiteindelijk weer in koolzuur en methaan zou worden gesplitst.

Deze voorstelling leidt vanzelf tot de conclusie, dat de gebruikte reïncultures in staat moeten zijn ook zuiver koolmonoxyde in afwezigheid van waterstof tot koolzuur en methaan om te zetten.

De experimenteele bevestiging van dit gezichtspunt is dan ook het tweede belangrijke door de Duitsche onderzoekers vastgestelde feit. Wij wezen er evenwel in Hoofdstuk I, § 3 reeds op, dat bij de eenige dienaangaande verrichte proefneming ten gunste van het voorgestelde reactiemechanisme slechts zwakke aanwijzingen werden verkregen.

Aangezien bij de in dit en in het volgende Hoofdstuk te beschrijven proefnemingen, rekening moest worden gehouden met de mogelijkheid, dat in de uiteindelijk te analyseeren gasmengsels vier gassen namelijk: waterstof, koolmonoxyde, koolzuur en methaan gelijktijdig aanwezig zouden zijn, werd de analyse dezer gasmengsels in beginsel steeds als volgt uitgevoerd.

Aan een bekende hoeveelheid van het te analyseeren gasmengsel (A) werd met geconcentreerde kaliloog het koolzuur onttrokken. De optredende volumevermindering geeft de hoeveelheid koolzuur weer (k).

De resterende hoeveelheid van het gasmengsel (A—k) werd met een bekende overmaat zuurstof (z) gemengd (A—k+z) en dit mengsel tot explosie gebracht. De volumecontractie (B) werd hierop gemeten.

In het na de verbranding ontstane gasmengsel werd de aanwezige hoeveelheid koolzuur vastgesteld, door de volumecontractie, welke optreedt nadat het gasmengsel weer met geconcentreerde kaliloog in aanraking is geweest. Deze hoeveelheid koolzuur (a) is gelijk aan de som van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheden koolmonoxyde (x) en methaan (y), aangezien elk volume koolmonoxyde en elk volume methaan een volume koolzuur oplevert bij de verbranding.

Indien de hoeveelheid koolzuur a in mindering wordt gebracht van het gasmengsel vóór de toevoeging van de zuurstof (A—k), verkrijgt men de in het gasmengsel aanwezige hoeveelheid waterstof: deze is dus A—k—a.

Uit de gevonden hoeveelheid waterstof ($A-k-a$) kan men de hiervoor bij de verbranding benodigde hoeveelheid zuurstof berekenen [$1/2(A-k-a)$]. Aangezien de totale contractie (B) van het gasmengsel bekend is en tevens welk deel daarvan op rekening van de waterstof komt, n.l. $1\frac{1}{2} (A-k-a)$, is tevens de voor de verbranding van het koolmonoxyde en het methaan benodigde hoeveelheid zuurstof bekend, n.l.: $B-1\frac{1}{2} (A-k-a)$.

Voor de hoeveelheid koolmonoxyde (x) en de hoeveelheid methaan (y) gelden nu de volgende betrekkingen:

$$\begin{aligned} x + y &= a \\ \frac{1}{2} x + 2y &= B - 1\frac{1}{2} (A-k-a) \end{aligned}$$

waaruit dus x en y eenvoudig zijn te berekenen.

§ 2. Koolmonoxyde-omzetting zonder vorming van methaan.

Een mengsel van 15 cm³ rioolmodder en 60 cm³ water werd in een reactievat gebracht, zooals dit in Hoofdstuk III, § 4 is beschreven. Er was echter dit verschil, dat het volume van het nu gebruikte reactievat ongeveer vijfmaal zoo groot was, te weten: 477 cm³. Na evacuatie werd het apparaat gedeeltelijk met zuivere koolmonoxyde gevuld; in totaal werd toegevoegd 296,3 cm³ gemeten bij 760 mm/0° C. Nadat dit apparaat gedurende tien dagen bij 30° C. was geschud, bleek het aanwezige gas uit enkel koolzuur te bestaan en wel 170,0 cm³ herleid tot 760 mm/0° C., terwijl de pH van het medium tot 6,4 was gedaald.

Het opmerkelijke geval doet zich dus voor dat noch waterstof noch methaan bij de omzetting van het koolmonoxyde bleek te zijn gevormd.

Ik besloot daarom de proefneming te herhalen maar thans in een reactievat verbonden aan een open kwikmanometer, waarbij het geheel op de schudmachine was gemonteerd. Op deze wijze kon gedurende den geheelen duur der proefneming het reactieverloop manometrisch worden gevolgd en zodoende de hoeveelheid gas op elk waarnemingsmoment worden berekend. Hoewel soms tot zes keer per dag werd afgelezen, zijn in de grafiek van Fig. 4 alleen de telkens na 24 uur verrichte waarnemingen opgenomen. Het bleek, dat na drie dagen een afneming van het gasvolume begon op te treden, die een viertal dagen voortduurde, waarna geenerlei contractie meer optrad. Er werd op den zevenden dag der proefneming een analyse verricht van het zich in het toestel bevindende gasmengsel; dit bleek wederom uitsluitend uit koolzuur te bestaan. Na afloop van de proef werd het toestel andermaal geëvacueerd en opnieuw met zuiver koolmonoxyde gevuld. Ook nu weer werd bij 30° C. geschud. De contractie begon dezen keer

dadelijk en was na twee dagen geëindigd; de ingestelde analyse toonde aan, dat de gasatmosfeer andermaal uitsluitend uit koolzuur bestond.

Indachtig aan de door Fischer c.s. bij de omzetting van een kooloxyde-waterstof mengsel en door Wieringa bij de omzetting van een koolzuur-waterstof mengsel verkregen resultaten, lag het voor de hand aan een mogelijke vorming van azijnzuur te denken. Het onderzoek leerde dan ook, dat de pH van de suspensie was gedaald tot 4,4 en dat in het medium een vluchtig vetzuur aanwezig was, hetwelk azijnzuur bleek te zijn. Dit werd aangetoond door de vloeistof met 25 % zwavelzuur aan te zuren tot een pH = 3 en daarna aan een stoomdestillatie te onderwerpen. Het destillaat werd met 0,1 n kaliloog geneutraliseerd en ingedampt. In de geconcentreerde oplossing kon het azijnzuur microchemisch met koper-sulfaat worden aangetoond als koperacetaat, op de wijze zooals door Klein en Wenzel¹⁾ is aangegeven.

Het reactieverloop van beide proefnemingen is in Fig. 4 weer-gegeven.

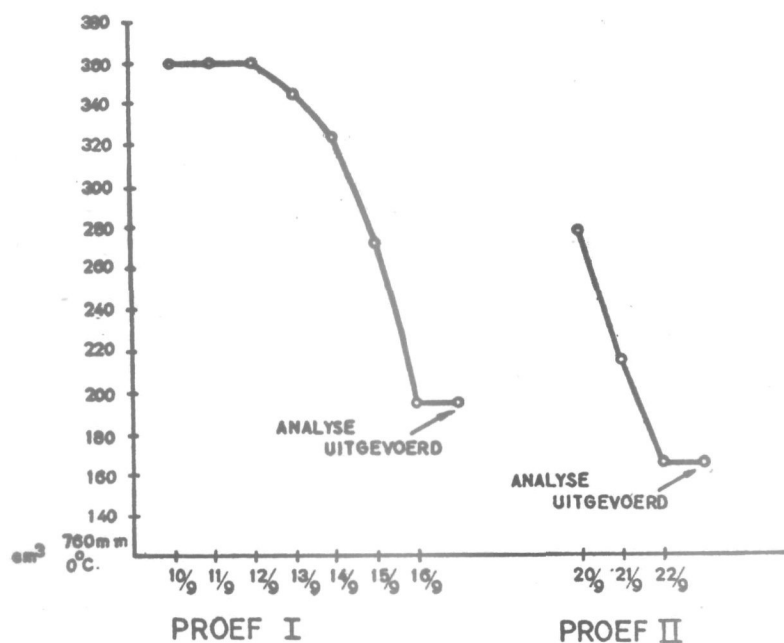
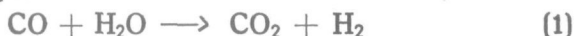


Fig. 4.

De vergisting van zuiver koolmonoxyde door ruwcultures.

1) G. Klein und H. Wenzel, Mikrochemie 11, 73, 1932.

Het geheel der verkregen uitkomsten maakt het waarschijnlijk, dat zich in de beide beschreven proefnemingen de volgende reacties hebben afgespeeld:



Het verschil met de door Fischer en medewerkers bij de omzetting van zuiver koolmonoxyde verkregen resultaten zou dan hierin kunnen zijn gelegen, dat in de door deze onderzoekers beschreven proefnemingen tevens nog de reactie:



zou zijn opgetreden.

Dit zou ook zoo zijn te formuleeren, dat in het geval van de uiteindelijke omzetting



intermediair azijnzuur wordt gevormd, dat onder de voorwaarden, welke in mijn proefnemingen waren gerealiseerd, niet verder werd omgezet.

Om een wat nader inzicht in het verloop der omzettingen te verkrijgen werd nog een nieuwe proefneming ingezet. Ditmaal werd een kleiner apparaatje met een totaal volume van 89,7 cm³ gebruikt. Hierbij werd 1 cm³ van het mengsel: 15 cm³ rioolmodder + 60 cm³ leidingwater, dat bij de zoeven genoemde twee proefnemingen was gebruikt, gemengd met 9 cm³ slootmodderextract (1 : 1), terwijl als sedimentbestanddeel een kleine hoeveelheid fijngemalen asbest werd toegevoegd. Complicaties, welke eventueel door de aanwezigheid van rotbare bestanddelen van de rioolmodder zouden kunnen optreden, waren dus ditmaal praktisch buitengesloten. Het slootmodderextract, dat lichtbruin was gekleurd, werd even van te voren opgekookt ter verwijdering van opgeloste zuurstof.

Na evacuatie van het vaatje werd 63,6 cm³ CO, gemeten bij 760 mm/0° C. toegevoegd en het geheel zeven dagen bij 30° geschud. Bij de na afloop van de zeven dagen verrichte gasanalyse, bleek het volume te zijn toegenomen tot 76,5 cm³ bij 760 mm/0° C.

Een in duplo verrichte analyse had tot gemiddeld resultaat 62,7 % CO₂ en 37,3 % H₂, d.w.z. 47,8 cm³ CO₂ en 28,7 cm³ H₂ beide gemeten bij 760 mm/0° C. Alle koolmonoxyde bleek te zijn verbruikt, terwijl de pH van het medium was gedaald tot 4,5.

In dit geval had blijkbaar de volgende omzetting plaats gevonden:



Voor de eerste maal is hier dus waterstof in een aanmerkelijke

hoeveelheid aangetoond als product van een biologische omzetting van zuiver koolmonoxyde.

Wij moeten welhaast besluiten, dat in deze laatste proefneming, aangezien geen CO meer aanwezig is, reactie (1) voor 100 % is verlopen, terwijl reactie (2) niet volledig verliep, doch slechts voor het hieronder te berekenen percentage:



Verdwenen is 34,9 cm³ H₂. Reactie (2) is dus voor $\frac{34.9}{0.636} = 55 \%$ verlopen.

In millimolen is de vastgestelde omzetting:



Secundair zijn verdwenen $2.84 - 1.29 = 1.55$ m.m. waterstof, wat correspondeert met het verdwijnen van 0,77 m.m. koolzuur. Gevonden werd het verdwijnen van 0,69 m.m. koolzuur, zoodat de overeenstemming alleszins bevredigend is.

Het verschil van deze proefneming met de eerder beschrevene in het grootere apparaat, zou dus zijn gelegen in het feit, dat in het laatste geval de reactie $2\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ niet volledig is verlopen, maar waarschijnlijk tengevolge van de dalende pH te vroeg tot stilstand is gekomen. Het gebruikte medium heeft kennelijk een veel mindere bufferende werking dan de eerder gebruikte moddersuspensie.

Deze proefneming werd nog eenige malen herhaald. In een tweede proefneming werd het volgende resultaat verkregen:



Klaarblijkelijk zijn hier 39,8 cm³ waterstof verbruikt bij de vorming van azijnzuur, waarvoor noodig zijn 19,9 cm³ koolzuur, zoodat de overeenstemming met het geconstateerde tekort van 19,7 cm³ koolzuur uitstekend mag worden genoemd.

In Tabel XXVIII zijn deze twee proefnemingen tezamen met nog twee andere opgenomen.

De in kolommen 7 en 8 vermelde cijfers werden verkregen door de hoeveelheden koolzuur en waterstof, welke theoretisch maximaal uit de verbruikte hoeveelheid koolmonoxyde kunnen worden gevormd, te verminderen met de bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden koolzuur en waterstof.

Proef no. 21 werd opzettelijk reeds na vier dagen afgebroken, hetgeen er toe heeft geleid, dat de reactie $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ voor slechts 68 % was verlopen. De secundaire reactie was op dat moment „bij” en reeds voor 91 % van de mogelijke hoeveelheid verlopen. Vergelijking der uitkomsten met die der voorafgaande proefnemingen leidt tot de conclusie, dat bij het voort-

schrijden van de proef de primaire reactie niet zoo sterk door een lage pH wordt geremd, als de secundaire azijnzuurvorming. Uit de tabel blijkt bovendien, dat in alle gevallen, de verhouding tusschen de verdwenen hoeveelheden primair gevormd koolzuur en waterstof de theoretische waarde van 2,0 benadert.

Op grond van deze proefnemingen is uiteraard niets te zeggen aangaande de vraag, of de beide reacties door één en hetzelfde organisme worden veroorzaakt, dan wel dat verschillende organismen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Het zou zeer wel mogelijk zijn, dat de reactie $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ door een nog onbekend organisme wordt veroorzaakt, terwijl de reactie $2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ zou kunnen zijn bewerkt door het organisme, dat Wieringa¹⁾ isoleerde en beschreef.

Eventueel zou vervolgens onder daartoe gunstige voorwaarden een methaanorganisme kunnen optreden en het azijnzuur omzetten tot methaan en koolzuur. Anderzijds mag de in Hoofdstuk IV aangetoonde mogelijkheid van een directe omzetting van koolzuur en waterstof tot methaan door het methaanorganisme niet uit het oog worden verloren.

§ 3. Koolmonoxyde-omzetting met vorming van methaan.

Het gelukte nu bij een nieuwe proefneming met moddersuspensie, waarbij werd uitgegaan van een versch mengsel van 25 cm³ rioolmodder en 50 cm³ leidingwater, na herhaalde toevoeging van zuiver koolmonoxyde ook methaanvorming te verkrijgen. In een drietal experimenten werden de in Tabel XXIX opgenomen resultaten verkregen.

Men kan de in Tabel XXIX verkregen resultaten verklaren door aan te nemen, dat

a. de reactie $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ voor 100 % heeft plaats gevonden, aangezien geen koolmonoxyde meer voorhanden is;

b. de reactie $2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ eveneens voor 100 % is verlopen, aangezien geen waterstof meer kon worden aangetoond;

c. de reactie $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$ slechts gedeeltelijk heeft plaats gevonden.

Echter blijft het ook mogelijk, dat reactie b maar ten deele is verlopen en reactie c maar ten deele of in het geheel niet en het verdwijnen van de waterstof op een rechtstreeksche reductie van koolzuur tot methaan moet worden teruggevoerd.

¹⁾ K. T. Wieringa, *Antonie van Leeuwenhoek* 3, 1, 1936.

Tabel XXVIII.

Omzetting van zuiver koolmonoxyde door ruwcultures.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid koolmon- oxyde in millimolen	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in millimolen			omzetting $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$ $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ is verloopen voor	omgezette hoeveelheden van de prim. reactie prod. in millimolen		verhouding verdwenen koolzuur en waterstof	omzetting $2 \text{CO}_2 +$ $4 \text{H}_2 \rightarrow$ CH_3COOH verloopen voor
		CO	CO ₂	H ₂		CO ₂	H ₂		
20	2.84	—	2.15	1.29	100%	0.69	1.55	1 : 2.25	55%
22	2.75	—	1.89	0.98	100%	0.86	1.77	1 : 2.06	64%
23	2.79	0.06	1.68	0.46	98%	1.05	2.27	1 : 2.16	83%
21	2.86	0.90	1.18	0.17	68%	0.78	1.79	1 : 2.30	91%

Tabel XXIX.

Omzetting van zuiver koolmonoxyde door ruwcultures afkomstig
van rioolmodder.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid koolmonoxyde in		bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden					
			koolmonoxyde in		koolzuur in		methaan in	
	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen	cm ³ bij 760 mm/0° C.	milli- molen
17	292	13.0	—	—	205	9.2	58	2.6
15	283	12.6	—	—	209	9.4	61	2.7
6	297	13.3	—	—	165	7.4	26	1.2

Onafhankelijk van de doorloopen reactieweg moeten bij volledige omzetting van het koolmonoxyde de verkregen uitkomsten aan de hieronder volgende betrekking voldoen.

Stel:

de hoeveelheid omgezet koolmonoxyde = a

de hoeveelheid geproduceerd koolzuur = b

de hoeveelheid geproduceerd methaan = c

dan moet:

a — (hoeveelheid CO verwerkt tot azijnzuur) = b + c

Immers het uit als azijnzuur teruggevonden koolmonoxyde zal zijn omgezet volgens de vergelijking:



Dit houdt in, dat

$$a - \frac{a - 4c}{2} = b + c$$

$$\frac{1}{2} a = b - c$$

of in woorden:

het halve volume van het verbruikte koolmonoxyde = het verschil van de volumina geproduceerd koolzuur en methaan.

Voor de drie in Tabel XXIX vermelde proefnemingen draagt het laatstgenoemde verschil: 147, 148 en 139 cm³. Indien men deze uitkomsten vergelijkt met de halve hoeveelheden verbruikt koolmonoxyde, te weten: 146, 142 en 148 cm³, is de overeenstemming alleszins bevredigend te noemen.

Wanneer men met Barker aanvaardt, dat elke methaangisting dus in het beschouwde geval eveneens de vergisting van azijnzuur, uiteindelijk een koolzuurreductie-proces is, zou het gegeven beeld der reacties nog aanmerkelijk gecompliceerder moeten worden.

Aangezien het echter op grond van de door Wieringa bij de omzetting van koolzuur en waterstof verkregen uitkomsten waarschijnlijk is, dat bij deze met ruwcultures uitgevoerde omzettingen meer dan één organisme aan het reactieverloop deelneemt, heeft het weinig zin hier nader op het spel der in elkaar grijpende chemismen in te gaan. Het was nu aangewezen te onderzoeken tot welke der aanvaarde reactietrappen reincultures van methaanbacteriën in staat zouden blijken te zijn.

§ 4. Samenvatting.

Bij de verwerking van koolmonoxyde door met toevoeging van relatief groote hoeveelheden rioolmodder verkregen ruwcultures werd in de eerste proefnemingen vastgesteld, dat dit gas in koolzuur

en azijnzuur werd omgezet. Toen uit deze ruwcultures een kleine hoeveelheid werd overgeënt in een passend medium werd evenwel geconstateerd, dat naast het eveneens weer gevormde koolzuur en azijnzuur steeds ook waterstof, somtijds in aanmerkelijke hoeveelheden, in het uiteindelijke gasmengsel werd aangetroffen. Dit resultaat is een bevestiging van het inzicht van Fischer et al., dat de primaire reactie van het koolmonoxyde hierin bestaat, dat het met water onder de vorming van koolzuur en waterstof reageert, waarbij dan deze producten secundair aanleiding geven tot de reeds door Fischer en door Wieringa beschreven vorming van azijnzuur.

In een derde proevenreeks, waarbij van een versche rioolmodder werd uitgegaan, gelukte het nu de reeds door Fischer beschreven resultaten te reproduceeren, met dien verstande, dat thans ook methaan onder de eindproducten werd verkregen. Dit resultaat zou kunnen worden toegeschreven aan een thans mogelijk eveneens opgetreden methaangisting van het primair gevormde azijnzuur. Gezien evenwel de door mij in Hoofdstuk IV beschreven rechtstreeksche koolzuurreductie tot methaan door methaanbacteriën, zou ook deze reactie zich naast de azijnzuurvormende reactie kunnen hebben afgespeeld.

Aangezien het echter waarschijnlijk was, dat bij de hier bestudeerde ruwcultures meer dan één organisme aan het reactieverloop deelneemt, werd besloten thans het gedrag der verkregen rein-cultures van methaanbacteriën t.o.v. koolmonoxyde na te gaan.

HOOFDSTUK VII.

DE VERWERKING VAN KOOLMONOXYDE DOOR REINCULTURES VAN METHAANBACTERIËN, AL DAN NIET BIJ AANWEZIGHEID VAN GASVORMIGE WATERSTOF.

§ 1. Inleiding.

Na de opmerkelijke, in het vorige hoofdstuk beschreven ervaringen betreffende de anaërobe verwerking van koolmonoxyde door reencultures was het van groot belang na te gaan, hoe de tot mijn beschikking staande reencultures van methaانبacteriën zich ten opzichte van dit substraat zouden gedragen.

Tot dusver waren aangaande de verwerking van koolmonoxyde door reencultures van methaانبacteriën alleen de eerder genoemde gegevens van Stephenson en Stickland beschikbaar, volgens welke de door hen geïsoleerde bacteriën in staat waren koolmonoxyde met behulp van gasvormige waterstof tot methaan te reduceeren. Zooals evenwel reeds in Hoofdstuk V, § 5 is opgemerkt, was in dit geval de reinheid der gebruikte cultures aan twijfel onderhevig.

Voor mijn eigen proefnemingen was het aangewezen om in de eerste plaats aandacht te schenken aan de twee reencultures, welke afkomstig waren van ophooping en met substraten met één C-atoom, dus aan *Methanosarcina Barkerii* en *Methanobacterium formicicum*.

§ 2. Proefnemingen met *Methanosarcina Barkerii*.

In de eerste plaats besloot ik voor mijn reencultuur van *Methanosarcina Barkerii* na te gaan in hoeverre deze in staat was koolmonoxyde met behulp van gasvormige waterstof om te zetten. Te dien einde werd 10 cm³ suspensie van *Ms. Barkerii* in een der eerder beschreven reactievaatjes gebracht en dit na evacueeren gevuld met een mengsel van waterstof en koolmonoxyde. De concentratie van het koolmonoxyde in de reactievaatjes varieerde bij de verschillende proeven van 10,6 % tot 24,2 %.

De schudduur bedroeg doorgaans vijf dagen bij een temperatuur van 30° C.

De resultaten zijn in de Tabellen XXX en XXXI weergegeven.

Tabel XXX.

Omzetting van koolmonoxyde-waterstof mengsels door
Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.		concentratie CO in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			verhouding $\frac{-H_2}{+CH_4}$
	H ₂	CO		H ₂	CO	CH ₄	
211	70.0	8.3	10.6	47.9	—	7.6	2.9
212	70.6	8.7	11.0	48.1	—	7.8	2.9
213	70.3	11.8	14.4	39.7	—	10.3	3.0
214	64.4	12.7	16.5	28.2	—	12.6	2.9
215	60.1	19.2	24.2	10.0	—	17.3	2.9

In millimolen krijgen we de volgende in Tabel XXXI vermelde cijfers.

Tabel XXXI.

Vergelijking van de gevonden en de theoretisch te verwachten hoeveelheden methaan bij de omzetting van koolmonoxyde-waterstof mengsels door Ms. Barkerii.

Proef No.	hoeveelheid verbruikte waterstof in millimolen	hoeveelheid verdwenen koolmonoxyde in millimolen	hoeveelheid methaan geproduceerd in millimolen	hoeveelheid methaan berekend op verbruikte waterstof ($\frac{1}{3}$)
211	1.00	0.36	0.34	0.33
212	1.01	0.39	0.35	0.34
213	1.39	0.53	0.46	0.46
214	1.63	0.57	0.56	0.55
215	2.26	0.86	0.77	0.76

Blijkens Tabel XXX, kolom 8, is de verhouding tusschen de verdwenen hoeveelheid waterstof en de geproduceerde hoeveelheid methaan gemiddeld: 2.9. De theoretische verhouding, indien de reactie werkelijk volgens de bekende bruto-vergelijking verloopt, is: 3.0. De overeenstemming is dus zeer goed.

Deze theoretische overeenstemming is ook duidelijk af te lezen uit Tabel XXXI, waarin het reactieverloop van de proeven in millimolen is weergegeven. Immers voor elke drie moleculen verbruikte waterstof moet er theoretisch één molecuul methaan worden

gevormd. Het aantal geproduceerde millimolen methaan moet dus gelijk zijn aan één derde gedeelte van het aantal verbruikte millimolen waterstof. De in de laatste twee kolommen van Tabel XXXI opgenomen cijfers geven inderdaad een uitstekende overeenstemming te zien.

Bovenstaande uitkomsten wekken den indruk, dat *Ms. Barkerii* in staat is koolmonoxyde rechtstreeks tot methaan te reduceeren. Men zou hierin tevens een aanwijzing kunnen zien ten gunste van de voorstelling, dat bij reductie van koolzuur door genoemde bacterie het koolmonoxyde een tusschenproduct zou kunnen zijn op den weg naar het methaan.

De hieronder te vermelden proefnemingen leerden nu evenwel dat de situatie in werkelijkheid anders is.

Wanneer namelijk bij de bovengenoemde proeven niet de normale schudduur van vijf à zes dagen werd aangehouden, maar de proeven integendeel reeds na drie dagen werden onderbroken, bleek bij analyse van het gasmengsel, dat hierin naast een nog niet verwerkte hoeveelheid koolmonoxyde varieerende hoeveelheden koolzuur konden worden aangetoond.

In Tabel XXXII zijn de uitkomsten weergegeven van een viertal proefnemingen.

Tabel XXXII.

Onvolledige omzetting van koolmonoxyde-waterstof mengsels door Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in cm^3 bij 760 mm/0° C.		concentratie van het koolmonoxyde in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm^3 bij 760 mm/0° C.			
	H ₂	CO		H ₂	CO	CO ₂	CH ₄
202	65.5	7.4	10.1	57.3	4.2	1.0	2.5
197	64.9	12.7	16.4	60.1	10.3	0.8	1.5
198	56.9	18.0	24.1	48.5	14.0	1.1	2.5
147	51.2	16.9	24.8	48.2	5.1	5.8	2.5

Opgemerkt moet worden, dat de in Tabel XXXII vermelde eindanalysen, voor wat het koolzuur betreft, niet zoo nauwkeurig zijn, tengevolge van het buiten beschouwing laten van de kleine hoeveelheden in de vloeistof opgelost koolzuur. Het optreden van belangrijke kwantiteiten koolzuur bij dergelijke proefnemingen is niettemin aan geen twijfel onderhevig.

Deze proefnemingen leiden tot de conclusie dat inderdaad als primaire reactie bij de reductie van het koolmonoxyde tot methaan,

uit het koolmonoxyde met water koolzuur en waterstof wordt gevormd. Eerst daarna heeft door de aanwezige en door de geproduceerde waterstof de reductie van het gevormde koolzuur tot methaan plaats. Een en ander dus volgens de vergelijkingen:



In deze proefnemingen is thans voor de eerste maal aangetoond, dat ook de reeds eerder voor de ruwcultures vastgestelde reactie (1) door het methaanorganisme wordt bewerkt. Al naar gelang van de snelheid, waarmede de twee reacties verlopen, is er een andere verhouding tusschen het experimenteel vastgestelde verbruik aan waterstof en de geproduceerde hoeveelheid methaan.

Uit de in Tabel XXXII weergegeven proefnemingen blijkt duidelijk, dat, aangezien koolzuur kon worden aangetoond, het methaanorganisme de reactie (1) sneller doet verlopen dan de reductie van het geproduceerde koolzuur tot methaan.

Als een logische consequentie uit de hierboven weergegeven proefnemingen volgt, dat een reïncultuur van *Ms. Barkerii* in staat moet zijn koolmonoxyde als zoodanig — dus bij afwezigheid van waterstof — te vergisten en hieruit koolzuur en methaan te produceeren. Dit beteekent dus, dat deze bacteriesoort het volgende simpele gistingsproces moet kunnen bewerken:



Teneinde hiervoor het rechtstreeksche experimenteele bewijs te brengen, is een aantal proefnemingen in reactievaatjes ingezet met 10 cm³ suspensie van *Ms. Barkerii* als bacteriën materiaal, waarbij na het evacueeren een mengsel van stikstof en koolmonoxyde werd toegevoegd. De concentratie van het mengsel van stikstof en koolmonoxyde varieerde bij deze proeven van 19,9 % tot 100 %. In alle gevallen werd vijf dagen geschud.

De uitkomsten zijn weergegeven in Tabel XXXIII.

Volgens het hierboven gegeven reactieschema kan men op elke vier moleculen koolmonoxyde, welke verdwijnen, één molecuul methaan verwachten, of m.a.w. de theoretische verhouding

$$\frac{-\text{CO}}{+\text{CH}_4} = 4.0$$

De verkregen uitkomsten variëren van 3,6—4,0 en het gemiddelde is: 3,8. De overeenstemming is dus goed te noemen.

Wanneer we de verkregen uitkomsten in millimolen uitdrukken, krijgen we de in Tabel XXXIV weergegeven getallen.

Tabel XXXIII.

Omzetting van varieerende hoeveelheden koolmonoxyde door
Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid koolmon- oxyde in cm ³ bij 760 mm/0° C.	concentratie van het koolmon- oxyde in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			verhouding —CO/ +CH ₄
			CO	CO ₂	CH ₄	
220	15.6	19.9	—	9.3+	4.2	3.7
222	18.3	25.5	—	10.5+	4.8	3.8
223	25.5	32.5	3.2	12.0+	5.6	4.0
226	39.1	49.3	20.1	9.3+	5.0	3.8
229	37.8	49.4	18.6	13.0*	5.3	3.6
228	76.6	100.0	66.8	5.0+	2.4	4.0

+ : zonder het opgeloste koolzuur.

* : met inbegrip van het opgeloste koolzuur.

Tabel XXXIV.

Vergelijking van de gevonden en de theoretisch te verwachten
hoeveelheid methaan bij de vergisting van koolmonoxyde door
Ms. Barkerii.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid koolmon- oxyde in millimolen	verbruikte hoeveelheid koolmon- oxyde in millimolen	verbruikte hoeveelheid koolmon- oxyde in % van de toe- gevoegde hoeveelheid	gevonden hoeveelheid methaan in millimolen	hoeveelheid methaan berekend op verbruikte koolmon- oxyde (¹ / ₄)
220	0.70	0.70	100	0.19	0.18
222	0.82	0.82	100	0.22	0.21
223	1.14	1.00	88	0.25	0.25
226	1.75	0.85	49	0.22	0.21
229	1.70	0.86	51	0.24	0.22
228	3.42	0.47	14	0.11	0.12

De overeenstemming tusschen de hoeveelheden methaan, welke in werkelijkheid werden aangetroffen en diegene, welke volgens de theorie moesten worden geproduceerd, is dus zeer bevredigend.

Inderdaad heeft dus *Ms. Barkerii* in reïncultuur het opmerkelijke vermogen het gas koolmonoxyde te kunnen vergisten onder vorming van twee andere gassen: koolzuur en methaan. Dit feit is onder de biochemische reacties waarschijnlijk eenig in zijn soort en er bestaat wellicht aanleiding om deze omzetting tot het eenvoudigste tot dusver bekende gistingsproces te proclameeren.

Men zou zich nu evenwel kunnen afvragen of de waargenomen feiten zich ook nog met een ander reactieverloop laten vereenigen.

Het ware denkbaar, dat koolmonoxyde met water mierenzuur vormt en dat het proces dus zou neerkomen op een vergisting van mierenzuur:



Tegen deze voorstelling zijn evenwel de volgende bezwaren aan te voeren:

1e. *Ms. Barkerii* is niet in staat om mierenzuur te vergisten (zie Hoofdstuk III, § 3);

2e. het niet aangetaste koolmonoxyde wordt als zoodanig weer teruggevonden.

Teneinde het op pag. 119 genoemde reactieverloop volgens vergelijking (3) nader experimenteel te ondersteunen, werd een nieuwe proef ingezet, waarbij in het eene been van het reactievaatje 2,5 cm³ 50 % kaliloog gebracht werd. De bedoeling hiervan was om het intermediair gevormde koolzuur zooveel mogelijk vast te leggen en hierdoor de hoeveelheid te produceeren methaan zo gering mogelijk te doen zijn. Bovendien zou dan de bij de primaire reactie geproduceerde waterstof als zoodanig moeten zijn aan te toonen.

Na afloop der proefneming bleek alle koolmonoxyde te zijn verbruikt en wel waren uit 15,6 cm³ koolmonoxyde 2,6 cm³ methaan en 4,6 cm³ waterstof gevormd.

Overeenkomstig de verwachting was er dus ditmaal een belangrijke hoeveelheid waterstof ontstaan. Indien in het geheel geen koolzuur voor reductie beschikbaar was geweest, hadden er 15,6 cm³ waterstof aanwezig moeten zijn. Gevonden werden evenwel slechts 4,6 cm³ waterstof; 11,0 cm³ waterstof waren dus blijkbaar toch voor koolzuurreductie gebruikt, tengevolge waarvan 2,7 cm³ methaan zouden moeten zijn ontstaan. In zeer bevredigende overeenstemming hiermede werden er 2,6 cm³ methaan gevonden. Wij moeten dus besluiten, dat de beoogde onttrekking van het geproduceerde koolzuur aan de bacteriecellen door de kaliloog slechts onvolledig heeft plaats gevonden. Toch houden de genoemde cijfers in, dat 13,0 cm³ koolzuur, d.w.z. 83 % van het theoretisch bereikbare, zijn geabsorbeerd.

Hiermede is dus bewezen, dat *Ms. Barkerii* inderdaad de reactie $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ bewerkstelligt, de beide gepostuleerde producten der omzetting zijn toch als zoodanig aangetoond.

In een artikel getiteld: „De wereld der microben: verleden, heden en toekomst”, heeft Kluyster¹⁾ een lijn aangegeven

¹⁾ A. J. Kluyster, *Antonie van Leeuwenhoek* 3, 110, 1936.

waarlangs een geleidelijke evolutie van de verschillende bacterieele levensvormen op aarde zou kunnen hebben plaatsgevonden. Hij wijst er hierbij op, dat de eerste bacteriënsoorten, waarvoor de voorwaarden voor een vermeerdering op een afkoelende aarde zouden kunnen zijn gerealiseerd, wellicht de methaanbacteriën zijn geweest. Hierbij werd dan naar voren gebracht, dat de alleszins aannemelijke aanwezigheid van een mengsel van koolzuur en waterstof hiervoor voldoende zou zijn geweest.

In het licht van de hierboven beschreven proefnemingen kan worden opgemerkt, dat voor de eerste bacterieele ontwikkeling de aanwezigheid van één enkel gas, n.l. koolmonoxyde, reeds toereikend zou zijn geweest. Op grond van de verrichte waarnemingen lijkt het toch aannemelijk, dat de vergisting van dit gas alleen den methaanorganismen voldoende energie levert om zich te kunnen handhaven en vermeerderen.

Uit alle voorafgaande proefnemingen moeten wij dus besluiten, dat bij de omzetting van koolmonoxyde door methaanbacteriën eerst een oxydatie van dit substraat tot koolzuur plaats heeft, waarna dan dit koolzuur met behulp van gasvormige waterstof tot methaan wordt gereduceerd. Kennelijk is voor de methaanbacteriën de reductie van koolzuur het eenige voor de vorming van methaan in aanmerking komende reactieverloop.

Koolmonoxyde is dus geen tusschentrap bij de reductie van koolzuur tot methaan en kan in geen deele het koolzuur als waterstofacceptor vervangen.

Het merkwaardige feit moge nog worden gereleveerd, dat tijdens de primaire aantasting van het koolmonoxyde het methaanorganisme zich als een waterstofproduceerend organisme ontpopt.

Tenslotte moge er de aandacht op worden gevestigd, dat *Ms. Barkerii* het opmerkelijke vermogen heeft, in een atmosfeer van zuivere koolmonoxyde te kunnen leven.

§ 3. Proefnemingen met *Methanobacterium formicum*.

Op geheel dezelfde wijze als dit voor *Ms. Barkerii* is beschreven, werden ook met *Mb. formicum* proeven uitgevoerd, met het doel na te gaan of koolmonoxyde met gasvormige waterstof tot methaan kan worden gereduceerd.

Sedimenten van de uitgegiste reincultuurbuizen werden daartoe na afcentrifugeeren opnieuw in een vloeistof met de samenstelling van het voedingsmedium — echter zonder natriumformiaat — gesuspenderd en de verkregen suspensies voor de verschillende proefnemingen gebruikt.

Allereerst werden wederom proeven ingezet, waarbij boven de suspensies een atmosfeer van koolmonoxyde en waterstof werd

gebracht, waarna de aldus gevulde reactievaatjes gedurende vijf dagen bij 30° C. werden geschud.

De verkregen uitkomsten zijn in de Tabellen XXXV en XXXVI samengevat.

Tabel XXXV.

Omzetting van koolmonoxyde-waterstof mengsels door Mb. formicicum.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.		concentratie CO in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			verhouding —H ₂ /+CH ₄
	H ₂	CO		H ₂	CO	CH ₄	
361	72.6	8.6	10.6	46.9	—	9.0	2.9
367	67.3	9.4	12.3	37.7	—	9.9	3.0
365	68.1	11.5	14.5	43.2	4.2	7.9	3.1
366	67.6	11.2	14.2	47.0	5.1	6.7	3.1

In millimolen uitgedrukt krijgen we de volgende in Tabel XXXVI vermelde cijfers.

Tabel XXXVI.

Vergelijking van de gevonden en de theoretisch te verwachten hoeveelheden methaan bij de omzetting van koolmonoxyde-waterstof mengsels door Mb. formicicum.

Proef No.	hoeveelheid verbruikte waterstof in millimolen	hoeveelheid verdwenen koolmonoxyde in millimolen	hoeveelheid methaan geproduceerd in millimolen	hoeveelheid methaan berekend op verbruikte waterstof (1/3)
361	3.16	0.39	0.40	0.39
367	1.32	0.42	0.44	0.44
365	1.12	0.33	0.36	0.37
366	0.93	0.27	0.30	0.31

Uit Tabel XXXV blijkt, dat zoolang de concentratie van het koolmonoxyde niet boven de 12,3 % stijgt, het koolmonoxyde kwantitatief in methaan wordt omgezet; bij hogere concentratie is de omzetting onvolledig. Uit de gevonden waarden voor de verhouding tusschen de verdwenen hoeveelheid waterstof en de geproduceerde hoeveelheid methaan, welke getallen in kolom 8 van Tabel XXXV zijn weergegeven, volgt, dat de overeenkomst met de theoretisch te verwachten waarde van 3,0 zeer goed is te

noemen. Ook de goede overeenstemming tusschen de getallen in kolom 4 en 5 van Tabel XXXVI, waarin de gevonden en de theoretisch te verwachten hoeveelheid methaan zijn opgenomen, laat dienaangaande geen twijfel bestaan.

Aangezien *Mb. formicum* in staat is om mierenzuur te vergisten tot methaan en koolzuur, verzet niets zich tegen de voorstelling, dat *Mb. formicum* intermediair uit het koolmonoxyde en water mierenzuur doet ontstaan en vervolgens dit zuur vergist tot koolzuur en methaan. De methaanvorming zou dan tot stand kunnen komen door een splitsing van het mierenzuurmolecuul in koolzuur en waterstof, waarna het koolzuur-reductieproces met behulp van de ontstane waterstof, weer het methaan levert. Een beslissing tusschen deze voorstelling en het voor *Ms. Barkerii* aangetoonde reactieverloop laat zich evenwel in dit geval niet treffen.

Het blijkt, dat *Mb. formicum* merkbaar gevoeliger voor koolmonoxyde is dan *Ms. Barkerii*; reeds bij een concentratie van 14,5 % toch heeft nog maar een gedeeltelijke omzetting tot koolzuur en methaan plaats, terwijl voor laatstgenoemde bacterie de omzetting bij een concentratie van 25,5 % nog volledig verliep.

Evenals dit voor *Ms. Barkerii* is geschied, werd ook voor *Mb. formicum* nagegaan, of dit organisme in staat is om koolmonoxyde als zoodanig, dus zonder toevoeging van waterstof, maar ter verlaging van de concentratie bij aanwezigheid van stikstof, te vergisten. In het licht van wat hierboven is opgemerkt over de wijze van aantasting van het koolmonoxyde was een positief resultaat met zekerheid te verwachten.

Het resultaat van een dergelijke proefneming is in Tabel XXXVII weergegeven.

Tabel XXXVII.

Omzetting van koolmonoxyde door *Mb. formicum*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheid koolmon- oxyde in cm ³ bij 760 mm/0° C.	concentratie van het koolmon- oxyde in %	bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in cm ³ bij 760 mm/0° C.			hoeveelheid methaan berekend op verbruikt CO in cm ³ bij 760 mm/0° C.
			CO	CO ₂	CH ₄	
368	9.0	11.6	—	5.0+	2.0	2.3

+ : zonder het opgeloste koolzuur.

Inderdaad blijkt ook *Mb. formicum* dus in staat koolmonoxyde in afwezigheid van waterstof volledig in koolzuur en methaan om te zetten.

Door de grootere gevoeligheid van deze bacterie voor koolmonoxyde, waardoor doorgaans geen grootere koolmonoxyde-concentraties konden worden toegepast dan ongeveer 10 %, waren experimenten, zooals die voor *Ms. Barkerii* werden uitgevoerd en waarbij met sterke kaliloog het intermediair bij de vergisting ontstane koolzuur aan de reactie werd onttrokken, niet wel uitvoerbaar. Hiertoe was de nauwkeurigheid van de methodiek in verband met de te verwachten kleine veranderingen in de hoeveelheden van de componenten van het gasmengsel niet voldoende.

§ 4. Proefnemingen met *Methanobacterium Omelianskii*.

Wat *Mb. Omelianskii* betreft gelukte het nooit, om met behulp van deze bacterie uit koolmonoxyde en waterstof methaan te verkrijgen.

Daar de mogelijkheid niet was buitengesloten, dat *Mb. Omelianskii* nog gevoeliger voor koolmonoxyde zou zijn dan *Mb. formicicum*, werden proeven ingezet met gasatmosferen, welke bestonden uit koolmonoxyde, koolzuur en waterstof. Als eenig resultaat werd in zulke gevallen gevonden, dat het koolzuur volledig tot methaan werd gereduceerd, terwijl het koolmonoxyde steeds volledig werd teruggevonden.

De uitkomsten van een drietal desbetreffende proefnemingen zijn weergegeven in Tabel XXXVIII.

Tabel XXXVIII.

Omzetting van gasmengsels bestaande uit koolmonoxyde, koolzuur en waterstof door *Mb. Omelianskii*.

Proef No.	toegevoegde hoeveelheden in millimolen			bij de eindanalyse gevonden hoeveelheden in millimolen			hoeveelheid methaan berekend op verbruikte waterstof (1/4)
	CO	CO ₂	H ₂	CO	H ₂	CH ₄	
151	0.31	0.31	2.66	0.31	1.40	0.31	0.32
149	0.34	0.34	2.62	0.34	1.32	0.31	0.32
520	0.36	0.36	2.82	0.36	1.36	0.36	0.36

Voor al de goede overeenstemming tusschen de getallen van kolom 7 en 8 laat geen twijfel, dat het geproduceerde methaan volledig afkomstig is van de reductie van koolzuur.

Voor *Mb. Omelianskii* kan dus met zekerheid worden besloten, dat koolmonoxyde geen tusschenproduct is bij de koolzuurreductie.

§ 5. Samenvatting.

De in dit hoofdstuk beschreven proefnemingen beoogden het gedrag der drie beschikbare reincultures van methaanbacteriën t.o.v. koolmonoxyde na te gaan. In de eerste plaats werd dit onderzocht door de bacteriën in contact te brengen met een mengsel van koolmonoxyde en een overmaat van waterstof.

Het bleek, dat *Mb. Omelianskii* zich tegenover koolmonoxyde geheel indifferent gedroeg. In het genoemde mengsel werd dit gas niet aangetast, doch hieraan toegevoegd koolzuur werd op normale wijze gereduceerd. Daarentegen bleken *Ms. Barkerii* en *Mb. formicicum* beide in staat om het mengsel van koolmonoxyde en waterstof in methaan om te zetten.

Een voortzetting der proefnemingen leerde evenwel, dat deze vorming van methaan geenszins op een rechtstreeksche reductie van het koolmonoxyde berustte. Eenerzijds bleek dit door een ontijdig afbreken der proefnemingen, in welk geval steeds ook koolzuur in het gasmengsel werd aangetroffen. Mede gezien de in het vorige hoofdstuk beschreven ervaringen, was dit een sterke aanwijzing, dat primair een omzetting van het koolmonoxyde met behulp van water in koolzuur en waterstof optreedt, zooals deze door Fischer et al. voor de door hen gebruikte cultures was aangenomen. De uiteindelijk geconstateerde methaanvorming was in onze reïncultuur-proefneming blijkbaar terug te voeren tot een rechtstreeksche reductie van het in eerstgenoemde reactie gevormde koolzuur.

Duidelijker trad de juistheid van deze voorstelling nog aan het licht bij de hierna verrichte proefnemingen, waarbij de genoemde twee bacteriënsoorten bij afwezigheid van waterstof in contact met koolmonoxyde werden gebracht. Onder deze voorwaarde bleek het koolmonoxyde eveneens in methaan naast koolzuur te worden omgezet, hetgeen toch alleen verklaarbaar is, indien men aanneemt, dat koolmonoxyde primair met water reageert. Dat deze reactie inderdaad tot vorming van koolzuur en waterstof leidt, werd nu bewezen in een proefneming, waarbij de koolmonoxyde-vergisting in tegenwoordigheid van kaliloog als koolzuurbindend middel verliep. Onder deze omstandigheid kon overeenkomstig de verwachting gasvormige waterstof in het gasmengsel worden aangetoond.

Op grond van al deze met reïncultures van methaanbacteriën verkregen uitkomsten, bestaat er alle aanleiding om in aansluiting op Wieringa's belangrijke waarnemingen te concluderen, dat de zoowel door Fischer et al., als door Wieringa zelf, als ook door mij in ruwcultures vastgestelde vorming van azijnzuur geheel op rekening is te stellen van de in ruwcultures doorgaans naast de methaanbacteriën aanwezige *Clostridium aceticum*. Maar

evenzeer geldt, dat in afwijking van Wieringa's voorloopige hypothese, de aanwezigheid van deze bacteriesoort voor de verwerking van koolmonoxyde in koolzuur en methaan geenszins essentieel is; deze omzetting kan toch geheel door reincultures van methaانبacteriën worden bewerkt.

De verrichte proefnemingen laten voorts geen twijfel, dat er geen sprake van kan zijn, dat koolmonoxyde een intermediaire waterstofacceptor is bij de normale methaangisting. Tegen deze opvatting verzet zich reeds aanstonds het feit, dat *Mb. Omelianskii* het koolmonoxyde zelfs bij aanwezigheid van gasvormige waterstof niet aangrijpt. Mede rekening houdende met de in Hoofdstuk V beschreven uitkomsten, moeten wij wel besluiten, dat tot dusver geen enkele éénkoolstof-verbinding in staat is gebleken bij de methaangisting het koolzuur in zijn waterstofacceptorfunctie te vervangen.

Terwijl voor *Mb. formicicum* het vermogen om koolmonoxyde tot methaan en koolzuur te vergisten aan een relatief lage druk van dit gas bleek te zijn gebonden, bleek *Ms. Barkerii* de opmerkelijke eigenschap te bezitten deze vergisting in een atmosfeer van zuivere koolmonoxyde nog in belangrijke mate te doen verlopen.

SAMENVATTING.

In Hoofdstuk I is de ontwikkeling van onze kennis der methaangisting, in het bijzonder in de periode na de publicatie van Söhnngen's fundamenteel belangrijk onderzoek in 1906, uitvoerig geschetst.

Hierbij zijn achtereenvolgens de theorieën in beschouwing genomen, welke trachten een verklaring te geven van de wijze van ontstaan van het methaan uit aan de vergisting onderworpen organische substraten. De aanvankelijk ontworpen voorstellingen slaagden er evenwel niet in een passende verklaring te geven voor het opmerkelijke feit, dat bij de bestaande gistingsprocessen ten allen tijde methaan als eenige koolwaterstof wordt gevormd.

De door van Niel opgestelde, door Barker in 1936 experimenteel krachtig ondersteunde theorie, volgens welke het methaan steeds ontstaat door hydrogenatie van koolzuur, waarbij dan de hiervoor benodigde waterstof door dehydrogenatie van het gistingssubstraat beschikbaar komt, leverde evenwel voor het bovengenoemde gezichtspunt een ongedwongen verklaring. Deze theorie der koolzuurreductie heeft tevens de groote bekoring, dat de methaangisting hierdoor geheel op één lijn wordt gesteld met de uit de microbiologie zoo welbekende processen der nitraat- en der sulfaatreductie.

Het door mij reeds in 1938 aangevangen onderzoek had nu drieërlei doelstelling. In de eerste plaats leek het wenschelijk na te gaan, of er in de natuur naast de vier door Barker voor het eerst voldoende gekarakteriseerde soorten van methaanbacteriën nog andere soorten met afwijkende eigenschappen waren aan te treffen. In de tweede plaats leek het van belang te trachten aanvullende gegevens ter staving van de theorie der koolzuurreductie bijeen te brengen. Tenslotte bestond er uiteraard behoefte om eenig nader inzicht te krijgen in het mechanisme der methaanvorming uit koolzuur, waarbij het voor de hand lag aandacht te schenken aan de mogelijkheid, dat andere verbindingen met één koolstofatoom in staat zouden zijn het koolzuur als waterstofacceptor bij de methaangisting te vervangen. Om deze reden werd aan dit punt reeds bij de samenstelling van het literatuuroverzicht speciale aandacht geschonken, waarbij ook overwegingen van anderen aard er toe leidden in het bijzonder ook het gedrag der methaanbacteriën ten opzichte van koolmonoxyde in beschouwing te nemen.

De in Hoofdstuk II neergelegde resultaten hebben betrekking op proefnemingen, welke beoogden met ver gezuiverde ruwcultures van methaanbacteriën, op de wijze zooals dit ook door Barker

In zijn eerste verhandeling is gedaan, gegevens te verzamelen, welke de koolzuurreductietheorie zouden kunnen ondersteunen. Hierbij werd gebruik gemaakt van andere dan door Barker toegepaste gistingssubstraten, te weten van propyl- en isopropylalcohol. Het bleek nu bij deze proefnemingen, dat inderdaad ondanks de vorming van aanmerkelijke hoeveelheden methaan deze substraten aan het einde der proefnemingen in gedehydrogeneerden toestand, d.w.z. als propionzuur en als aceton, quantitatief werden terug gevonden. De hoeveelheid gevormd methaan bleek voorts equivalent te zijn met de hoeveelheid uit het gistingsmedium verdwenen koolzuur, hetgeen alles bijeen genomen een fraaie nadere bevestiging der koolzuurreductietheorie oplevert.

In het belang van de toetsing der bovengenoemde mogelijkheid om het koolzuur als waterstofacceptor te vervangen door andere verbindingen met één koolstofatoom leek het gewenscht de beschikking te krijgen over bacteriën, welke een methaangisting van dergelijke verbindingen bewerken. In Hoofdstuk III is de ophooping van methaانبacteriën, welke respectievelijk methylalcohol en natriumformiaat vergisten, beschreven, waarbij o.m. ook het bestaan van een thermophile, sporevormende methylalcohol vergistende soort werd vastgesteld. Uitvoerig is vervolgens ingegaan op de methoden, welke werden toegepast ter verkrijging van reïncultures van de beide genoemde mesophiele soorten. Hierna werd een onderzoek ingesteld naar het gedrag der beide reïncultures ten opzichte van een aantal uiteenlopende organische verbindingen, waaruit duidelijk bleek, dat de geïsoleerde organismen niet met de door Barker beschreven soorten waren te identificeren. Het bleek toch, dat de methylalcoholvergistende soort, waaraan de naam van *Methanosarcina Barkerii* werd gegeven, behalve methylalcohol alleen acetaat vergistte, terwijl het natriumformiaat vergistende organisme, dat den naam *Methanobacterium formicicum* verkreeg, geen enkel ander der onderzochte substraten aangreep.

De vergisting der vergistbare substraten door de genoemde reïncultures werd ook in quantitatief opzicht nagegaan.

In Hoofdstuk IV is voor de beide zelf verkregen reïncultures, alsmede ook voor een van Barker ontvangen subcultuur van de door dezen onderzoeker in reïncultuur gebrachte *Methanobacterium Omelianskii* nagegaan, in hoeverre deze methaانبacteriën in staat zijn om koolzuur met behulp van gasvormige waterstof tot methaan te reduceeren. Hoewel Sö h n g e n in 1906 dit vermogen reeds voor ruwcultures van methaانبacteriën had vastgesteld, was het van groot belang na te gaan hoe reïncultures van methaانبacteriën zich in dit opzicht zouden gedragen. Wieringa had toch in 1936 aangetoond, dat in dergelijke cultures een spore-

vormende niet-methaanproducerende bacterie, *Clostridium acetium* voorkomt, welke het genoemde gasmengsel primair tot azijnzuur omzet. Deze verbinding zou dan eerst in tweede instantie door de methaanbacteriën tot methaan en koolzuur worden vergist. De door mij verrichte proefnemingen leerden intusschen, dat alle drie rein-cultures van methaanbacteriën in staat waren het mengsel van koolzuur en waterstof rechtstreeks in methaan om te zetten, zoodat in tegenstelling tot Wieringa's hypothese voor deze omzetting de medewerking van *Cl. aceticum* niet wordt vereischt.

Voor *Ms. Barkerii* werd bovendien aangetoond, dat onder daartoe gunstige voorwaarden de verwerking van het laatstgenoemde gasmengsel met een duidelijke vorming van nieuw celmateriaal gepaard ging.

Vervolgens werd overgegaan tot een toetsing van de hierboven reeds aangestipte mogelijkheid om bij de methaangisting het koolzuur als waterstofacceptor door andere verbindingen met één koolstofatoom te vervangen. Mede in verband met de door Stephenson en Stickland in 1933 beschreven resultaten bestond er aanleiding in het bijzonder aandacht te schenken aan mierenzuur, formaldehyde (hexamethyleentetramine) en methylalcohol. Wat het mierenzuur betreft ook omdat Barker zwakke aanwijzingen had verkregen, dat dit zuur bij de methaangisting van aethylalcohol door *Mb. Omelianskii* na een zekere aanpassingsperiode inderdaad zou worden gereduceerd.

Ik besloot de bewuste vervangbaarheid van het koolzuur na te gaan in het in chemisch opzicht goed doorzichtige systeem: koolzuur — gasvormige waterstof. De in Hoofdstuk V beschreven proefnemingen lieten intusschen niet den minsten twijfel, dat in dit systeem de onderzochte éénkoolstofverbindingen niet in staat waren het koolzuur als waterstofacceptor te vervangen. Bij de ingestelde contrôle-proefnemingen, waarbij naast de onderzochte éénkoolstofverbinding ook nog een zekere hoeveelheid koolzuur was toegelaten, stakte de vergisting onmiddellijk nadat dit koolzuur was verbruikt. Van eenige aanpassing aan de getoetste verbinding, zooals Barker die — naar hierboven werd vermeld — heeft beschreven, was in de door mij bestudeerde gevallen geen sprake.

Duidelijk bleek voorts, dat de door mij geïsoleerde formiaat-vergistende cultuur zich geheel afwijkend gedroeg van hetgeen Stephenson en Stickland voor hun overeenkomstige cultuur rapporteerden.

Het onderzoek naar het gedrag der methaanbacteriën ten opzichte van koolmonoxyde werd met het oog op de uitgebreide, mede voor industriele toepassing van belang zijnde, eerdere onderzoekingen tot een afzonderlijk onderwerp van studie gemaakt.

In Hoofdstuk VI zijn de uitkomsten verkregen bij een onderzoek naar de omzetting van koolmonoxyde onder den invloed van anaërobe ruwcultures weergegeven. Bij de eerste proefnemingen, waarbij werd uitgegaan van een modder-suspensie als entmateriaal, werd een vlotte omzetting van het koolmonoxyde in azijnzuur en koolzuur vastgesteld. Bij overenting in een passend mineraal medium werd evenwel naast deze producten ook gasvormige waterstof aangetroffen. Het geheel der verkregen uitkomsten pleitte voor de door Fischer et al. verkondigde zienswijze, dat de primaire omzetting, welke het koolmonoxyde ondergaat, bestaat in een reactie met water, waarbij koolzuur en waterstof ontstaan. Secundair zou dan overeenkomstig de door Fischer en door Wieringa aangegeven reactie uit deze primaire producten azijnzuur worden gevormd.

In een nieuwe reeks proefnemingen werd nu ook methaan onder de omzettingsproducten van het koolmonoxyde vastgesteld. Dit zou uiteraard zijn ontstaan kunnen danken aan een thans mede optredende methaangisting van primair gevormd azijnzuur, doch gezien de in Hoofdstuk IV beschreven resultaten is het ook alleszins denkbaar, dat hier een rechtstreeksche omzetting van primair gevormd koolzuur en waterstof tot methaan zou hebben plaats gevonden.

Daar bij deze ruwcultures — in aanmerking genomen de door Wieringa beschreven resultaten verkregen bij de verwerking van koolzuur-waterstof mengsels — met het voorkomen van meer dan één organisme moest worden rekening gehouden, werd overgegaan tot een onderzoek van het gedrag der beschikbare reïncultures van methaanbacteriën ten opzichte van koolmonoxyde, over welk onderzoek in Hoofdstuk VII is gerapporteerd.

In de eerste plaats werd dit gedrag ten opzichte van een mengsel van koolmonoxyde en waterstof nagegaan. Hierbij bleek, dat zoowel *Ms. Barkerii* als *Mb. formicicum* in staat waren uit dit gasmengsel methaan te produceeren. *Mb. Omelianskii* gedroeg zich volkomen indifferent ten opzichte van het koolmonoxyde, d.w.z. gelijktijdig toegevoegd koolzuur werd wel gereduceerd, terwijl het koolmonoxyde onaangetast bleef.

De omzetting van het koolmonoxyde door de twee eerder genoemde reïncultures bleek nu, in tegenstelling tot hetgeen de overeenkomstige proefnemingen van Stephenson en Stickland zouden doen vermoeden, geenszins op een directe reductie van het koolmonoxyde te berusten. Uit proefnemingen, waarbij deze bacteriën bij afwezigheid van waterstof in contact met koolmonoxyde werden gebracht, kwam in de eerste plaats vast te

staan, dat ook onder deze voorwaarden methaan en koolzuur worden gevormd. Evenwel bleek uit voortgezette proefnemingen, dat primair een omzetting van het koolmonoxyde met behulp van water in koolzuur en waterstof optreedt, zoodat het gevormde methaan klaarblijkelijk andermaal zijn ontstaan aan een reductie van koolzuur dankt. Deze zienswijze werd krachtig gesteund door proefnemingen, waarbij de koolmonoxydevergisting verliep bij aanwezigheid van kaliloog, tengevolge waarvan koolzuuronttrekking en dientengevolge productie van vrije waterstof plaats had.

Uit al deze proefnemingen volgt dus, dat bij de verwerking van koolmonoxyde door reinkultures de primaire reactie van het koolmonoxyde inderdaad de door Fischer et al. bij hun ruw-cultures vastgestelde omzetting in koolzuur en waterstof is. De door deze onderzoekers aangenomen omzetting van deze producten in azijnzuur is echter geen onderdeel van de stofwisseling der methaanbacteriën. Zooals Wieringa heeft bewezen, verloopt deze omzetting onder invloed van een afzonderlijke in de ruw-cultures aanwezige bacteriesoort: *Cl. aceticum*. In tegenstelling tot de door laatstgenoemden onderzoeker opgeworpen hypothese is evenwel de synergistische werking van dit organisme niet onmisbaar om tot methaanvorming te komen: immers ook de methaanbacteriën zelve zijn in staat koolzuur en waterstof tot methaan te verwerken.

De verkregen uitkomsten, en in het bijzonder het feit, dat *Mb. Omelianskii* koolmonoxyde in het geheel niet verwerkt, doen het uitgesloten zijn, dat dit gas een intermediaire waterstofacceptor is bij de normale methaangisting. Mede rekening houdende met de in Hoofdstuk V beschreven uitkomsten, moeten wij wel besluiten, dat tot dusver geen enkele éénkoolstofverbinding in staat is gebleken het koolzuur in zijn waterstofacceptorfunctie te vervangen.

Voor de zoo opmerkelijke vergisting van koolmonoxyde tot koolzuur en methaan door *Mb. formicicum* en *Ms. Barkerii* werd vastgesteld, dat deze voor eerstgenoemde bacterie aan een relatief lage druk van koolmonoxyde was gebonden. In een mengsel van stikstof en koolmonoxyde werd dit laatste gas slechts volledig omgezet, indien het gehalte aan dit gas de 12 % niet overschreed.

Daarentegen bleek *Ms. Barkerii* de wel zeer bijzondere eigenschap te bezitten nog in een atmosfeer van zuiver koolmonoxyde de reactie:



te doen verloopen. Deze omzetting is wel één der eenvoudigste, zoo niet het eenvoudigste, der tot dusver bekende gistingsprocessen.

SUMMARY.

In Chapter I a survey is presented of the development of our knowledge of methane fermentation, especially for the period after the appearance of Söhrngen's fundamentally important publication in 1906.

In this survey special attention has been paid to the various conceptions regarding the mechanism by which methane is formed from the organic compounds submitted to fermentation. It has been stressed that the earlier theories were unable to offer any explanation for the remarkable fact that under all conditions methane is the only hydrocarbon formed in this fermentation.

In 1936, however, Barker forwarded strong experimental evidence in favour of the theory formulated by van Niel according to which methane always originates from a hydrogenation of carbon dioxide, the organic substrate acting solely as a hydrogen donor. It is clear that this theory explains the unique place of methane as mentioned above. Moreover, the theory has the great charm that hereby the close analogy between the methane fermentation and the well-known processes of microbiological nitrate and sulfate reduction becomes evident.

On starting my studies in 1938 I decided to investigate primarily three different questions. In the first place it was deemed desirable to attempt to isolate new types of methane bacteria differing in their properties from the four species which had been adequately characterized for the first time by Barker. In the second place it seemed at that time important to collect further experimental data suitable to give additional support to the theory of carbon dioxide reduction. Finally it was tempting to try to obtain some better insight into the mechanism of carbon dioxide reduction in methane fermentation. In this connection it appeared especially worth-while to investigate the possibility of replacing carbon dioxide by some other compound with one carbon atom.

For this reason special attention has been given to the earlier investigations dealing with the behaviour of compounds of this type in methane fermentation. Other arguments too led to a special consideration of carbon monoxide in this respect.

The results reported in Chapter II relate to experiments which aimed at collecting data supporting the carbon dioxide reduction theory, and which were carried out in the same way as was done by Barker in his first publication, i.e., using highly purified cultures of methane bacteria. In these experiments I decided to apply fermentation substrates differing from those used by Barker. Propyl and isopropyl alcohol were chosen as such. The

result of these experiments was that, notwithstanding the production of ample quantities of methane, the substrates in question could be recovered quantitatively in the dehydrogenated state, *viz.*, as propionic acid and acetone respectively. Moreover, the quantity of methane formed appeared to be equivalent to the quantity of carbon dioxide which had disappeared from the medium. Taken together these results yield a very satisfactory confirmation of the carbon dioxide reduction theory.

As it was desirable to investigate the suitability of one carbon atom compounds to act as a hydrogen acceptor in methane fermentation, enrichment cultures with such compounds as a substrate were started. In Chapter III observations with cultures fermenting methylalcohol or sodium formate have been described. These experiments led amongst other to the demonstration of the existence of a thermophilic, methyl alcohol fermenting bacterium which in contrast to the species described until now proved to produce highly thermoresistent spores. The methods which have been applied to obtain pure cultures of the mesophilic organisms have been described in detail. Hereafter the behaviour of these cultures towards various organic compounds has been carefully investigated. The results obtained left no doubt that these cultures could not be identified with the species already described by Barker. It was found that the methyl alcohol fermenting species, to which the name *Methanosarcina Barkerii* was given, could — apart from the methyl alcohol — only ferment acetate, whilst the formate fermenting organism, called *Methanobacterium formicicum*, did not attack any other of the compounds tested besides the formate.

Also a quantitative study of the fermentation of the acceptable substrates by the said pure cultures has been carried out.

In Chapter IV experiments are reported in which it was tested in how far the two pure cultures, as well as a subculture of *Methanobacterium Omelianskii* received from Barker, were able to reduce carbon dioxide with the aid of gaseous hydrogen with formation of methane. Although Sö h n g e n working with highly purified, but not yet pure cultures, had in 1906 already claimed to have proved this ability, it was of great importance to examine the behaviour of pure cultures of methane bacteria in this respect. For W i e r i n g a in 1936 had shown that in enrichment cultures with a hydrogen and carbon dioxide mixture as sole substrate always a spore-forming bacterium, unable to produce methane, accumulates. This bacterium, *Clostridium aceticum*, brings about an initial conversion of the gas mixture into acetic acid. This compound is then only in a secondary reaction converted into methane and carbon dioxide by the simultaneously present methane bacteria.

Our experiments showed, however, conclusively that all three pure cultures of methane bacteria tested were able to convert a mixture of carbon dioxide and hydrogen directly into methane. Therefore, in contrast to Wieringa's hypothesis, no synergistic action of *Cl. aceticum* is required for the production of methane out of carbon dioxide.

For *Ms. Barkerii* it was proved, moreover, that under suitable conditions part of the gas mixture was used in the building up of new cell material.

The next step was a testing of the possibility, referred to above, of the substitution of carbon dioxide by other compounds with one carbon atom. Also in connection with results obtained by Stephenson and Stickland in 1933 it was indicated to pay particular attention to the suitability of formic acid, formaldehyde (offered in the form of hexamethylene tetramine) and methyl alcohol. As far as formic acid is concerned, also because Barker had obtained some indications that in the methane fermentation of aethyl alcohol by *Mb. Omelianskii* formic acid — after a certain period of adaptation — can indeed be reduced to methane.

I decided to test the possibility of replacing carbon dioxide by one of these C_1 -compounds in the from the chemical standpoint so simple system: carbon dioxide — gaseous hydrogen. The experiments reported in Chapter V showed conclusively that in this system all C_1 -compounds tested lacked the ability to replace carbon dioxide as a hydrogen acceptor. In the control experiments in which besides the C_1 -compound tested also a certain amount of carbon dioxide was admitted the fermentation stopped immediately after the carbon dioxide had been consumed. An adaptation to the compounds in question as described by Barker — cf. above — was not at all observed.

In addition it was quite clear that the formate fermenting culture isolated by me behaved quite differently from the corresponding culture described by Stephenson and Stickland.

With a view to the rather extensive literature dealing with the anaerobic conversion of carbon monoxide and its possible industrial applications the behaviour of methane bacteria towards this gas was made the subject of a separate investigation.

In Chapter VI a description is given of an investigation regarding the conversion of carbon monoxide under the influence of anaerobic crude cultures. In the initial experiments in which a mud suspension was used as an inoculating material, a rapid conversion of carbon monoxide into acetic acid and carbon dioxide was established. On transferring part of the active material into

a suitable mineral medium besides these products also gaseous hydrogen was found to be formed. The combined results are in agreement with the view forwarded by Fischer et al. that the primary conversion of carbon monoxide consists in a reaction with water leading to carbon dioxide and hydrogen. A secondary reaction as earlier described by Fischer and by Wieringa might then well have been responsible for the conversion of these primary products into acetic acid.

In a new series of experiments methane was also encountered amongst the products of the conversion. Its origin might be due to a fermentation of primarily formed acetic acid, although the possibility of a direct conversion of initially formed carbon dioxide and hydrogen into methane could neither be discarded.

Since in these crude cultures — taking into consideration the observations made by Wieringa in corresponding experiments on the conversion of mixtures of carbon dioxide and hydrogen — the occurrence of more than one organism might be considered to be quite probable, it was decided to investigate the behaviour of the available pure cultures of methane bacteria towards carbon monoxide. The results of this study are reported in Chapter VII.

In the first place the behaviour of these cultures towards a mixture of carbon dioxide and hydrogen was studied. It appeared that both *Ms. Barkerii* and *Mb. formicicum* were, indeed, able to convert this gas mixture into methane. *Mb. Omelianskii* behaved quite indifferently towards the presence of carbon monoxide: simultaneously present carbon dioxide was reduced, whilst the carbon monoxide remained untouched.

A further investigation left no doubt, in contrast to what might be expected on ground of earlier experiments of Stephenson and Stickland, that the conversion of carbon monoxide by the two pure cultures mentioned above was not based on a direct reduction of this gas. When the bacteria in question were brought into contact with carbon monoxide in the absence of hydrogen also a conversion, leading to methane and carbon dioxide, took place. From a further series of experiments it appeared that in the first phase the carbon monoxide reacted with water under formation of hydrogen and carbon dioxide, suggesting that here too the finally produced methane resulted from a reduction of carbon dioxide. This hypothesis was strongly supported by experiments on carbon monoxide fermentation in the presence of alkali. In this case the removal of primarily formed carbon dioxide from the gas phase led to a considerable production of gaseous hydrogen.

From all these experiments it follows that in this conversion

of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria the primary reaction in with the carbon monoxide takes part is, indeed, the conversion into carbon dioxide and hydrogen as established by Fischer et al. for their crude cultures. The conversion of these primary products into acetic acid, which these authors consider to be an essential process in methane formation, does not however form part of the metabolism of the methane bacteria. As has clearly been shown by Wieringa this formation of acetic acid proceeds under the influence of a synergistic spore-forming bacterium, *Cl. aceticum* — and in contrast to the hypothesis forwarded by Wieringa — the action of this second organism is not indispensable for the formation of methane. The methane bacteria themselves are able to convert carbon dioxide and hydrogen into methane.

The results obtained, especially the inability of *Mb. Ome-lianskii* to attack carbon monoxide, exclude the possibility that this gas acts as an intermediary hydrogen acceptor in normal methane fermentation. Taking into account the results obtained in Chapter V we must, therefore, conclude that until now no C_1 -compound has been found which can replace carbon dioxide in its function of hydrogen acceptor.

As for the so remarkable conversion of carbon monoxide into carbon dioxide and methane by *Mb. formicum* and *Ms. Barkerii* it was found that for the first mentioned species the conversion was bound to a relatively low pressure of carbon monoxide. In a mixture with nitrogen a complete conversion of the carbon monoxide was only attained, if the concentration of this gas did not surpass 12 %.

Ms. Barkerii proved to have the exceptionally interesting ability to bring about a quite considerable conversion according to the equation:



even in an atmosphere of pure carbon monoxide.

This conversion seems to be one of the simplest, if not the most simple, of all fermentation processes known until now.

STELLINGEN.

1.

De biologische vorming van methaan berust ten allen tijde op een hydrogenatie van koolzuur.

2.

Aan de verwerking van koolmonoxyde door methaanbacteriën ligt steeds een primaire omzetting van dit gas in koolzuur en waterstof ten grondslag.

3.

Een nader onderzoek naar het ontstaan van koolmonoxyde langs biologischen weg is dringend vereischt.

S. C. Langdon and W. R. Gailey, Bot. Gaz. 70, 230, 1920.

F. Rathery, P. Gley, J. Franc et M. Goursat, Journ. de Physiol. et de Pathol. Gén. 30, 24, 1931.

R. W. Dougherty, Journ. Amer. Vet. Med. Assoc. 99, 110, 1941.

4.

Het natuurlijke zetmeel bestaat uit tenminste twee, in configuratief opzicht verschillende, componenten.

W. N. Haworth, R. L. Heath and S. Peat, Journ. Chem. Soc. 1942, p. 55.

E. J. Bourne and S. Peat, Journ. Chem. Soc. 1945, p. 877

5.

De beteekenis van de mitochondria is vooral te zoeken in hun rol van enzyme-transporteur.

E. S. Horning, Ergebn. d. Enzymforsch. 2, 336, 1933.

6.

De eigenschappen van het dimeer van nitrosobenzeen kunnen, overeenkomstig een door C. P. van Dijk uitgesproken inzicht, het best worden verklaard door het aannemen van een heteropolaire binding tusschen de beide moleculen.

7.

Bij de reductie van aromatisch gebonden nitrogroepen wordt de reactiviteit van de nitro-groep teruggedrongen door de aanwezigheid van een meta-standige aminogroep.

8.

Het kan als zeker worden beschouwd, dat de oxydatie van manganozouten met kaliumperjodaat in een fosforzuurhoudend milieu leidt tot een driewaardig mangaancomplex.

C. J. van Nieuwenburg, *Qualitatieve chemische analyse*. den Helder, 1945, p. 78.

9.

Tot dusver ontbreekt iedere verklaring voor het feit, dat in een mengsel van fosforzuur en zoutzuur opgelost tin eerst vervluchtigt, nadat aan dit mengsel ook nog broomwaterstof is toegevoegd.

H. Biltz und W. Biltz, *Ausführung quantitativer Analysen*. Leipzig, 1937. p. 333.

10.

Het is voorloopig nog aan ernstige twijfel onderhevig of met toevoeging van fluoriden aan drinkwater de hygiënische belangen der consumenten worden gediend.

A. E. Berry, *Water and Sewage* 83, 21, 40, 1945.

11.

De biochemische theorie van de anaërobe ijzercorrosie, zooals deze door von Wolzogen Kühr is opgesteld, heeft door de onderzoeken van Starkey en Wight nadere bevestiging verkregen.

C. A. H. von Wolzogen Kühr, *Water* 18, 147, 1934.

R. L. Starkey and K. M. Wight, *Anaerobic Corrosion of Iron in Soil*. New Brunswick (N.J.) 1945.

12.

Bij de drinkwaterzuivering verdient het aanbeveling de bij de langzame zandfiltratie gebruikelijke filters op zoodanige wijze te overdekken, dat het licht wordt buitengesloten.

13.

De aan de biologische filtratie van drinkwater ten grondslag liggende factoren zijn nog steeds zeer onvoldoende bekend.

Ch. G. T. P. Schnellen, Water 31, 30, 1947.

14.

Door toevoeging van pyrethrine aan het water kan een massaal optreden van *Asellus aquaticus* in het distributienet van een waterleiding op eenvoudige en afdoende wijze worden bestreden.

G. van Heusden (Zie: Water 30, 114, 1946).

15.

De algemeen verspreide zienswijze, dat bij de chloreering van voor consumptie bestemd water, de pathogene kiemen in alle gevallen minder resistent zijn dan *Bacterium coli*, is onjuist.

C. T. Butterfield, E. Wattie, S. Magregian
and C. W. Chambers, Publ. Health Reports 58, 1837, 1943.
E. Wattie and C. T. Butterfield, Publ. Health Reports
59, 1661, 1944.

16.

Het is een gebiedende eisch der praeventieve geneeskunde, dat ten spoedigste methoden worden uitgewerkt ter desinfectie van typhusbacillendragers.

17.

Het streven tot verwijderen van het vergiftige koolmonoxyde uit lichtgas verdient aanmoediging; een nader onderzoek naar de bruikbaarheid van de biologische methode tot bereiking van dit doel ware zeer gewenscht.