

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming
van het NIOZ.

Chemolithotrofe zwavelbacteriën in het sediment van de Waddenzee

door

Tico Cohen

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctoraal onderwerp
in het tijdvak van januari 1974 tot februari 1975

aan

het NIOZ te Texel

voor

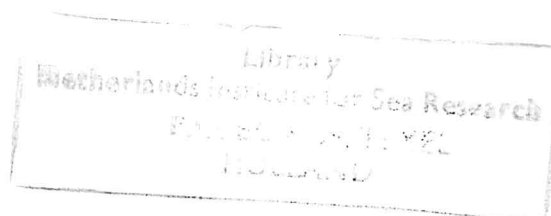
Prof. Dr. D. Tempest

Universiteit van Amsterdam

onder supervisie van

Mevr. A. Timmer--ten Hoor en

Dr. J.H. Vosjan



NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1975 - 16

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen slechts
toegestaan met uitdrukkelijke toestemming van het NIOZ.

Voorwoord

In dit verslag zijn de resultaten opgenomen van een onderzoek, dat ik, in het kader van mijn hoofdvak microbiologie van mijn studie scheikunde aan de Universiteit van Amsterdam, in 1974 uitvoerde aan het Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee te Texel.

Dit onderzoek, dat in samenwerking met mijn studiegenoot A. van Kranendonk werd uitgevoerd, stond onder supervisie van Mevr. Drs. A. Timmer-ten Hoor en Dr. J.H. Vosjan, die ik gaarne wil bedanken voor hun goede begeleiding. In dit verband wil ik graag ook nog de heer W. van Arkel dankzeggen voor de adviezen die hij heeft gegeven voor de statistische verwerking van enkele resultaten.

In dit verslag zullen hoofdzakelijk de oxydatieve aspecten van ons onderzoek aan de zwavelcyclus in het wadsediment aan de orde komen. A. van Kranendonk zal in zijn verslag nader ingaan op de bacteriële sulfaatreductie, daar, waar het gemeenschappelijke gedeelten van ons onderzoek betreft zal ook naar zijn verslag verwezen worden.

Chemolithotrofe zwavel bacteriën in het sediment van de Waddenzee

door

Tico Cohen

Intern verslag

INHOUD:

Voorwoord

I. Summary en samenvatting	2-3
II. Inleiding	4
1.1. De veldsituatie	4
1.2. De experimentele benadering	7
1.3. De vraagstelling	9
III. De bepaling van de verdeling van chemolithotrofe zwavelbacteriën in het wadsediment	10
2.1. Inleiding	10
2.2. Materiaal en methoden	13
2.2.1. Monsternamen	13
2.2.2. Tellingen m.b.v. agarplaten	13
2.2.3. Tellingen m.b.v. verdunningsreeksen in mineraal medium	14
2.2.4. De bepaling van aktiviteit d.m.v. de oxidatie van thiosulfaat	14
2.3. Resultaten en konklusies	14A
IV. De bepaling van sulfide in het wadsediment	22
3.1. Inleiding	22
3.2. Materiaal en methoden	24
3.3. Resultaten en konklusies	27

V. Enkele experimenten met sulfidegradiënten	29
4.1. Inleiding	29
4.2. Materiaal en methoden	31
4.3. Resultaten en konklusies	32
VI. De groei van <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> en <i>Thiobacillus</i>	
sp. in een tweetraps chemostaat	41
5.1. Inleiding	41
5.2. Materiaal en methoden	42
5.2.1. De tweetraps chemostaat	42
5.2.2. Over de ophoping en isolatie van	
<i>Thiobacillus</i> uit de wadmodder	44
5.3. Resultaten en konklusies	46
VII. Literatuur	50
Aanhangsel	
Tabellen en figuren	

I. SUMMARY

The occurrence and vertical distribution of autotrophic thiosulfate oxidizing bacteria in the sediments of the Dutch Waddensea has been investigated. With the use of a new quantitative method based on a relation between the rate of oxidation of thiosulfate in mineral media and the activity of the inoculated mud, a high activity in the surface layer of a vertical sedimentprofile could be demonstrated in only one case. In all cases a slight activity of the concerned bacteria in all depths was found, and it was concluded that the bacteria could move to higher depths by active migration.

Together with some experiments with sulfidegradients evidence was found for the occurrence of different types of bacteria concerning their preference towards pH and oxygen, this could only be explained with the

existence of chemical different microenvironments in the sediments.

The vertical distribution of the HCl-soluble fraction of hydrogen-sulfide was determined and ranged from low values at the surface layer to higher values in the FeS-layer and slight values in the pyrite-layer in the sediment.

A two-stage chemostat experiment with *Desulfovibrio desulfuricans* growing in the first stage and *Thiobacillus* sp. in the second was disturbed by the development of heterotrophic bacteria.

SAMENVATTING

Het voorkomen en de verticale verdeling van kleurloze chemolithotrofe zwavelbacteriën in het sediment van het Balgzand werd onderzocht. Minerale media met thiosulfaat als energiebron werden met wadmodder beënt en er werd een verband gevonden tussen de geënte hoeveelheid wadmodder en de oxydatiesnelheid van het thiosulfaat. Via het gevonden verband werd de activiteit van de onderzochte bacteriën in enkele sedimentprofielen onderzocht en in één geval kon een hoge activiteit in de oppervlaktelaag van het sediment aangetoond worden. In alle gevallen werd in alle onderzochte diepten van het sediment een geringe activiteit gevonden en de konklusie werd getrokken dat er sprake was van actieve migratie van zwavelbacteriën.

O.a. met behulp van enkele experimenten met sulfidegradiënten werden verschillen in optimum en tolerantie t.o.v. pH en zuurstof gevonden, het voorkomen van verschillende typen bacteriën werd verklaard met het bestaan van chemische microniches in het sediment.

De verticale verdeling van H_2S in het sediment werd bepaald d.m.v. sulfide destillaties, waarbij alleen de door HCl-vrijgemaakte fraktie van het gebonden sulfide bij de bepaling werd betrokken. Het op deze wijze bepaalde sulfidegehalte was laag in de aerobe laag, hoog in de

anaerobe laag en nam weer af in de pyrietlaag.

In een tweetraps kontinu-kultuur werd de groei van *Thiobacillus* sp. op door *Desulfovibrio desulfuricans* gevormde sulfide onderzocht, het experiment werd gestoord door de ontwikkeling van heterotrofe bacteriën.

II. INLEIDING

1.1. De veldsituatie

Veel organisch materiaal, dat uit de Noordzee wordt aangevoerd, of in de Waddenzee wordt geproduceerd, sedimenteert met de getijdenbewegingen in het Waddengebied. Vooral op plaatsen, waar een lage stroomsnelheid optreedt, kan dit vaak fijn verdeelde materiaal bezinken en ook op plaatsen waar veel planten of mosselen voorkomen kan het gehalte aan organisch materiaal van het wadsediment behoorlijk oplopen. Dergelijke sedimenten bevatten bijzonder veel bacteriën, die aan de kleideeltjes of ditritusdeeltjes vastgehecht zijn (FERGUSON WOOD, 1972).

In de bovenste centimeters van dit sediment, zal de afbraak van dit materiaal door de goede toegankelijkheid van zuurstof grotendeels onder aërobe omstandigheden geschieden, maar dieper in het sediment is het zuurstofgehalte hierdoor zover gedaald dat anaerobe respiratie- en gistingsprocessen gaan optreden, en doordat het zeewater relatief veel sulfaat bevat, treedt onder deze omstandigheden een intensieve sulfaat-reductie op door o.a. Desulfovibrio spec., waarbij sulfide gevormd wordt (VOSJAN 1975). Een gedeelte van dit sulfide slaat neer als FeS_2 , -waaraan het wad onder het oppervlak haar karakteristieke zwarte kleur ontleent-en een gedeelte diffundeert naar het oppervlak, waar het aan de grens van het aerobe gedeelte zowel chemisch (WHEATLAND, 1954) als biologisch geoxideerd wordt door Thiobacillus spec. en Thiomicrospira pelophila (KUENEN, 1972) tot voornamelijk sulfaat en thiosulfaat (SOROKIN, 1972), behalve deze chemolithotrofe oxydatie van gereduceerde

zwavelverbindingen kan in ieder geval thiosulfaat ook nog geoxydeerd worden door heterotrofe bacteriën (TUTTLE et al. 1974, SANDKVIST, 1968).

Omtrent de verticale verdeling van deze verschillende bacteriën in relatie met fysische en chemische parameters in het wadsediment in situ is nog maar weinig bekend. De tot nu toe meest volledige gegevens zijn ontleend aan de Zwarte Zee, en enkele meromictische meren, d.w.z. meren waarin een permanente stratificatie optreedt t.g.v. verschillen in chemische samenstelling van verschillende lagen in de verticale waterkolom (SOROKIN, 1972). SOROKIN beschreef situaties in de Zwarte Zee, die analoog zijn met de processen welke zich in het wadsediment afspelen zoals de anaerobe sulfaatreductie en de chemolithotrofe oxydatie van gereduceerde zwavelverbindingen. Op verschillende stations bepaalde hij het verticale verloop van de concentraties aan zuurstof, sulfide, de redoxpotentiaal, aantallen sulfaatreducerders en thiobacilli en actieve chemosynthese d.w.z. de incorporatie van $^{14}\text{CO}_2$ in bacterieel materiaal (waaronder chemolithotrofe groei, waartoe sommige thiobacillussoorten zoals T. thiooxidans en T. thioparus in staat zijn (KUENEN 1972)). Overeenkomstig het gegeven dat deze obligaate chemolithotrofe thiobacilli voor hun groei zowel zuurstof (electronacceptor) als sulfide (electronendonor) nodig hebben vond SOROKIN uitsluitend thiobacilli en actieve chemosynthese in een dunne laag, waar zowel sulfide als zuurstof in lage concentraties beschikbaar waren. Boven deze laag nam dan het zuurstofgehalte sterk toe, en onder deze laag het sulfidegehalte. Dienovereenkomstig verloopt de redoxpotentiaal van negatief onder de chemosyntheselaag tot positief erboven. De hoogste Thiobacillus-activiteit werd gevonden in een gebied van 0 tot -30 mV. SOROKIN vond, dat bacteriële sulfaatreductie en sulfideproductie juist plaats vond in het gebied met de negatieve redoxpotentiaal vlak onder de "Thiobacillus-laag". De optimum redoxpotentiaal voor de ontwikkeling van Desulfovibrio

ligt tussen de -100 en -300 mV (ZOBELL & RITTENBERG, geciteerd door WHEATLAND).

Aan het vergelijkbaar onderzoek in de sedimenten van de Waddenzee kleven een aantal grote problemen. Kon SOROKIN zijn monsters nemen in een waterkolom die tot 1000 m lang was, in het wadsediment spelen deze processen zich af in een laag van 10-30 cm. De chemosyntheselaag in de Zwarte Zee was 10-15 m dik; in het wadsediment bedraagt deze dikte mogelijk slechts een enkele millimeter. De monsternamen, die men doorgaans uitvoert door een plastic pijp in de modder te drijven, en deze aan beide zijden met een stop af te sluiten, is niet ongestoord. Bij het uit de pijp drukken van zo'n "wadkern" perst men de modder samen en verschuift het interstitieel water tussen de kleideeltjes. Bovendien is de natuurlijke situatie op droogvallende platen in de Waddenzee zelden zo ideaal als men voor een studie zou wensen. Door stromingen en turbulenties tijdens stormen treedt vaak omwoeling op van de bovenste lagen van de wadmodder. Slechts diepe geulen, zoals "de Vlieter", een geul die sinds het aanleggen van de Afsluitdijk langzaam dichtslibt onder een behoorlijke waterlaag vertonen tekenen van een ongestoorde verticale verdeling (VOSJAN, mond. med.).

Verschillende onderzoekers hebben zich beziggehouden met het microbiologisch-geochemisch onderzoek aan sedimenten, zoals de seizoensvariatie (NEDWELL & FLOODGATE, 1972) en verticale verdeling (SANDKVIST, 1968). SANDKVIST nam zijn monsters bij Nes (Ameland) en hij onderscheidt de volgende geochemische zones in het sediment:

1. de hydroxide zone. Dit is de opperste laag van het sediment, variërend van enkele mm tot enkele cm in dikte. Deze laag is geelachtig van kleur en bevindt zich in een geoxideerde toestand, de redoxpotentiaal is positief. Het ijzer uit de wadbodem is aanwezig als ferrihydroxides.

2. de "monosulphuric" zone. Deze laag is 10-40 cm dik en door de aanwezigheid van FeS zwart gekleurd. De laag bevindt zich in gereduceerde toestand en bevat vaak ook vrij sulfide hetgeen goed te ruiken is.
3. de pyrietzone. Deze laag is overwegend grijs van kleur door de aanwezigheid van pyriet (FeS_2). Het pyriet wordt in een langzaam abiogeen proces gevormd (FERGUSON WOOD 1972). Gemakshalve zal ik deze drie zones in dit verslag resp. "geoxideerde laag", "gereduceerde laag" en "pyrietlaag" noemen. We verwachten nu aerobe, heterotrofe bacteriën in de aerobe laag, de chemolithotrofe organismen op de overgang van geoxideerde naar gereduceerde laag en de sulfaatreduceerders vlak daaronder in de gereduceerde laag.

1.2. De experimentele benadering

De hoge graad van complexiteit, kenmerkend voor natuurlijke omstandigheden, maakt deze bijzonder ontoegankelijk voor het inzicht in de funktionering van mikroorganismen in hun natuurlijke leefmilieu. Een veelheid van factoren oefent hun invloed gelijktijdig uit, en niet zelden vertonen in situ-metingen dermate hoge spreidingen, dat men slechts kan gissen naar de oorzaak van de waargenomen verschijnselen. In het algemeen zijn deze natuurlijke omstandigheden gekenmerkt door:

- a. vaak lage substraatkoncentraties en daarmee gepaard gaande lage groeisnelheden.
- b. onregelmatige toevoer van substraat zodat noch van een "open", noch van een "gesloten" systeem gesproken kan worden. Door de hoge variatie en complexiteit van de substraatsamenstelling is veelal onduidelijk waardoor de groei beperkt wordt.
- c. sterke heterogeniteit van het milieu, er bestaat een ruimtelijke verdeling van een groot aantal microniches, die ieder hun eigen flora herbergen.

Om deze redenen wordt bij ekologisch onderzoek naast beschrijvende veldstudies gezocht naar de toepassing van modelsystemen, waarin men de verschillende factoren meer in de hand heeft en die de natuurlijke omstandigheden tot op zekere hoogte beschrijven. Het feit, dat zo'n model vrijwel altijd een sterke symplifikatie van de werkelijkheid voorstelt, betekent dat men evenredig voorzichtig moet zijn met de interpretatie van de resultaten die men met een dergelijk experiment verkrijgt. Men zal moeten trachten "een werkelijkheid op te bouwen" uit veldbeschrijvingen enerzijds in combinatie met laboratoriumvereenvoudigingen anderzijds.

JANNASCH & MATELES (1974) geven een overzicht van het onderzoek aan verschillende van deze modelsystemen in de mikrobiologie. Grofweg zijn er twee scheidingslijnen te trekken in de aard van deze systemen:

1. open en gesloten systemen. Een open systeem biedt de mogelijkheid tot nauwkeurige kwantitatieve kinetische studies (chemostaat, turbidostaat etc.) door het instellen van een steady-state, die in de natuur zelden bereikt wordt (d.w.z. in de tijd konstante concentraties van biomassa en substraat) en dus in de meeste gevallen geen reële betekenis heeft t.a.v. de toepassing op natuurlijke situaties.

Tot de gesloten systemen behoren aquaria en batchkultures waarin men in ekologisch opzicht belangrijke kwalitatieve aspecten zoals suksessie en verschillende wisselwerkingen tussen mikroorganismen onderling kan bestuderen (zie ook: WIEBE, 1971).

2. heterogene en homogene systemen. Veel heterogene systemen zijn zo complex dat zij als intermediair tussen veld en laboratoriumonderzoek opgevat kunnen worden. JORGENSEN & FENCHEL (1974) wilden een aquarium met wadsediment en lieten over het oppervlak daarvan geaëreerd zeewater stromen. Zij onderzochten de ontwikkeling van verschillende zwavelbacteriën. Een tweede voorbeeld van een heterogeen systeem werd beschreven door

EGUNOV (1895, geciteerd door SOROKIN, 1972): een verticale cylinder bevatte H_2S houdend water uit de Zwarte Zee, onder in de cylinder was een Na_2S -houdend agarlaag aangebracht. Boven deze laag ontwikkelden zich een zone waarin sulfaatreduktie optrad, en daarboven een dunne laag waarin thiobacilli tot ontwikkeling kwamen. Een dergelijk experiment kan een goed kwalitatief inzicht verschaffen.

Het gebruik van homogene systemen, d.w.z. het kweken van mikro-organismen gesuspenderd in een vloeibaar medium vindt uitgebreide toepassingen in de mikrobiologie en kan verder als bekend worden verondersteld.

1.3. De vraagstelling

De vraagstelling van ons onderzoek zou als volgt geformuleerd kunnen worden: Doel was, het funktioneren van de zwavelcyclus in de wadbodem te bestuderen, daartoe zouden wij proberen de verticale verdeling van *Desulfovibrio spec.* en *Thiobacillus spec.* te correleren met de Eh, pH, sulfidegehalte in het sediment. A. van Kranendonk heeft de tellingen van *Desulfovibrio* en de sulfaat-, Eh- en pH-bepalingen uitgevoerd. Ik heb getracht de verdeling te onderzoeken van kleurloze zwavelbacteriën, welke in staat zijn tot chemolithotrofe oxydatie van thiosulfaat, tevens heb ik mij beziggehouden met het onderzoek naar de verticale verdeling van sulfide in het wadsediment.

Ons werk had behalve een beschrijvende, ook nog een experimentele kant en gezamenlijk hebben wij getracht d.m.v. een tweetraps continue kulture een modelsysteem op te zetten, om zodoende enkele kwantitatieve aspecten te kunnen bekijken. Ikzelf heb nog wat proeven gedaan met heterogene gesloten systemen, die enigszins te vergelijken waren met de door EGUNOV beschreven experimenten (zie boven). In hoofdstuk 2 en 3 zullen de resultaten van mijn bijdrage aan het veldonderzoek behandeld worden. In hoofdstuk 4 zal ik ingaan op enkele experimenten met sulfide

gradiënten en in hoofdstuk 5 wordt het verloop van ons gezamenlijk experiment met de 2-traps-chemostaat behandeld.

III. DE BEPALING VAN DE VERDELING VAN CHEMOLITHOTROFE ZWAVELBACTERIËN IN HET WADSEDIMENT

2.1. Inleiding

Tot de groepen van bacteriën die in de Waddenzee mogelijk betrokken zijn bij de oxydatie van sulfide en andere gereduceerde zwavelverbindingen behoren in de eerste plaats de obligaate chemolithotrofe zwavelbacteriën (w.o. thiobacilli van de thioparus/thiooxidansgroep), de mixotrofen (aan *Thiobacillus novellus* verwante thiobacilli) (KUENEN 1972) en heterotrofe bacteriën (TUTTLE et al. 1974).

De meeste thiobacillussoorten zijn in staat tot groei op een volledig mineraal medium met thiosulfaat als energiebron, bicarbonaat als (anorganische) koolstofbron en zuurstof als electronenacceptor. In de praktijk wordt thiosulfaat het meest als energiebron toegepast omdat sulfide zeer moeilijk hanteerbaar is.

Bij de chemolithotrofe oxydatie van thiosulfaat wordt zuur gevormd:

$$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 5 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{SO}_4^{2-} + 10 \text{H}^+ + 10\text{e}^-$$

In batch-kultures en op agarplaten is de oxydatie vaak niet volledig en worden soms grote hoeveelheden moleculaire zwavel gevormd.

Bij de heterotrofe oxydatie van thiosulfaat wordt de vrijgekomen energie slechts ten dele door het organisme benut en is hooguit sprake van een groeistimulerend effect. Isolaties van heterotrofe thiosulfaat-oxideerders veroorzaakten geen daling in de pH van het medium (TUTTLE et al. 1974; TUTTLE & JANNASCH 1973).

Een selektieve ophoping van heterotrofe thiosulfaatoxideerders die het tot ontwikkeling komen van andere organismen uitsluit is niet uit te voeren en de bepaling van heterotrofe thiosulfaatoxideerders in het

wadsediment is in dit onderzoek-hoe belangrijk deze groep ook moge zijn-niet uitgevoerd.

Berustend op de hoge selektiviteit van het minerale medium voor chemolithotroof groeiende bacterien is het in principe mogelijk de relatieve aantallen van deze bacteriën d.m.v. tellingen of aktiviteitsbepalingen in het wadsediment vast te stellen.

Bij de toepassing van agarplaten als telmethode moeten we ons realiseren, dat de bacteriën wellicht aan de kleideeltjes geadsorbeerd zijn en hierdoor klusters kunnen vormen, zodat gevonden aantal kolonies te laag kan zijn t.o.v. het werkelijke aantal bacteriën. Een kluster van 2 of meer bacteriën kan dan als kolonievormende eenheid optreden.

De meest ideale methode is echter de aktiviteitsbepaling, waarbij aan het sediment monster kleine hoeveelheden gelabeld natuurlijke substraat worden toegevoegd, waarna de hoeveelheid gelabeld produkt bepaald kan worden. Een methode, welke analoog is en die door (VOSJAN 1975) is toegepast om door middel van radioactief sulfaat de aktiviteit van sulfaatreduktie in het wadslib te bepalen is niet te gebruiken in dit geval omdat gelabeld sulfide in onbekende mate ook chemisch geoxideerd wordt.

BANSEMIER (1970) beschreef een methode, waarbij aan een watermonster een hoeveelheid gekoncentreerd mineraal medium werd toegevoegd, de thiobacillusaktiviteit in het betreffende watermonster drukte hij uit in het percentage thiosulfaatverdwijning.

Hoewel het in principe zinvol leek om deze methode op haar bruikbaarheid te testen werd de door BANSEMIER gebruikte methode zo summier beschreven (geen vermelding van inkubatietijd, temperatuur, aeratie etc.) dat zij geen bruikbare informatie bevatte.

KRAMARENKO (1962, geciteerd door SOKOLOVA & KARAVAIKO 1964) beschreef een dergelijke methode om de aktiviteit van T. thiooxidans

te bepalen. 100% oxidatie van thiosulfaat in 10 dagen noemde hij een hoge aktiviteit, 50% matige en 20-25% een lage aktiviteit. Het feit dat KRAMARENKO deze bepalingen onder zure omstandigheden uitvoerde maakt zijn resultaten onbetrouwbaar, bij een pH lager dan 5 ontleedt thiosulfaat vanzelf (POSTGATE, 1962).

Bij het interpreteren van de resultaten van de aktiviteitsbepalingen dient grote voorzichtigheid in acht genomen te worden, aktiviteiten die men vindt in een synthetisch medium mogen niet op natuurlijke situaties betrokken worden. Het is duidelijk dat de potentiële aktiviteit die men meet "door sluimerende bacteriën tot leven te wekken" veelgroter is dan in situ gevonden zou kunnen worden. Zo vond SOROKIN (1972) dat de laag waarin potentieel aktieve thiobacilli voorkwamen 10x zo dik was als de laag waarin werkelijk produktie voorkwam.

Verder is duidelijk dat men door de keuze van het medium kan selekteren op een relatief onbelangrijke groep van bacteriën. Het gebruik van onnatuurlijk hoge substraatkoncentraties kan tot gevolg hebben dat men selecteert op organismen met de hoogste groeisnelheid i.p.v. de organismen met een lage groeisnelheid en hoge substraataffiniteit die in natuurlijke omstandigheden belangrijk zouden kunnen zijn (zie: KUENEN, 1972; JANNASCH & MATELES 1974).

Het gebruik van thiosulfaat in plaats van sulfide hoeft niet "onnatuurlijk te zijn" daar in natuurlijke situaties grote hoeveelheden thiosulfaat kunnen voorkomen. (KUENEN 1972; TUTTLE & JANNASCH 1973, SOROKIN, 1972). De chemische samenstelling van de grenslaag in het wad is moeilijk vast te stellen, het is niet duidelijk of sulfide of een al dan niet reeds gedeeltelijk chemisch geoxideerde zwavelverbinding als substraat voor de autotrofe bacteriën optreedt.

2.2. Materiaal en methoden

2.2.1. Monsternamen

Monsters voor de sedimentprofielen werden genomen op het Balgzand. Plastic pijpen van ± 4 cm doorsnede werden vertikaal in de modder gestoken en aan beide zijden d.m.v. rubber stoppen afgesloten. De verschillende chemische en microbiologische bepalingen werden zoveel mogelijk aan het zelfde profiel verricht. Wanneer dit niet mogelijk was werden meerdere profielen dicht bij elkaar genomen.

De pijpen werden vertikaal vervoerd en binnen enkele uren gebruikt. Profielen t.b.v. chemische bepalingen werden direct aan boord van de "Eider" ingevroren.

Enkele pogingen werden gedaan om d.m.v. een z.g. Jenkins-mud-sampler sedimentprofielen te verzamelen van de Vlieter en enkele afgesloten geulen op het Balgzand. De mud-sampler, die oorspronkelijk was ontwikkeld voor zeer zachte modderlagen in zoetwatermeren bleek voor de meer kompakte sedimenten in de Waddenzee ongeschikt. Om deze reden hebben wij ons moeten beperken tot minder ideale situaties op het Balgzand.

2.2.2. Tellingen m.b.v. agarplaten

Verschillende pogingen werden gedaan om media voor agarplaten samen te stellen, die voldoende selectief zouden zijn voor de groei van thio-bacilli, waarvan de kolonies duidelijk herkenbaar zijn door de ronde vorm en de afzetting van zwavel. Verschillende media werden uitgeprobeerd met zowel thiosulfaat als fijn verdeeld en colloïdaal zwavel als energiebron in minerale media met 0.8-1% agar. De platen werden bestreken met suspensies van wadmodder uit de NIOZ-haven in steriel gebufferd water met 2.5 % NaCl en bij 20°C geïncubeerd.

Hoewel de platen met thiosulfaat als energiebron de hoogste aantallen als thiobacillus identificeerbare koloniën te zien gaven, trad in alle

gevallen groei op van een veelvoud van heterotrofe bacteriën, gisten en schimmels die de kleine thiobacilluskoloniën overwoekerden, waardoor de bruikbaarheid van agarplaten voor het gestelde doel onwaarschijnlijk werd geacht. Aanvankelijk werd de sterke ontwikkeling van heterotrofe organismen toegeschreven aan het hoge gehalte aan organisch materiaal van de wadmodder uit de NIOZ-haven, later bleek echter dat ook de gebruikte agar (C.M.N.-poeder Lamers & Indemans) niet zuiver genoeg was om de ontwikkeling van heterotrofen uit te sluiten, om deze reden is later overgegaan tot het gebruik van zeer zuiver agar (DIFCO, Agar Noble) (zie verder onder 5.2.1.).

Tenslotte werden door TUOVINEN (1972) beschreven platen voor de telling van *Thiobacillus neapolitanus* samengesteld, overigens zonder verbetering van de resultaten.

2.2.3. Tellingen m.b.v. verdunningsreeksen in mineraal medium

Op 18-2, 21-2 en 21-3-74 werden aan sedimentprofielen van het Balgzand gelijktijdig tellingen van sulfaatreduceerders (door A.v. Kranendonk) en thiobacilli verricht.

Ingewogen hoeveelheden wadmodder tussen de 0 en 3 gram werden gesuspenderd in 10 ml steriel medium I (zie aanhangsel) en vervolgens verdund in reeksen van 10^{-2} tot 10^{-6} .

Van 5 dieptes in het sediment werd voor iedere diepte in viervoud een verdunningsreeks gemaakt in reageerbuizen. De verdunningsreeksen werden bij 20°C geïncubeerd. Een verdunning was positief wanneer na 2 weken incuberen duidelijk een verlaging van de pH werd gekonstateerd, het broomcresolpurper van medium I was dan omgeslagen van paars naar geel.

2.2.4. De bepaling van aktiviteit d.m.v. de oxidatie van thiosulfaat

Nauwkeurig gewogen hoeveelheden wadmodder werden gesuspenderd in

200 ml steriel medium in 300 ml erlenmeyerkolven afgesloten door een wattenprop. Na 12 uur stilstaan van de suspensies bij 20°C werden de kolven met een lage omwentelingssnelheid (150 rev/min.) geschud bij 20°C. Met regelmatige tussenpozen tot maximaal 3x per etmaal werd uit de kolven met een steriele pipet 10 ml medium gepipetteerd, waarna de hoeveelheid thiosulfaat bepaald werd dmv jodometrische titratie in 10% azijnzuur (ROY & TRUDINGER, 1970). Tegen een blanco, die onbeënt was werd het percentage thiosulfaat konsumptie bepaald. De titraties werden uitgevoerd op een automatische JOUAN titrator met potentiometrische indicatie. Getitreerd werd met een 0.01 N thiosulfaatoplossing, de titerstelling werd uitgevoerd op $K_3Fe(CN)_6$ (NEN 3103 noembladen van het Nederlands Normalisatie-Instituut).

Voor de experimenten waarbij het verband tussen de entingsdichtheid en de thiosulfaatkonsumptie werd bepaald werd gebruik gemaakt van modder uit de NIOZ-haven. De modder werd zeer goed geroerd, om de bacteriën zo gelijkmatig mogelijk over de modder te verdelen, vervolgens werd de modder op een büchnertrichter afgezogen tot ze een kleiachtig aanzien had, hierna kon de modder in de verschillende kolven worden ingewogen. De erlenmeyerkolven werden kortstondig zeer heftig geschud om de uitgeperste modder-klonten goed in suspensie te brengen.

De aktiviteitsbepalingen aan de sedimentprofielen van het Balgzand werden uitgevoerd door kleine hoeveelheden modder van verschillende diepten van het uitgeperste sedimentprofiel te wegen en te incuberen in 200 ml medium.

2.3. Resultaten en konklusies

Uit het bovenstaande is reeds gebleken, dat met het direkt uitstrijken van interstitieel water een suspensies van wadmodder op agarplaten t.b.v. thiobacillustellingen weinig succes is geboekt.

Na de incubatieduur van 2 weken van de verdunningereeksen voor de MP-tellingen bleken steeds hooguit 4 van de 10^{-2} (de zwakste verdunningen) verdunningen een duidelijke kleuromslag te vertonen. Alle overige verdunningen vertoonden ook na zeer lange incubatietijden kleuromslag noch troebeling of zwavelvorming. Het aantal positieve buizen was dus hooguit 4 op de 100 (voor 5 diepten) en hieruit werd de konklusie getrokken dat de gevolgde methode niet betrouwbaar was door een grote ongevoeligheid. Deze ongevoeligheid zou ten grondslag kunnen liggen aan enerzijds aantallen thiobacilli in de wadmodder of anderzijds "onaangepastheid" van het medium van de te tellen bacterieflora. Ten tijde van dit experiment was mij geen ander medium bekend dat uitzicht bood op betere resultaten, het domweg variëren van het medium leek mij geen haalbare kaart en er werd besloten om d.m.v. de reeds vermelde aktiviteitsbepalingen een andere weg in te slaan.

Aktiviteitsbepalingen

Het is een bekend verschijnsel dat de duur van een lagfase na het beënten van een medium nauw samenhangt met veel artificiële factoren van het groeimedum zoals bv. de "versheid" van het medium, de sterilisatie temperatuur (bij sterilisatie kan het toxische H_2O_2 gevormd worden), de samenstelling en O_2 en CO_2 gehalte van het medium. Vooral onder minder gunstige omstandigheden kan de grootte van het inoculum (de entingsdichtheid) nauw samenhangen met de duur van de aanloopfase en het was de vraag, of onder gestandaardiseerde omstandigheden (samenstelling medium, sterilatie, omstandigheden van beënten en incubatie) een eenduidig verband gevonden zou kunnen worden tussen de entingsdichtheid en de duur van de aanloopfase. Via het gevondere zou dan bij een onbekend monster de duur van de aanloopfase een relatieve maat kunnen zijn van de aktiviteit van het monster.

Op de 2.2.4. besproken wijze werd een tiental batchkultures beënt met verschillende hoeveelheden wadmodder uit de NIOZ-haven, aangenomen werd hierbij dat door verschillende hoeveelheden goed gemengde wadmodder in te wegen het aantal thiobacilli en daarmee ook de aktiviteit daarvan gevarieerd kon worden, m.a.w. dat de aktiviteit proportioneel was met het aantal bacteriën. Als maat voor de duur van de lagfase werd vanaf het moment van beënten de tijd gemeten totdat 50% van het substraat opgebruikt was ($=t_{50}$).

In Tabel I is het gevonden verband weergegeven. Bij de zwaarst beënte kultures trad exponentiële consumptie van de thiosulfaat op, bij de lichtst beënte trad een meer geleidelijke thiosulfaatvermindering op. In alle gevallen (ook bij de hierna te bespreken experimenten) trad op den duur 100% thiosulfaatkonsomptie op, daalde de pH tot maximaal 4 en werd fijnverdeeld zwavel neergeslagen.

Het bleek dat er een min of meer lineair verband bestond tussen de logaritmie van het aantal geënte grammen en de reciproke van t_{50} . Dit wil zeggen dat bij toenemende entingsdichtheid t_{50} nadert tot een minimum waarde (in dit experiment ± 66 uur) en bij afnemende entingsdichtheid nadert tot oneindig, in de praktijk zal er natuurlijk een grens zijn. Via een regressielijn werd het verband berekend (Fig. 1.). De correlatiecoëfficiënt was 0.94.

Op 9-5 en 31-5-1974 werden aktiviteitsbepalingen verricht aan 2 sedimentprofielen van het Balgzand (zie Tabel II). De twee monsters waren beide op vrijwel dezelfde plaats op een vrij slikkige plek aan de rand van een geul genomen. In vergelijking met een minimum t_{50} van 66 werden bij monster 9-5 zeer grote t_{50} 's gevonden. Via de mogelijke spreidingen in a en b van de in Fig. 1 gevonden regressielijn $\ln g = a t_{50}^{-1} - b$ konden schattingen gemaakt worden van de spreidingen in de berekende aktiviteiten. De getallen tussen haakjes zijn de berekende

waarden + en - 2x de schattingen van de standaard afwijkingen in de individuele waarnemingen. Het interval tussen haakjes komt ongeveer overeen met een betrouwbaarheidsinterval van 95% van de berekende waarden. Door het niet-lineaire verband tussen g en t_{50} zijn deze intervallen niet symmetrisch rond de berekende activiteiten en treden vooral bij kleine t_{50} grote spreidingen op.

Uit Tabel II valt direkt op dat op alle diepten, ook ver in de anaerobe laag een geringe thiobacillus aktiviteit werd gevonden. Dit is een onverwacht resultaat, aangezien door zeer lage concentraties nitraat in de Waddenzee het voorkomen van anaeroob levende Thiobacillus denitrificans onwaarschijnlijk is (TIMMER-TEN HOOR, mond. med.). Waarschijnlijker is, dat we hier te doen hebben met inaktieve thiobacilli die in medium weer beginnen te groeien. SOKOLOVA & KARAVAIKO (1964) vermelden dat *T. thioparus* langdurige anaerobe omstandigheden overleeft. Werden de door hen onderzochte bacteriën na 3 maanden blootgesteld aan kleine hoeveelheden lucht, dan trad direkt groei op in een thiosulfaat-medium. In analogie met onze resultaten vinden CADEE & HEGEMAN (1974) tot 10 cm diep in het sediment actief chlorofyll, dat onder belichting in staat is tot fotosynthese. Zij konkluderen dat sprake geweest moet zijn van aktieve migratie van algen, en andere, door hen geciteerde auteurs postuleren dat wanneer door stormen de bovenste cm van het wadsediment wegspoelen, deze algen uit diepere lagen de fotosynthese "overnemen". Tot een diepte van 25 cm kon door mikroskopisch onderzoek de aanwezigheid van intakte diatomeeën aangetoond worden (CADEE, mond. med.). Deze diatomeeën zijn tot 15μ groot.

Dit alles maakt goed mogelijk, dat de thiobacilli, die $\pm 1\mu$ groot en zeer beweeglijk zijn, eveneens door aktieve migratie tot diepere lagen kunnen doordringen.

De aktiviteitsbepaling van 31-5 laat zien, dat geheel volgens de

verwachting, in de bovenste laag van het sediment een hoge thiobacillus activiteit werd vastgesteld, uit de betrouwbaarheidsintervallen blijkt, dat de activiteit in de opperste laag van het sediment significant hoger is dan in de daaronder gelegen lagen. Bij deze bepaling werd de minimum t_{50} gevonden zodat de begrenzing naar boven moeilijk is vast te stellen en de activiteit dus veel hoger kan zijn dan is opgegeven. In Fig. 2 is de zaak grafisch weergegeven. Waarom in het profiel van 9-5 in de bovenste laag geen hoge activiteit werd gevonden is onbekend.

Immiddels waren met een ander medium (medium II, zie aanhangsel) betere groeieresultaten bereikt bij ophopingen e.d. dan met medium I, dat was afgeleid van het medium dat door BANSEMIER was gebruikt en het leek zinvol ook voor dit medium het verband tussen groei en entingsdichtheid te bepalen. Het was bij de voorgaande experimenten reeds opgevallen, dat de lichtsbeënte kulturen (vanf ong. 1 gram wadmodder) een minder stijle kurve lieten zien dan de zwaarder beënte kulturen en de aanvankelijke gedachte was, dat proportioneel met de wadmodder een essentiële groeistof of vitamine aan het medium werd toegevoegd, waardoor de zwaarder beënte kulturen een hogere groeisnelheid zouden kunnen ontwikkelen dan de lichter beënte kulturen. Om dit te ondervangen werd aan medium II 0.01 pro mille gistextract en trypticase toegevoegd, een hoeveelheid die te klein was om noemenswaardige heterotrofe groei te veroorzaken. De verwachting was, dat met medium II hogere groeisnelheden zouden optreden, zodat de aktiviteitsbepalingen sneller zouden kunnen worden uitgevoerd, en wellicht ook aan nauwkeurigheid zouden winnen.

In Tabel III IV en V zijn de resultaten weergegeven van drie afzonderlijke bepalingen, de eerste twee met gistextract en trypticase de laatste zonder, behalve de t_{50} is in deze Tabellen ook de t_{80} (80% thiosulfaatconsumptie) en Δ , d.i. $t_{80} - t_{50}$, d.w.z. de tijdsduur die verstrijkt tussen 50 en 80% thiosulfaatconsumptie en dus opgevat kan worden als de gemiddelde groeisnelheid op dit interval.

Uit Tabel III blijkt dat de grootste t_{50} 153 uur is tegen ruim 2000 uur bij medium I, waaruit blijkt dat medium II inderdaad sterke verkorting van de aanloopfase bewerkstelligt (aangezien dezelfde tendens wordt gevonden bij de andere 2 bepalingen mogen we aannemen dat deze verkortingen niet veroorzaakt zijn door een gemiddeld hogere aktiviteit van de modder waarmee deze bepalingen zijn uitgevoerd). De bepaling van Tabel III toont de kleinste spreidingen (hoogste correlatiecoëfficiënten) en in Fig. 3 zijn de thiosulfaat-konsumptiecurves afgebeeld (de afgeleide groeikurves). Nu blijkt, dat niet alleen sprake is van een tragere groeisnelheid bij de lichtst beënte kulturen maar ook van een tweede aanloopfase en dus van een soort bifasische groeikurve gesproken kan worden, de tendens daartoe neemt toe met afnemende entingsdichtheid. Het tweede gedeelte van groeikurve verloopt met een lagere groeisnelheid en het zou kunnen dat we hier met andere bacteriën te doen hebben dan in het eerste gedeelte van de groeikurve. Bij de verschillende bepalingen is gebleken dat om en nabij de langste tweede aanloopfases de pH indicator kleuromslag (traject van 6.5-5.7) vertoont en het ligt voor de hand aan te nemen dat het eerste deel van de groeikurve door zuurvorming beperkt word, en het vermoeden rees, dat de wadmodder een grote bufferende werking bezit, die bij de zwaar beënte kulturen de buffercapaciteit van het medium ver te boven gaat, waardoor hier geen groeibelemmering door pH-daling van het medium optreedt. In het tweede gedeelte van de groeikurve daalde de pH sterk en werd zwavel neergeslagen zodat we hier mogelijk te doen hebben met acidofiele thiobacilli. M.b.v. een schrijvende titrator werden verschillende hoeveelheden wadmodder met 0.2 N HCl getitreerd, de pH werd vooraf met een kleine hoeveelheid base op 10 gebracht.

Uit Fig. 4 blijkt dat de wadmodder inderdaad een krachtige bufferende werking bezit in het zure gebied, waarmede het niet-optreden van een groei-remming bij zwaar beënte kulturen is verklaard. De successie van

T. thiooxidans op T. thioparus in batchkultures is een bekend verschijnsel (VELDKAMP, caputcollege 1968/1969), waarbij de uitgesproken acidofiele T. thiooxidans slechts tot ontwikkeling kan komen als de pH van het medium door toedoen van T. thioparus, -die slechts voorkomt onder neutrale of zwak alkalische omstandigheden- voldoende is gedaald. Als pH-gebied voor de ontwikkeling van T. thioparus wordt een pH van 5-10 opgegeven, terwijl T. thiooxidans zich slechts kan handhaven binnen een pH-bereik van 0.6-5.5 (SOKOLOVA & KARAVAIKO, 1964), bovendien heeft T. thioparus een uitgesproken voorkeur voor microaerofiele omstandigheden met een lage redoxpotentiaal. T. thiooxidans daarentegen heeft een grotere zuurstof-behoefte en voorkeur voor milieus met een hoge redoxpotentiaal (SOKOLOVA & KARAVAIKO, 1964; BAAS BECKING & WOOD, geciteerd door KUENEN, 1972).

Dit alles is zeer in overeenstemming met de hierboven beschreven resultaten: de neutrale pH van medium I en II samen met de matige aeratie van de schudcultuur maken een snelle ontwikkeling van het T. Thioparus-type mogelijk, bij geringe buffering van het medium stopt de groei bij om en nabij pH 5 (kleuromslag) en treedt na een tweede aanloophase ontwikkeling van het thiooxidans-type op, een ontwikkeling, die echter veel trager verloopt door de beperkte toevoer van zuurstof in het medium. De duur van de tweede lagfase is weer o.m. afhankelijk van de activiteit van de T. thiooxidans uit het entmateriaal. Het voorkomen van een acidofiele soort in wadmodder die krachtig is gebufferd en een pH heeft van 7.3-7.7 (NEDWELL & FLOODGATE, 1972) is echter minder goed te verklaren, tenzij sprake is van sterke inhomogene verdeling van het milieu, waar zeer plaatselijk de pH voldoende kan dalen. SANDKVIST (1968) was niet in staat het voorkomen van zuurtolerante thiosulfaatoxiderende bacteriën van het thiooxidans- en het ferrooxidans-type aan te tonen.

In Fig. 5 zijn de regressielijnen uit Fig. 1 en Tabel III afgebeeld. Bij benadering zijn de regressielijnen van medium I en medium II evenwijdig.

hetgeen erop wijst dat in drie gevallen (t_{50} med. I, t_{50} med. II en t_{80} med. II) hetzelfde funktionele verband wordt gevolgd. De verschuiving van de lijnen t.o.v. elkaar wordt veroorzaakt door tijdsverschillen die optreden tussen de 3 omstandigheden. In principe zijn zowel medium I als medium II geschikt voor het doen van relatieve aktiviteitsbepalingen, in de praktijk voldeed medium I beter, omdat achteraf bleek dat bij snelle groei en korte aanloophases de t_{50} 's veel minder nauwkeurig te bepalen waren, de grote spreidingen en dus lagere korrelatiecoëfficiënten bij de andere bepalingen uit Tabel IV en V zijn daar vermoedelijk het gevolg van de laatste bepaling was dermate onnauwkeurig dat uit de resultaten geen verdere konklusies getrokken lijnen worden.

In het algemeen kunnen we dus konkluderen dat voor nauwkeurige aktiviteitsbepalingen, die media voor de ontwikkeling van de betreffende bacteriën minder gunstig zijn betere resultaten zullen opleveren in die gevallen zal de invloed van de entingsdichtheid of de aktiviteit van de bacteriën op de aanloophase immers het grootst zijn. Willen we voorkomen dat een tweefasische groeikurve optreedt dan verdient het aanbeveling de media sterk te bufferen.

De regressielijn $\Delta (t_{80}-t_{50})$ loopt vrijwel horizontaal, hetgeen erop wijst dat de invloed van de entingsdichtheid op de groeisnelheid tussen de 50 en 80% gering is.

Op 8-1-75 werd door ons op het Balgzand een sedimentprofiel gemonsterd waaraan zowel tellingen van sulfaatreducerders als aktiviteitsbepalingen van thiobacilli werden verricht. Door een ongelukkig toeval was de dag voor ons het meer slikkige gedeelte van het Balgzand onbereikbaar zodat wij een zeer zandig monster in handen kregen, dat bovendien geen duidelijke aerobe-anaerobe laag verdeling vertoonde maar een kennelijk gestoorde verdeling van gele en grijs-zwarte banden tot 4 cm diep.

Van verschillende dieptes werden uit het sediment duplo monsters van

ongelijke grootte genoemd en op reeds beschreven wijze geïncubeerd in erlenmeyerkolven met medium II. Van beide duplo monsters werden de t_{50} en t_{80} bepaald en de activiteiten werden berekend volgens de regressielijnen uit Tabel III. Eén kultuur werd beënt met 10 gram wadmodder uit de NIOZ haven om bij benadering de minimum t_{50} en t_{80} van dit medium vast te stellen, hierdoor werd een indruk verkregen van de bovengrens van de bepaling die men desgewenst als 100% zou kunnen uitdrukken.

Uit Tabel VI blijkt dat zeer lage activiteiten werden gemeten t.o.v. de maximale activiteit van 4.15 (50%) en 5.02 (80%) per gram. Dit is in overeenstemming met de tellingen van *Desulfovibrio*, (zie intern verslag A. v. Kranendonk) waarbij ook nauwelijks enig positief resultaat werd geboekt.

Kijken we echter naar de diepte van 2.5 cm, dan zien we dat daar in duplo bij t_{50} en t_{80} een duidelijk hogere activiteit werd gevonden dan op andere diepte (de waarden (74) en (78) werden door korte extrapolatie van de thiosulfaatkonsumptiecurves gevonden en zijn redelijk betrouwbaar). Het is dus mogelijk dat zich op deze diepte een concentratie van thiobacilli heeft bevonden, maar overtuigend zijn de resultaten niet.

IV. DE BEPALING VAN SULFIDE IN HET WADSEDIMENT

3.1. Inleiding

Bij de beschouwing van het sulfide in het wadsediment kunnen we in het algemeen onderscheid maken tussen twee vormen waarin het sulfide kan voorkomen; n.l. de vrije vorm en gebonden aan metalen als metaalsulfides.

Het vrij sulfide is opgelost in het interstitieel water in de vorm S^{2-} , HS^- en H_2S , afhankelijk van de pH. Aangezien het S^{2-} vrijwel uitsluitend onder alkalische omstandigheden (pH 12) voorkomt, zal het vrij sulfide bij de pH tussen 6 en 8 in het wad overwegend als H_2S en HS^- aanwezig zijn. Het vrije sulfide kan zowel biologisch als chemisch

geoxideerd worden, bovendien verdwijnt het makkelijk uit de bovenlaag van het sediment door verdamping en uitspoeling (NEDWELL & GLOODGATE, 1972).

De gebonden vorm van het sulfide bestaat grontendeels uit FeS en FeS_2 en is gelokaliseerd in resp. de anaerobe- en de pyriet laag. Het FeS oxideert snel aan de lucht en kan ook door Thiobacilli geoxideerd worden (SOKOLOVA & KARAVAIKO, 1964). Het pyriet is chemisch vrij stabiel en mogelijk niet bij de zwavelcyclus betrokken.

CLINE (1969) beschreef een bruikbare methode volgens welke men in watermonsters het opgelost sulfidegehalte kan bepalen binnen een range van 1-1000 μM . Deze bepalingsmethode berust op een veelgebruikte colorimetrische reactie tussen N,N-dimethyl-p-phenyleendiamine en sulfide in aanwezigheid van Fe^{3+} ionen waarbij methyleenblauw ontstaat, spectrofotometrisch te bepalen bij 670 nm. De bepalingsmethode is gevoelig en men hoeft slechts één reagens aan het monster toe te voegen, bovendien is de reactie temperatuursonafhankelijk i.t.t. vergelijkbare methoden.

Teneinde het sulfidegehalte van complexe substraten of biologische weefsels te bepalen wordt de destillatiemethode toegepast (BUDD & BEWICH, 1952; JOHNSON & NISHITA, 1952; FOGO & POPOWSKY, 1948). Uit het monster wordt met zuur sulfide vrijgemaakt, en via een stikstofstroom doorgeleid door een zinkacetaatoplossing, het sulfide slaat neer als ZnS , en kan daarna colorimetrisch bepaald worden.

Door de methode van CLINE toe te passen op de destillatie verkreeg ik een bepalingsmethode op semimicroschaal die minimaal bewerkelijk is en gevoelig genoeg is voor de bepaling van sulfide in de wadmodder. In principe kan men door middel van deze methode zowel vrij als gebonden sulfide bepalen, door eerst bij neutrale pH stikstof door te leiden, waarbij het vrije sulfide verdampt, na toevoeging van het zuur komt het gebonden sulfide vrij en kan apart in ZnAc opgevangen worden. (JØRGENSEN & FENCHEL 1974). Door het gebruik van verdund HCl kan men het als FeS

gebonden sulfide vrijmaken, het pyriet lost slechts op in salpeterzuur en kan men niet op deze wijze bepalen (NEDWELL & FLOODGATE, 1972).

Daar wij de beschikking hadden over een specifieke sulfide-elektrode, waarmee men rechtstreeks het vrij sulfide in het sediment kan bepalen heb ik mij beperkt tot de bepaling van het totaal sulfide (T.S.) d.i. gebonden en vrij sulfide in het sediment.

3.2. Materiaal en methoden

In Fig. 6 is de opstelling, zoals deze werd gebruikt bij de destillaties, afgebeeld. Zuurstofvrije stikstof werd gemaakt door stikstof door een verlichte buis gevuld met een oplossing van riboflavine, EDTA en methyleenblauw te laten borrelen (STRAUSS & NICKERSON, 1961), onder gereduceerde omstandigheden is deze oplossing geel, bij blauw-groene kleur dient de oplossing vervangen te worden.

In kolf A wordt de stikstof geleid door A.D. waaraan een brokje diepgevroren sediment is toegevoegd. Door de wadkernen diep te vriezen voorkomt men oxideren en verdampen van de sulfide en kan men het sediment snel wegen in gekoelde bekerglasjes vóórdat men de bepaling uitvoert.

Via een injectiespuit of tegendruktrechter C voegt men verdund HCl aan het sediment toe. Via een overloop en een capillair borrelt het gas door een 1% ZnAc-oplossing (B). Na de destillatie kan men het Cline-reagens direkt in de opvangbuis toevoegen. Alle onderdelen van de opstelling zijn verbonden door slijpstukken (niet getekend) en ook de opvang-reageerbuisen kunnen door stoppen afgesloten worden, zodat geen sulfide kan ontsnappen tijdens de kleurontwikkeling. Zeven van deze destillatie opstellingen waren samen opgesteld, de gasstromen door de inleidbuisen bij A waren onderling regelbaar door slange klemmen.

Bepaling van de opbrengst van de destillaties

Door in kolf A een bekende hoeveelheid sulfide (standaard oplossing van Na_2S) te brengen, en deze hoeveelheid ook direkt volgens CLINE te bepalen in een 1% ZnAc-oplossing, kan men de opbrengsten van de destillaties berekenen.

De direkte bepaling volgens CLINE werd uitgevoerd in kleine flesjes, die met een rubber stop en een doorboorde metalen schroefdop waren afgesloten. Standaardoplossingen van Na_2S werden gemaakt met zuurstofvrij water. Na_2S -kristallen werden gewassen en gedroogd met kleenextissues om oxidatieprodukten te verwijderen.

Binnen de ranges van 40-250 μM en 250-1000 μM werden ijkreeksen gemaakt door standaardoplossingen tot 6 ml zowel in de flesjes als in de destillatiekolven te pipetteren. Aan de flesjes werd 6 ml 2% ZnAc.-oplossing toegevoegd, de opvangbuizen van de destillatieopstellingen bevatte 12 ml 1% ZnAc. De ijkreeksen in de flesjes werden met zuurstofvrij A.D. aangevuld tot 12 ml, zodat bij de destillaties als de direkte bepalingen de sulfide steeds werd opgevangen in 12 ml 1% ZnAc.

D.m.v. een injectiespuit werd het Cline-reagens door de doppen van de flesjes gespoten, dit reagens is sterk zuur en maakt het sulfide weer vrij uit het neergeslagen ZnS , tergelijktijd kan onder buitensluiting van zuurstof kleurontwikkeling plaatsvinden. Door de gemeten extincties van de direkte bepalingen en de met de zelfde hoeveelheid standaardoplossingen uitgevoerde destillaties op elkaar te delen konden de opbrengsten van de destillatie bepaald worden.

Voorschrift sulfide destillaties

1. Maak A.D. zuurstofvrij door een half uur met zuurstofvrije stikstof te laten doorborrelen.
2. Spoel de destillatiekolfjes en de kapillairen goed schoon met A.D.
3. Pipetteer 20-25 ml. zuurstofvrij A.D. in de destillatiekolfjes en

- 12 ml 1% ZnAcoplossing in de opvangbuizen. Laat ongeveer een kwartier de opstellingen doorborrelen met zuurstofvrije stikstof.
4. Vul injectiepijpen of de zuurtrechters met 10 ml 1 : 5 HCl.
 5. Voeg snel een brok voorgewogen sediment toe aan de A.D. in de destillatiekolven. Neem voor sediment uit de aerobe- en de pyriet-laag 1-2 gram, voor sediment uit de anaerobe laag 0.5-1 gram. Controleer of de opstellingen niet lekken door te kijken of de stikstof in de destillatiekolven even snel borrelt als in de opvangbuizen. Stel de toevoersnelheid van de stikstof zo in, dat er zeer kleine belletjes uit de capillairen komen.
 6. Voeg het zuur zéér langzaam toe (10 ml in $\pm$ 5 min) steek de injectienaalden schuin door het siliconenrubber zodat het zuur langs de wand van de destillatiekolven naar beneden loopt, en niet in de zij-arm terecht kan komen.
 7. Leid gedurende een half uur zeer langzaam stikstof door, schud de opstelling voorzichtig en laat daarna nog eens een half uur de stikstof doorborrelen.
 8. Sluit de stikstof toevoer af en maak de stikstofleidingen bij A los (vaak ontstaat een onderdruk zodat de ZnAc oplossing terug in de capillairen wordt gezogen).
 9. Verwijder de opvangbuizen en sluit deze af met een stop, spuit de capillairen niet af.

Opwerking

1. We maken onderscheid tussen 3 gevallen:
 - a. Het ZnS-neerslag is onzichtbaar tot licht
 - b. Het neerslag is goed zichtbaar tot licht troebel
 - c. Het neerslag is zeer troebel
2. In geval a: pipetteer 6 ml uit de ZnAc-oplossing (zorg dat het neerslag goed gesuspenderd is), voeg 0.5 ml 40-250 μ M CLINE reagens

toe, sluit goed af en laat een half uur staan voor kleurontwikkeling. Pipetteer daarna 1 ml hieruit, voeg 10 ml A-D- toe en lees bij 670 nm af tegen een blanko, waarbij is uitgegaan van 6 ml 1% ZnAc-oplossing en waarmee dezelfde handelingen zijn verricht. In geval b: pipetteer 1 ml uit het gesuspenderde neerslag, voeg met een doseerpipet 0,083 ml 250-1000 μ M CLINE reagens toe. Pipetteer hiervan na kleurontwikkeling 0,5 ml en voeg 25 ml A.D. toe. Lees af tegen blanko waarmee dezelfde handelingen zijn verricht.

In geval c: Verdun het gesuspenderde neerslag een bekend aantal malen. en ga tewerk als bij b.

Indien er twijfel bestaat of geval a., b. of c. van toepassing is kunnen de drie gevallen gelijktijdig op één monster toegepast worden, van de 12 ml ZnA. oplossing met neerslag is dan 8 ml nodig.

3. Berekening: lees in geval a. de ijklijn voor de range van 40-250 μ M af (zie 3.3), in geval b. en c. de ijklijn voor de range 250-1000 μ M. Deel dit voor 76,92 en men krijgt de hoeveelheid totaalsulfide in de ingewogen hoeveelheid sediment.

3.3. Resultaten en konklusies

CLINE maakt voor de bepaling van sulfide in watermonsters onderscheid tussen vier concentratie gebieden. Iedere range heeft een apart reagens. Voor de twee hoogste concentratiegebieden nl. 50-250 μ M en 150-1000 μ M werd de opbrengst van de destillaties bepaald als functie van de concentratie.

In Fig. 7 geeft de ijklijnen van de direkte bepaling volgens CLINE in 1% ZnAc en die van de destillaties. De waarden van de direkte bepalingen volgens CLINE in 1% ZnAc vertoonden hogere spreidingen dan de bepalingen in A.D, de oorzaak hiervan is onbekend.

Uit Fig. 7 blijkt dat de opbrengst van de destillaties gemiddeld

69 % bedroeg, waarbij moet worden aangetekend dat de bepaling van 41-98 μM beneden de ondergrens van het betrokken concentratiegebied lag, de opbrengst van deze bepaling was slechts 48%. Binnen het concentratiegebied was de opbrengst van de destillaties gemiddeld 73.2%.

In Fig. 8 zijn de opbrengst van de destillaties in het concentratiegebied van 250-1000 μM weergegeven. Laten we bepalingen van 85 en 170 μM buiten beschouwing omdat ze ver beneden de ondergrens van het betrokken concentratiegebied liggen, dan is de opbrengst van de destillaties gemiddeld 93,2% en ligt dus aanzienlijk hoger dan bij 50-250 μM , bovendien zijn de spreidingen geringer zodat de bepaling van sulfide binnen dit concentratiegebied zowel gevoeliger als nauwkeuriger is, het is daarom aan te bevelen het monster sediment zó groot te kiezen dat de overge-destilleerde hoeveelheid sulfide groot genoeg is om binnen de hoogste konzentratierange bepaald te kunnen worden.

In Fig. 9 is de verticale verdeling van het totaal-sulfide weergegeven van een sedimentkern die op 8-1-'75 genomen werd op het Balgzand. Het totaalsulfidegehalte neemt geleidelijk naam beneden toe in de anaerobe laag om vervolgens weer af te nemen in de pyrietlaag. De konzentratie loopt op tot bijna 20 mM per kilo natgewicht sediment.

No	Diepte	Kleur sediment	Σ S/kg sed. in mM
1	oppervlak	geel	0,087
2	vlak boven grenslaag	geel	-
3	grenslaag	geelgrijs	-
4	onder grenslaag	zwart (slikkig)	1,00
5	20 cm	zwart "	10,83
6	30 cm	zwart "	19,48
7	40 cm	grijs (pyriet)	0,668

SANDKVIST (1968) deed in wadprofielen, genomen bij Ameland bepalingen van "acid volatile" totaal sulfide. Bij slikkige monsters genomen in de buurt van mosselbanken vond hij waarden die variëren van 0,05-0,82 mM/Kg (aerobe laag), 2,48-12 mM/Kg (anaerobe laag) en 0,025-0,56 mM/Kg

(pyrietlaag). Bij de omrekening van zijn gegevens in mM/Kg werd er door mij vanuit gegaan dat 1 ml sediment een natgewicht heeft van 1,3 gram.

NEDWELL & FLOODGATE (1972) deden dergelijke bepalingen in een "intertidal sediment" bij Anglesey en vonden aan het oppervlak waarden tot 2 mM , via een regressielijn bepaald verband liep het sulfidegehalte op met waarden variërend tussen 2 en 25 mM/Kg , in de pyrietlaag liep het sulfidegehalte geleidelijk af met waarden variërend tussen 8 en 16 mM/Kg .

Deze gegevens zijn slechts bedoeld als oriëntatie, daar ik niet inga op de wijze van monstername (natgewicht per volume eenheid) van deze auteurs. De monster van NEDWELL & FLOODGATE zijn bovendien in een ander geografisch gebied genomen. In grote trekken/^{komen} de waarden van het Balgzand evenwel goed overeen met de door hen gevonden waarden.

V. ENKELE EXPERIMENTEN MET SULFIDE-GRADIËNTEN

4.1. Inleiding

Het is niet onwaarschijnlijk, dat de autotrofe flora van het wad-sediment een aantal organismen herbergt met een sterke verscheidenheid aan behoefte en tolerantie voor verschillende milieufactoren zoals pH en redoxpotentiaal. KUENEN (1972) beschreef de isolatie van een spiraal, die fysiologisch sterk op *T. thioparus* leek maar een zeer hoge sulfide-tolerantie had. Uit hoofdstuk 2 bleek, dat het voorkomen van thiobacilli van het *thioparus* en het thiooxidans-type (mikroskopische waarneming toonde dat er sprake was van korte, beweeglijke staafjes) met verschillend pH en Eh optimum in de wadmodder niet onmogelijk was.

Het voorkomen van een dergelijke verscheidenheid aan organismen is alleen te verklaren indien we te maken hebben met een sterke inhomogeniteit van het wadsediment, zoals SANDKVIST (1968) stelt:

"It is an important fact that in small localized areas the chemical and microbiological characteristics may differ considerably from those of the environment in general. Therefore, for an understanding of the microbial and pure chemical processes which occur in the tidal sediments the concept of microenvironments rather than that of macroenvironments should be applied in the discussion and interpretation of the phenomena examined". en ZUUR (geciteerd door SANDKVIST) toont met een beschrijving van kleideeltjes met water in de sedimenten van Zuidoostzee aan, dat de vorming van microniches onder dergelijke omstandigheden zeer goed mogelijk is.

Hoe dan ook, in de praktijk is deze microverdeling moeilijk na te gaan, een ongestoorde monstername is onmogelijk en met grote pH en redoxelektrodes komen we er niet achter wat zich binnen een paar centimeters afspeelt. Daarom werd er gezocht naar een eenvoudig model waarmee de abiotische omstandigheden uit het sediment nagebootst konden worden waarin gedragingen van verschillende bacteriën kon worden nagegaan.

Een mengsel van een pH en een redoxindicator voldeed goed om simultaan verschillende toestanden van pH en Eh aan te geven en een onderscheid kon worden gemaakt tussen een geoxideerd basisch (pH 6.5, Eh positief), gereduceerd basisch (pH 6.5 Eh negatief) een gereduceerd zuur (pH 5.7, Eh negatief) milieu, iedere toestand correspondeert met een onderscheidbaar kleur van de gekombineerde redox-pH-indicator.

Zo verwachten we de groei van sulfaatreducerders in een gereduceerd basisch gebied (bij sulfaatreductie stijgt de pH, ROZANOV et al., 1971) de productie van zuur, samen met een neerslag van zwavel is een goede indicatie voor de ontwikkeling van Thiobacillus die indien sulfide als substraat optreedt- ergens op de grens van aeroob-anaeroob moeten verwachten (SOROKIN, 1972). Anaerobe nitraatrespiratie door *T. denitrificans* onderscheidt zich dan door de produktie van zuur en evt. gasvorming in een anaeroob gebied. Door o.m. sulfidegradiënten aan te leggen in media

met slappe agar en de gekombineerde redox-pH-indicator en deze met ophopingen van thiobacilli of interstitieel water te beënten konden sommige verschijnselen, zoals deze zich vermoedelijk in de wadbodem afspelen, nagebootst worden.

4.2. Materiaal en methoden

a. Vertikale sulfidegradiënten

Sterielereageerbuizen werden gevuld met 15 ml. cultuur van *Desulfovibrio desulfuricans* groeiend op FeSO_4 en lactaat in 1% agarmedium. De buizen werden anaeroob onder pyrogallol op wattenpropen geïncubeerd, tot het ontstaan van een zwart FeS neerslag er op wees dat voldoende sulfideproductie was opgetreden (zie voor details het intern verslag van A.v. Kranendonk).

Op de "onderlaag" van sulfaatreduceerders werd vervolgens 20 ml. medium voor de groei van *thiobacillus* gegoten dat als volgt was samengesteld:
 (% g/v) Agar Noble (DIFCO) 0.2%; MgCl_2 0.05%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; K_2HPO_4 0.065%; KH_2PO_4 0.085%; CaCl_2 0.01% NaHCO_3 0.05%; sporenoplossing 1 ml/L;
 Fe-oplossing 1 ml/L, methyleenblauwoplossing (in 70% alcohol) 10 ml/L;
 broomcresolpurper (in A.D.) 30 ml/L. De indicatorswaren op gestandaardiseerde wijze opgelost (zie biochemische handboeken). Het medium werd gekookt totdat de alcoholgeur niet meer waarneembaar was, vervolgens in vier porties verdeeld waaraan al dan niet 2% NaCl en/of 0.2% KNO_3 werd toegevoegd. De media werden 20 min. bij 120°C gesteriliseerd en op een gethermostreerd waterbad tot 40°C afgekoeld. De media werden met 10 volume % beënt met ophopingen van thiobacilli in mineraal medium of met interstitieel water. Interstitieel water werd verkregen door wadmodder over een papierfilter in een büchnertrechter af te filtreren.

De beënte media werden in de reageerbuizen op de onderlaag gegoten en vervolgens werden de reageerbuizen door een wattenprop afgesloten en geïncubeerd. De reageerbuizen werden dagelijks gecontroleerd en van de

resultaten werden dia's en zwartwitfoto's genomen. Groeianden van bacteriën werden gedeeltelijk opgezogen in 1 ml steriele injectiespuiten en microscopisch op zwavelvorming en bacteriën groei gecontroleerd of op agarplaten met medium II (zie aanhangsel) uitgestreken.

b. Zuurstofgradiënten met thiosulfaat als energiebron

Sterielereageerbuizen werden volgegaten met media, die dezelfde samenstelling hadden als onder a., doch 0.4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ als energiebron bevatte. De buizen hadden geen "onderlaag" zoals bij a.

c. Gradiëntplaten

Steriele petrischalen werden schuin gezet en volgegaten met 15 ml desulfovibriokultuur als onder a. De petrischalen werden anaeroob geïncubeerd. Nadat de Desulfovibrio-kultuur voldoende opgekomen was werden de petrischalen horizontaal in een steriele afzuigkast geplaatst en volgegaten met 15 ml medium van de volgende samenstelling:
 NaCl 2%; MgCl_2 0.5%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; K_2HPO_4 0.065%; KH_2PO_4 0.025%;
 Na(H)CO_3 0.05%; CaCl_2 0.01%; Agar Noble 1,2%; Sporenopl. 1 ml./L
 ijzeropl. 1 ml./L, methyleenblauwopl. 5 ml./L, broomcresolpurperopl. 15 ml./L. De gradiëntplaten werden na afkoeling bestreken met interstitieel water met een Drygalsky spatel (een haaks omgebogen glazen staaf).

Ophopingen van thiobacilli werden gemaakt in 200 ml schudkultures van medium II in 300 ml erlenmeyers beënt met wadmodder.

4.3. Resultaten en konklusies

Bij één van de eerste experimenten die werden uitgevoerd werd een agar-medium samengesteld waarin zowel de ontwikkeling van sulfaat-reduceerders als thiobacilli mogelijk was, het medium was voorzien van sulfaat en lactaat in verschillende concentraties om de groei van Desulfovibrio mogelijk te maken en bicarbonaat als anorganische koolstofbron voor de chemosynthese door thiobacilli. Als gekombineerde

indicator werd meth. blauw-neutraalrood gebruikt en de media werden zowel met *Desulfovibrio desulfuricans* als interstitieel water beënt, het medium had een geoxideerd-basische beginsituatie en na drie dagen daalde de redoxpotentiaal in de reageerbuizen door heterotrofe respiratie, uitgezonderd in een dun oppervlaktelaagje, waar de zuurstofdiffusie groot genoeg was om het medium in een geoxideerde toestand te houden. (In buizen waar nitraat aan het medium was toegevoegd daalde de Eh veel minder sterk, doch trad geen gasvorming op). Bovendien daalde de pH en in sommige buizen trad gasvorming op, vermoedelijk doordat CO_2 en azijn-zuur werd gevormd door gistingsprocessen waarbij propionzuurbacteriën betrokken waren. Na ongeveer vijf dagen begon de pH in de reageerbuizen weer te stijgen en na een week trad in sommige buizen zwarting op van FeS , een teken dat ontwikkeling van sulfide door *Desulfovibrio* was opgetreden, de zwarting breidde zich snel uit over de hele buis uitgezonderd een klein laagje aan de oppervlakte. Hoewel in deze gevallen een soort "anaerobe"- en een dunne "aerobe" laag waren ontstaan, was er niets, dat op de ontwikkeling van *Thiobacille* wees, zodat dit experiment behalve een aardig voorbeeld van bacteriële successieweinig concrete gegevens opleverde. In de verschillende buizen, waarin verschillende omstandigheden zoals, al dan niet toevoeging van gistextract en trypticase, Fe^{2+} , nitraat enz. waren aangelegd, trad een veelheid van kleuren en veranderingen op die zeer moeilijk interpreteer waren en als resultaat moeilijk in dit verslag weer te geven zijn, een reden waarom ik gemeend heb niet te diep op dit experiment te moeten ingaan.

a. Vertikale sulfide gradiënten

Bij de eerste experimenten met sulfidegradiënten werd gebruik gemaakt van een gekombineerde indicator, die bestond uit neutraalrood als pH-indicator en methyleenblauw als redox-indicator, de gekombineerde indicator gaf vier goed onderscheidbare kleuren te zien nl. blauw-paars

voor geoxideerd-zuur, groen voor geoxideerd-basisch, rood voor gereduceerd-zuur en geel voor gereduceerd-basisch. Het neutraalrood had echter een pH omslag die al bij pH 7.6 begon en voor het gestelde doel veel te hoog was. Na het steriliseren van een op 7.6 gebufferd medium was de indicator meestal al omgeslagen naar het zure gebied zodat eventuele zuurproductie door bacteriën niet meer waargenomen kon worden. Daarom werd later overgegaan op broomcresolpurper-methyleenblauw dat een gunstiger pH omslaggebied had van 6.5-5.7, het methyleenblauw sloeg om bij een Eh van 0.011 mV bij pH 7, de gekombineerde indicator had een blauwe kleur voor geoxideerd-basisch, groen voor geoxideerd-zuur, violet voor gereduceerd-basisch en geel voor gereduceerd-zuur. Nadat het medium met de gekombineerde indicator op de onderlaag van sulfaatreduceerders was gegoten werd de sulfidediffussie vrijwel direct zichtbaar door het ontstaan van een geoxideerd-gereduceerd grensvlak, dat in ongeveer twee dagen tot boven in de reageerbuizen opschoof. Tijdens het opschuiven van het sulfidefront trad soms aan het grensvlak enige troebeling op, die bij verder opschuiven van het front enkele duidelijk zichtbare banden achterliet. In Fig. 10 is een foto afgebeeld, die gemaakt is tijdens het opschuiven van het sulfidefront. Enkele banden zijn met pijltjes aangegeven. In sommige van deze banden werd een colloïdaal zwavelneerslag gevonden, dat zowel door chemische als bacteriële oxydatieprocessen gevormd zou kunnen zijn, deze banden zijn voor de interpretatie van de verticale verdeling van bacteriën in het wadsediment van geen enkele waarde, omdat zij gevormd zijn tijdens het omhoogschuiven van het sulfidefront en niet tijdens een evenwichtssituatie zijn ontstaan.

Wanneer het sulfidefront het oppervlak van de agar bijna of helemaal had bereikt (afhankelijk van de verschillende experimentele omstandigheden) stelde zich een evenwicht in en ^{schoof de} grenslaag niet verder op. In alle gevallen trad aan het grensvlak of aan het oppervlak intensieve

zwavelvorming op en kon de aanwezigheid van bacteriën door mikroskopische waarneming worden bevestigd. Hoewel door het uitstrijken van de groeibanen op thiosulfaatplaten met broomcresolpurper (medium II, zie aanhangsel) in enkele gevallen kon worden aangetoond dat het hier ging om zuur-producerende bacteriën, vertoonden geen van de banden kleuromslag van de gekombineerde indicator naar het zure gebied. Mogelijk voorkwam de reactie $\text{HS}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{S}$ dat de pH daalde door een konstante toevoer van HS^- ionen van onderaf.

Een serie gradiënten bevatte het in 4.2 beschreven medium + al dan niet NaCl en/of nitraat (% g/v) en was op de volgende wijze beënt:

No	NaCl	KNO_3	Beënt met: (10 vol.%)
1	2%	-	een in schudkultuur opgehoopte thiobacillus
2	2%	-	interstitieel water
3	-	0.2%	reinkultuur van T. denitrificans
4	2%	0.2%	interstitieel water
5	2%	0.2%	5 vol.% als no. 1.5 vol. % als no. 3
6	-	0.2%	idem

Het NaCl is in no. 3 weggelaten, omdat het een niet-mariene stam van T. denitrificans betrof, pogingen om T. denitrificans uit wadmodder te isoleren hebben tot nog toe geen positief resultaat gehad. (TIMMER-TEN HOOR, mond. med).

In Fig. 13 (1 t/m 6) zijn de resultaten van dit experiment schematisch weergegeven, de experimenten 1 t/m 6 werden ieder in viervoud uitgevoerd en hadden hetzelfde resultaat: in buizen 1,5 en 6 trad groei op ong. $\frac{1}{2}$ cm van het oppervlak op, in buis 3 iets lager en in buizen 2 en 4 aan de oppervlakte.

bo = basisch geoxideerd
br = basisch gereduceerd
zo = zuur geoxideerd
zr = zuur gereduceerd

Bij een blanco (onbeënt) experiment schoof het sulfide front op tot $\pm \frac{1}{2}$ cm onder het oppervlak en trad eveneens een zwavelneerslag op.

buis 1: in de band op de grenslaag werden kleine, niet beweeglijke bacteriën waargenomen, een uitstrijk op een thiosulfaatplaat was negatief, maar in een mineraal medium trad zowel zuur- produktie als zwavelvorming op, zodat er hier wel met thio- bacilli te maken hebben. Uit het feit, dat de bacteriën in een laag onder het oppervlak werden waargenomen, kunnen we afleiden, dat hoge zuurstofspanningen niet bevordelijk zijn voor de ontwikkeling van deze bacteriën en we dus een microaerofiele soort te maken hebben. Omdat de ent van buis 1 bestond uit een ophoping uit een schudkultuur (150 rev./min) kunnen we afleiden dat deze (matige) aeratie selecteert op microaerofiele organismen.

buis 2: in deze buis trad groei aan het oppervlak van de agar op, en er werden zeer veel korte dikke bacteriën in deze laag waargenomen. Een uitstrijk op een thiosulfaatplaat gaf groei van kleine speldeknoopkoloniën waarin veel zwavel werd afgezet, ook werd hierbij zuur gevormd. Het vermoeden rees, dat deze bacteriën een grote zuurstoftolerantie hadden. Wordt een krachtig geaereerd (lucht doorborrelen) mineraal medium met deze bacteriën beënt, dan trad zuurproduktie en zwavelvorming op. In een geaereerde kultuur met bacteriën uit buis 1 trad geen zuur of zwavel- produktie op hetgeen inderdaad wijst op een verschil in zuurstoftolerantie van de beide bacteriën.

buis 3: De band met zwavel trad hier iets lager op dan bij buis 1 hetgeen op een grotere zuurstof gevoeligheid van *T. denitrificans* zou kunnen wijzen, dit is op zichzelf niet onmogelijk aangezien *T. denitrificans* als "specialist" onder de thiobacilli in anaeroob milieu kan groeien. Zowel een uitstrijk als een schudkultuur beënt met materiaal uit de band vertoonden zuurproduktie en zwavelneerslag.

Onderin de buis trad enige troebeling op, die blauwgroen van kleur was, hetgeen erop wees, dat ter plaatse van de troebeling de redoxpotentiaal gestegen was t.o.v. het anaerobe gebied er omheen. Er trad geen gasvorming op zodat we kunnen konkluderen dat er in ieder geval geen denitrificatie was opgetreden. Het effect van de nitraattoevoeging vertoonde veel overeenkomst met wat bij een eerder experiment was gevonden (zie het begin van deze paragraaf).

buis 4: Het resultaat leek in alle opzichten sterk op hetgeen bij buis 2 gevonden was. Onder in de buis was een intense troebeling opgetreden, zoals ook in buis 3 was gevonden, de troebeling bevatte dunne kleine bacteriën, de band bovenop bevatte korte dikke staafjes.

buis 5: De band bovenin de buizen 5 en 6 ontstond op dezelfde hoogte als in geval 1. Onder in de buis trad troebeling op.

De resultaten kunnen als volgt in een Tabel worden samengevat:

No.	1	2	3	4	5	6
uitstrijk op een thiosulfaatplaat	-	+	+	+	-	-
groei in schudcultuur (matige aeratie)	+	+	+			
groei in geaereerde cultuur	-	+		+		
NO ₃ in het medium toegevoegd	-	-	+	+	+	+
troebeling onder in buis	-	-	+	+	+	+

b. Zuurstofgradiënten met thiosulfaat als energiebron

Doordat bij het vorige experiment de sulfideconcentratie naar beneden toe in de buizen sterk toenam tot toxische niveau's kon niet worden nagegaan waar de optima van verschillende bacteriën lagen t.a.v. zuurstof, met name in gebieden waar de zuurstofconcentratie zeer laag is. Met het onder 4.2. b beschreven medium konden de gedragingen van deze bacteriën in een zuurstofgradiënt worden nagegaan.

Buizen werden in viervoud beënt met (10 vol%):

1. kultuurmedium van een sterk geaereerde ophoping van bacteriën uit de groeiband van buis 2.
2. kultuurmedium van een in schudcultuur opgehoopte thiobacillus.
3. interstitieel water.

In Fig. 13 (7 t/m 9) zijn de resultaten van dit experiment schematisch weergegeven.

buis 7: groei, zwavelneerslag en zuurproduktie trad uitsluitend op aan het oppervlak van het medium. Dieper in de buis, waar zuurstofdiffusie niet toereikend was, trad reductie van het medium op, vermoedelijk door aanvankelijke respiratie van de geënte bacteriën, die met het medium vermengd waren. Onderin de buis trad echter geen zuurproduktie nog zwavelneerslag op, waaruit we mogen konkluderen, dat groei van de geënte bacteriën alleen aan het oppervlak aan de kolom, -waar de zuurstofconcentratie het hoogst is-, is opgetreden.

We hebben hier dus niet alleen met een zuurstoftolerante, maar ook met een aërofiele thiobacillus te doen.

buis 8 en 9: De buizen die beënt waren met de ophoping uit de schudcultuur waren helaas niet opgekomen, de levensvatbaarheid van dergelijke ophopingen nam in het algemeen snel af als pH van het medium daalde.

De buizen 8 en 9 tonen twee verschillende resultaten van buizen, die met interstitieel water waren beënt.

In buis 8/^{trad}door de gehele buis zuurproduktie op, bovendien waren door de hele buis sluiers van zwavelneerslag te zien. Uit het feit dat in deze buis naar onderen eerst reductie was opgetreden en daarna pas pH-daling moeten we konkluderen dat hier in ieder geval bij een Eh van ± 0 mV groei is opgetreden (0 mV is ongeveer

het redox-omslagpunt van de gebruikte indicator). Deze resultaten komen goed overeen met SOROKIN (1972) die voor microaerfiele thiobacilli in de Zwarte Zee een E_h van 0 tot -30mV opgeeft. In buis 9 trad een duidelijk optimum op onder het oppervlak van het medium. Een dunne "zwavelband" was duidelijk waarneembaar. Opvallend was, dat bij deze experimenten, waarbij thiosulfaat als energiebron werd gebruikt steeds een duidelijke zuurproductie werd waargenomen, dit in tegenstelling met wat bij de sulfidegradiënten werd gevonden.

- c. Gradiëntplaten De gradiëntenplaten werden bestreken met interstitieel water. Er ontstond een gele, vrij brede band (zie Fig. 12), bestaande uit zwavelneerslag en bacteriën. De band eindigde abrupt in het gebied met de hoogste sulfideconcentraties (het donkerste gedeelte van de plaat), hier had kennelijk het sulfide (of een andere zwavelverbinding) een toxische concentraties bereikt.

Algemene konklusies

Uit de beschreven experimenten bleek dat in het interstitiële water zowel chemolithotrofe bacteriën met een optimum en tolerantie voor uitsluitend hoge zuurstofspanningen als bacteriën met een optimum en tolerantie voor uitsluitend lage tot zeer lage zuurstofspanningen voorkomen. Uit het feit, dat de microaerofiele bacteriën niet in een geaëerde kultuur wilden groeien blijkt duidelijk dat deze door teveel zuurstof een groeiremming ondervonden. Zoals in hoofdst. III reeds is vermeld (SOKOLOVA & KARAVAIKO, 1964) hebben thiobacilli van het thioparus-type een uitgesproken voorkeur voor een lage redoxpotentiaal, terwijl het thiooxidans-type juist onder aerofiele omstandigheden voorkomt. Op grond van pH-optima werd in hoofdst. III al verondersteld dat beide types in de wadbodem vertegenwoordigd zijn, terwijl op grond van de gedraging tegenover zuurstof niet het tegendeel blijkt. Waarschijnlijk zijn de

twee typen slechts twee uiterste karikaturen van een grote variatie aan pH en Eh optima die onder de thiobacilli kunnen voorkomen, en zal een breed scala van tussenvormen in de wadmodder vertegenwoordigd zijn.

Daar van boven naar beneden gaande in het wadsediment het zuurstofgehalte afneemt en het sulfidegehalte toeneemt verwachten wij van boven naar beneden gaande, met het afnemen van de redoxpotentiaal een reeks anorganische zwavelverbindingen met steeds lager wordende oxydatietoestand. De thiobacilli met de hoogste zuurstofoptima zullen het meest geoxideerd substraat benutten (b.v. thiosulfaat of zwavel) terwijl de meer microaerofiele bacteriën een meer gereduceerd substraat als sulfide of sulfiet zullen benutten.

Uit de blancoproef met de sulfidegradiënten bleek ook een zwavelneerslag te ontstaan, gevormd door chemische oxydatie, het duurde echter minstens 15x zolang voordat in de onbeënte monsters een zwavelneerslag zichtbaar werd. De chemie van de sulfideoxydatie is echter dermate complex en beïnvloedbaar door allerlei factoren en dermate verweven met de biologische oxydatieprocessen, dat over de relatieve belangrijkheid van beide processen moeilijk iets te zeggen valt. SOROKIN (1972) geeft een efficiëntie op van 20-40% voor de biologische oxydatie, terwijl WHEATLAND (1954) beweert dat de biologische oxydatie onbelangrijk is. Hij vond in monsters van wadmodder die heftig geschud werden (biol. + chem. oxydatie) en in monsters waarin de bacteriën gedood waren (alleen chem. oxydatie) evenveel oxydatie. Het is duidelijk dat onder de door hem beschreven proefomstandigheden de chemische oxydatie sterk bevorderd werd en de biologische oxydatie sterk geremd zou kunnen worden, bovendien verstoorde hij de natuurlijke stratifikatie van het sediment en zal zijn konklusie foutief zijn.

Uit de experimenten bleek tenslotte dat toevoeging van nitraat de anaerobe ontwikkeling van autotrofen stimuleerde, doch in geen der

gevallen trad gasvorming op zodat denitrifikatie door *T. denitrificans* in interstitieel water niet aangetoond kon worden, ook *T. denitrificans* vertoonde geen denitrifikatie, zodat de experimentele omstandigheden waarschijnlijk ongunstig zijn geweest.

WOOLEY et.al. (geciteerd door TAYLOR et.al., 1971) vermeldt dat *T. thioparus* onder aanwezigheid van nitraat in beperkte mate anaeroob kan leven door de reductie van nitraat tot nitriet. Het is mogelijk dat dit proces onder in de buizen de zwavelneerslag en de troebeling heeft veroorzaakt.

VI. DE GROEI VAN DESULFOVIBRIO DESULFURICANS EN THIOBACILLUS SPEC. IN EEN TWEETRAPS CHEMOSTAAT

5.1. Inleiding

Het gebruik van de multistage chemostaat is al geruime tijd bekend (RÍČICA et.al., 1969) en heeft uitgebreide toepassingen gevonden in de industrie en de afvalwaterzuivering.

De laatste tijd worden dergelijke systemen ook toegepast in de studie van de mikrobiële ecologie (JANNASCH & MATELES, 1974) en het leek een interessant experiment om de groei van *Thiobacillus* op de produkten van sulfaatreductie in een tweetraps chemostaat te onderzoeken. In de eerste trap kan *Desulfovibrio* gekweekt worden op lactaat en sulfaat onder stikstof atmosfeer, de afvoer van deze trap wordt dan aan gesloten op een tweede trap waarin door aëratie de groei van thiobacilli mogelijk wordt gemaakt en de aktiviteit van de obligaat anaërobe sulfaatreduceerders wordt onderdrukt en dus de ontwikkeling van thiobacilli onafhankelijk te bestuderen is van de sulfaatreduceerders, die zich in hetzelfde kompartiment bevinden.

KUZNETSOV et al. (zie: SOKOLOVA & KARAVAIKO, 1964) geven een beschrijving van een dergelijk systeem dat onder natuurlijke omstandigheden

funktioneert in zwavelafzettingen in Shor-Su. (zie Fig. 14), tussen harde lagen wordt onder anaerobe omstandigheden petroleum afgebroken door *Desulfovibrio desulfuricans*, wat aanleiding geeft tot een konstante ontwikkeling van H_2S . Bij een breuk in deze harde lagen komt het H_2S houdende water in aanraking met zuurstofrijk oppervlakte water waardoor intensieve ontwikkeling van *T. thioparus* (lage Eh) en *T. thiooxidans* (hogere Eh) optreedt en grote hoeveelheden zwavel in deze lagen worden afgezet.

5.2. Materiaal en methoden

5.2.1. De tweetraps chemostaat

Twee afzonderlijke kontinu-kultures, één met *Desulfovibrio desulfuricans* en één met *Thiobacillus spec.* werden opgezet alvorens deze aan elkaar geschakeld werden. (de opzet van de *Desulfovibrio* kultuur werd uitgevoerd door A.v. Kranendonk, zie voor technische gegevens het door hem geschreven intern verslag).

Het medium voor de thiobacillus-kultuur was verdeeld over 2 tien-liter vaten, uit de beide vaten werd in een 1:1 verhouding medium in het kweekvat gepompt. De samenstelling van de media in beide vaten was als volgt: (% g/v) Vat 1: $NaCl$ 4%; (NH_4) 0.2%; $MgCl_2$ 0.1%; sporenopl. 2 ml./L; Fe^{2+} -opl. 2 ml./L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%; K_2HPO_4 0.13% en KH_2PO_4 0.17%. Het $CaCl_2$ en de fosfaatbuffer werden afzonderlijk in een $\frac{1}{2}$ liter A.D. gesteriliseerd en na afkoeling in vat 1 gegoten.

Vat 2: $Na_2S_2O_3 \cdot 2H_2O$ 1.6%; $Na(H)CO_3$ 0.1%; per litre 2 pilletjes KOH.

Het kweekvat had een volume van 1330 ml. en werd door een koelmantel op $25^\circ C$ gehouden. Op het kweekvat waren aangesloten:

1. Een gasinleidbuis voor de beluchting van de kultuur, de kultuur werd belucht door een regelbare luchtpomp, d.m.v. een waterbarometer kon

gekontroleerd worden of de beluchting konstant bleef.

2. Een pH-elektrode gekoppeld aan een titrator, die d.m.v. een 1 M Na_2CO_3 -oplossing of 1 N HCl de pH van de kultuur op 6.8 hield. De hoeveelheden toegevoegd zuur of carbonaat waren meetbaar met buretten.
3. Een hevel voor monsternamen.
4. Een afsluitbare opening voor het beënten van de kultuur.
5. Een afvoerleiding met een waterslot.
6. Een zuurstofelektrode, een redoxelektrode en een sulfideelektrode verbonden met een recorder. Voor de redox- en de sulfideelektrode werd de bij de pH-elektrode ingebouwde calomelelektrode als referentie gebruikt.

Alle onderdelen waren onderling verbonden door sterilizeerbare slangen en glazen slijpstukken.

De toevoersnelheid van het medium werd regelmatig gecontroleerd door de media uit vat 1 en 2 in buretten te laten lopen en het medium uit deze buretten in de kultuur te pompen.

De extinctie van de kultuur werd regelmatig gemeten bij 430 nm. De zuurstof-opname van de kultuur werd gemeten door de beluchting af te zetten, waarna uit de daling van het zuurstofgehalte in de kultuur het percentage zuurstofopname per tijdseenheid berekend kon worden.

Thiosulfaatbepalingen werden uitgevoerd zoals in hoofdstuk III is beschreven.

Voor eiwitbepalingen werden monsters genomen van 20 ml en afgecentrifugeerd. Het pellet werd twee keer gewassen in fosfaatbuffer en afgecentrifugeerd en vervolgens opgenomen in 2 ml 2N NaOH en gedurende een half uur bij 37°C geïncubeerd. Hierna werd het eiwitgehalte bepaald volgens de microbiureetmethode van GOA (GOA, 1953).

Het sulfaat en lactaatgehalte van de desulfovibriokultuur werd

bij beperking door sulfaat zo ingesteld, dat bij sulfaatreductie ong. 30 mM sulfide gevormd zou worden, een hoeveelheid, die equivalent was aan de 32 mM thiosulfaat, die het medium van de thiobacillus-kultuur bevatte. De toevoersnelheid van de desulfovibrio-kultuur werd iets hoger ingesteld dan de toevoersnelheid van de thiobacilluskultuur voordat de beide kulturen aan elkaar geschakeld zouden worden, dit was gedaan om tussen de beide kulturen een mogelijkheid tot monsternamen uit de desulfovibriokultuur te verkrijgen, zonder dat de steady-state van de desulfovibriokultuur verstoord zou worden. In Fig. 15 is de opstelling schematisch weergegeven. De afvoerslang van het eerste waterslot werd zo geschakeld, dat de koppeling van de beide kulturen zonder oponthoud in mediumtoevoer kon verlopen, zodat de thiobacilluskultuur ineens van thiosulfaat als substraat op sulfide werd overgeschakeld en het effect van deze overgang goed gevolgd kon worden.

5.2.2. Over de ophoping en isolatie van Thiobacillus uit de wadmodder

Omdat geen reinkultuur van een mariene Thiobacillus beschikbaar was moest het betreffende organisme worden opgehoopt en bij voorkeur worden reingekweekt. Vooral dat laatste bleek gepaard te gaan met zeer veel moeilijkheden en dat heeft tot gevolg gehad dat pas aan het einde van de onderzoeksperiode twee reinkulturen verkregen werden.

Aanvankelijk werd begonnen met de ophoping van thiobacilli in medium I en ophopingen uit te strijken op platen die waren samengesteld met hetzelfde medium + 1% gewone agar. Er werden wel thiobacillusachtige kolonien verkregen er trad zeer slechte groei op en vooral bij het overenten van de ene plaat op de andere of op een vloeibaar medium wilden de bacteriën vaak niet meer aanslaan. (Laten ben ik tot het inzicht gekomen dat juist bij de gevolgde methode van ruwe ophopingen in schudkulturen geselecteerd werd op een thiobacillus van het thioparus-

type, die zeer zuurgevoelig is, bij groei van deze organismen op platen neemt de viability snel af door zuurproduktie, wanneer de koloniën zichtbaar worden is de pH plaatselijk vaak al zeer sterk gedaald).

Er zijn vervolgens verschillende pogingen gedaan om medium I te verbeteren. Toevoeging van 13% vit. B12/L bleek geen verbetering van de groei (d.w.z. eerder aanslaan van schudkultures) te geven. Toevoeging van 0.01% CaCl_2 had echter wel positief effect en werd later steeds toegevoegd aan media. Door nog wat veranderingen zoals de wijziging van de Mg/Ca verhouding en verlaging van de pH van het medium tot 6.8 werd uiteindelijk medium "" samengesteld, dat aanzienlijk betere resultaten opleverde, zoals reeds gebleken is uit hoofdstuk III.

Uit pogingen die gedaan waren om met thiosulfaatplaten tellingen van thiobacilli uit te voeren (hoofdstuk III) was al gebleken dat de "gewone" agar onzuiverheden genoeg bevatte om welige heterotrofe groei te veroorzaken. Daarom werd overgegaan tot de aanschaf van DIFCO purified agar en agar Noble, waarvan de laatste een nog hogere zuiveringsgraad bezat dan de eerste. Het verschil was merkbaar, want bij onderzoek met een binoculairmicroscoop werden op Purified Agar, tussen de thiobacillus-speldeknop-kolonien zéé kleine koloniën waargenomen, waarin geen zwavel werd afgescheiden en die kennelijk toch nog van heterotrofen afkomstig waren. Als Agar Noble werd gebruikt werd geen heterotrofe groei meer waargenomen.

Uiteindelijk is het gelukt reinkultures te verkrijgen op medium II voorzien van 1% Agar Noble. De platen werden in de steriele kast geplaatst en onder een binoculairmikroskoop bekeken, met een dunne platinadraad werden de doorgaans zéér kleine koloniën op andere platen overgeënt. Na twee keer overenten werden de kultures op schuine buizen gezet. Uitstrijkjes van deze reinkultures vertoonden geen groei op heterotrofe platen.

Er werden twee typen thiobacilli reïngeweekt: een stam die in een schudcultuur werd opgehoopt en microaerofiel van aard was en een stam die in een krachtig geaëreerde cultuur werd opgehoopt en dus aerofiel was

Tenslotte werd nog nagegaan of toevoeging van 0.01% gistextract en trypticase aan thiosulfaat-agar Noble-platen verbetering van de groei van de reïnkultures zou geven. Dit was niet het geval, er trad noch stimulering, noch remming van de groei op deze platen op, opvallend was echter, dat indien de kulturen niet rein waren, de opgekomen heterotrofe bacteriën de groei van autotrofe thiobacilli volledig onderdrukten.

In het algemeen werden door SANDKVIST (1968) dezelfde praktische moeilijkheden bij de isolatie van autotrofe thiobacilli ondervonden als hierboven zijn vermeld.

5.3. Resultaten en conclusies

Aanvankelijk werden veel vergeefse pogingen ondernomen om de kontinukulture te starten, waarbij werd beënt met ophopingen of vermeende reïnkultures van microaerofiele thiobacilli, die echter allemaal geïnfecteerd bleken te zijn met heterotrofen. Vermoedelijk door de hoge eisen die het thioparus-type aan de redoxpotentiaal en de aeratie stelt, is het niet gelukt op deze wijze de kontinukulture aan de gaan te krijgen.

Pas toen later werd beënt met een ophoping van aerofiele thio-bacilli trad goede groei op en kon een steady-state spoedig bereikt worden. Omdat toen de resterende tijd voor experimenteel werk beperkt was, en nog geen reïnkultuur van deze thiobacillus beschikbaar was, werd in dit geval volstaan met een mengcultuur.

Het bleek dat de maximale aeratie van de cultuur niet toereikend was

om bij hogere verdunningssnelheden te kweken; werd de D hoger dan $0.03 \mu^{-1}$ dan trad zwavelvorming op omdat het substraat dan niet meer volledig geoxideerd werd tot sulfaat.

Voor de koppeling van de beide kulturen werd de D op $0.021 \mu^{-1}$ ingesteld, de registratie van het zuurstofgehalte verliep zonder moeilijkheden, maar bij de registraties van de Eh en het sulfidegehalte traden zeer veel storingen op, die de metingen onbetrouwbaar maakten. De zuurstofopname van de kultuur was proportioneel met de verdunnings-snelheid, en werd de toevoer van het medium stopgezet, dan daalde de zuurstofopname van de kultuur onmiddellijk, hetgeen erop wees, dat de thiosulfaat in de kultuur beperkend was. Bij thiosulfaatbepalingen werd nagenoeg geen thiosulfaat in de kultuur gemeten.

Omdat het volume van het kweekvat van de desulfovibriokultuur ongeveer een vierde bedroeg van dat het kweekvat van de thiobacilluskultuur, werd de D van de desulfovibriokultuur ruim 4x zo hoog ingesteld om op een toevoersnelheid te komen, die voldoende was om de thiobacillus-kultuur te voeden. In de desulfovibriokultuur werd onder steady-state-omstandigheden nog sulfaat gemeten, hoewel het sulfaat in beperkende concentratie aan het medium was toegevoegd, zodat het sulfide gehalte van de outflow van de desulfovibriokultuur waarschijnlijk lager is geweest dan was berekend.

Nadat het zuurstofgebruik, de extinctie van de kultuur en de zuur-produktie/uur gedurende 2 dagen min of meer konstant was gebleven, en in de desulfovibriokultuur een konstant eiwitgehalte werd gemeten werden de beide kulturen aan elkaar geschakeld. Onmiddellijk bleek het noodzakelijk over te gaan tot titratie van zuur in het kultuurvat van de thiobacillustrap omdat de pH steeg door de toevoer van de afvoer van de desulfovibriokultuur waarin de pH 7.4 was tegen een pH van 6.8 in de thiobacilluskultuur.

In Fig 16 is het verloop van de zuurstofopname in de thiobacillus-kultuur weergegeven vanaf 36 uur voor de koppeling van de beide kulturen. Het moment van koppeling is met een pijl aangegeven. Uit de curve blijkt dat direct na de koppeling het zuurstofgebruik in de kultuur sterk gedaald is, ondanks dat plotselinge toevoer van een sterk gereduceerd substraat door chemische oxydatie tot een verhoogde zuurstofopname had moeten leiden. Uit deze gegevens valt af te leiden dat thiobacillus-kultuur niet in staat was van thiosulfaat direct op de oxydatie van sulfide over kon schakelen. Na ongeveer 3 uur begon het zuurstof gebruik sterk te stijgen en daalde het zuurstofgehalte en de redoxpotentiaal in de kultuur. Door mikroskopische waarneming kon bevestigd worden dat deze toename het gevolg was van een explosieve ontwikkeling van heterotrofe organismen, die een hoge respiratieactiviteit ontwikkelden. Tien uur na de koppeling was het eiwitgehalte van de kultuur 340 mg/L, 12 uur later 435 mg/L en 8.5 uur later meer dan een gram per liter. De ontwikkeling van de heterotrofen was mogelijk gemaakt door een grote toevoer van organisch materiaal zoals dode desulfovibriocellen en lactaat in de thiobacilluskultuur.

Op 31 en 73 uur na de koppeling werden schudkulturen met medium II beënt met 2 ml kultuur uit het thiobacilluskweek vat. Zelfs na een maand incubatie kon geen thiobacillusbegroei in deze batchkulturen aangetoond worden, zodat we moeten konkluderen dat de thiobacilluskultuur volledig gedood of uitgespoeld is. Hierna werd de aeratie van de kultuur zeer sterk verlaagd tot ± 2 luchtballen per seconde om de gelijktijdige aanwezigheid van sulfide en zuurstof mogelijk te maken. De kultuur werd opnieuw beënt met 600 ml van een ophoping van microaerofiele bacteriën (dit gebeurde op $t=74$). Direct daarna, op $t=100$ en $t=122$ werden opnieuw schudkulturen beënt met kultuurmedium en kon alle gevallen de groei van thiobacilli aangetoond worden. Hier na werd de opstelling

afgebroken. Uit $x_t = x_0 e^{-Dt}$ kunnen we berekenen dat 48 na het beënten van de kultuur met de microaerofiele kweek nog minimaal 36.5% van de oorspronkelijke hoeveelheid (indien geen groei was opgetreden) cellen aanwezig moet zijn geweest. Een hoeveelheid van 36% van de beënte hoeveelheid kan nog heel goed een positieve aktiviteitsbepaling op $t=122$ opgeleverd hebben, zodat we slechts kunnen konkluderen dat de viability van de geënte thiobacilluskultuur niet omlaag is gegaan.

In het algemeen kunnen we stellen, dat de resultaten van dit experiment niet overtuigend zijn en dat het geen zin zou hebben om een dergelijk experiment te herhalen in dien geen reinkultures van thiobacillus voorhanden zijn.

Daar de gelijktijdige aanwezigheid van hoge zuurstof- en sulfide-koncentratie elkaar uitsluiten is het zeer waarschijnlijk dat een aerofiele thiobacillus niet in een homogeen systeem als de chemostaat op sulfide te kweken is. Ook voor een microaerofiele stam is dat de vraag en worden zeer hoge eisen gesteld aan de regulering van de zuurstof-toevoer om een gelijktijdige aanwezigheid van sulfide en zuurstof- zoals door SOROKIN (1972) werd beschreven- te waarborgen.

Een organisme als *Thiovulum* sp. ter vergelijking, welke slechts te kweken is bij gelijktijdige aanwezigheid van sulfide en zuurstof is slechts te kweken in een systeem waarvan de heterogeniteit plaatselijk de aanwezigheid aan sulfide en zuurstof mogelijk maakt, pogingen om het organisme in een chemostaat op sulfide te kweken hebben geen resultaat gehad. (LA RIVIERE; JANNASCH et. al., zie JANNASCH & MATELES, 1974).

VII. LITERATUUR

- BANSEMER, K., 1970. Die H_2S -Bildung in iener Vertiefung der Kieler Innenförde. proefschrift. Kiel.
- BUDD, M.S. & H.A. BEWICK, 1952. Photometric Determination of Sulfide and Reducible Sulfur in Alkalies, *Anal. Chem.* 24 (10): 1536-1540.
- CADEE, G.C. & J. HEGEMAN, 1974. Primary production of the benthic microflora living on tidal flats in the Dutch Wadden Sea. *Neth. J. of Sea Res.* 8 (2-3): 260-291.
- CLINE, J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. & Oceanogr.* 14 (3) 454-456.
- FERGUSON WOOD, E.J., 1972. Ecology of Bacteria in Estuarine Systems. The geol. soc. of America, Inc. Memoir.
- FOGO, J.K. & M. POPOWSKY, 1949. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *An. Chem.* 21 (6): 732-734.
- GOA, J., 1953. *Klin. Scand. J. of Lab. inv.* 5, 218-222.
- GROENENDAAL, M. NIOZ-intern verslag 1974.
- JANNASCH, H.W. & R.I. MATELES, 1974. Experimental Ecology Studies in Continuous Culture. *Adv. in Micr. Phys.* vol. 11: 165-212.
- JOHNSON, C.M. & H. NISHITA, 1952. Microestimation of Sulfur. *An. Chem.* 24 (4): 736-742.
- JORGENSEN, B.B. & T. FENCHEL, 1974. The Sulfur Cycle of a Marine Sediment Model System. *Mar. Biol.* 24 (3): 189-201.
- KUENEN, J.G., 1972. Een studie van kleurloze zwavelbacteriën uit het Groninger wad. proefschrift, Groningen.
- NEDWELL, D.B. & G.D. FLOODGATE, 1972. The Effect of Microbial Activity upon the Sedimentary Sulphur Cycle. *Mar. Biol.* 16 (3): 192-200.
- POSTGATE, J.R., 1963. The Examination of Sulphur Auxotrophs: A. Warning. *J. gen. Micr.* 30: 481-484.
- RICICA, J., 1969. Multi-stage Systems, in *Method in Microbiology II* (Norris & Ribbons eds). Academic Press London, 329-348.
- ROY, A.B. & P.A. TRUDINGER, 1970. The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur. Cambridge University Press.
- ROZANOV, A.G., I.I. VOLKOV, N.N. ZHABINA & T.A. YAGODINSKIY, 1971. Hydrogen Sulfide in the Sediments of the Continental Slope, Northwest Pacific Ocean. *Geoch. Int.* 1971, Trans. from Geokhimiya 5: 543-550.
- SANDKVIST, A., 1968. Microbiological investigation of modern Dutch tidan sediments. *Stockholm contributions in Geology* vol. XV: 5.

- SOKOLOVA, G.A. & G. I. KARAVAIKO, 1964. Physiology and Geochemical Activity of Thiobacilli. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem 1968.
- SOROKIN, Y.I., 1972. The bacterial population and the processes of hydrogen sulphide oxidation in the Black Sea. J. Cons. Int. Explor. Mer. 34 (3): 423-454.
- STRAUSS, G. & W.J. NICKERSON, 1961. J. Am. Chem. Soc. 83: 3187-3197.
- TAYLOR, et. al., 1971. Thiobacillus denitriticans as an obligate chemolithotroph, Isolation and growth studies. Arch. Microbiol. 78: 193-204.
- TUTTLE, J.H., F.E. HOLMES & H.W. JANNASCH, 1974. Growth Rate Stimulation of Marine Pseudomonads by Thiosulfate. Arch. Microbiol. 99 : 1-14.
- TUTTLE, G. & H.W. JANNASCH, 1973. Sulfide and Thiosulfate-Oxidizing Bacteria in Anoxic Marine Basins. Mar. Biol. 20: 64-70.
- TUOVINEN, O.H. & D.P. KELLY, 1972. Studies on the Growth of Thiobacillus ferrooxidans. Arch. Microbiol. 88: 285-289.
- VOSJAN, J.H., 1975. Ecologische en fysiologische aspecten van bacteriële sulfaatreductie in het Waddengebied. proefschrift. Groningen.
- WHEATLAND, A.B., 1954. Factors affecting the formation and oxidation of sulphides in a polluted estuary. J. of Hygiene 52 (2): 194-210.
- WIEBE, W.J., 1971. Perspectives in Microbial Ecology. In: Fundamentals of Ecology. (E.P. Odum) W.B. Saunders comp. Philadelphia. London. Toronto.

AANHANGSEL

Medium 1. (%g/v)

NaCl 2%

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4%

$\text{Na}(\text{H})\text{CO}_3$ 0.1%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

K_2HPO_4 0.05% pH met KH_2PO_4 op 7.3 gebracht.

Sterilisatie gebeurde door filtratie over een 0.15 μ -filter.

Zuurvorming in het medium kon worden aangetoond door 2 ml/L

broomcresolpurper toe te voegen.

Voor platen werd 1% agar toegevoegd, na opkoken werd het medium

20 min. bij 120°C gesteriliseerd.

Medium 2.

NaCl 2%

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4%

$\text{Na}(\text{H})\text{CO}_3$ 0.05%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%

MgCl_2 0.05%

K_2HPO_4 0.065%

KH_2PO_4 0.085%

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%

sporenopl. 1 ml/L

Fe^{2+} -opl. 1 ml/L

De thiosulfaat werd altijd opgelost nadat de sporenoplossing en het bicarbonaat toegevoegd waren.

Het medium werd gedurende 20 min. bij 120°C gesteriliseerd, het CaCl_2 en de fosfaatbuffer werden ieder afzonderlijk gesteriliseerd.

Voor het aantonen van zuurvorming in vloeibare media of platen werd 2 ml/L broomcresolpurper toegevoegd.

Voor platen werd 1% Agar Noble (DIFCO) toegevoegd, na opkoken werd het medium 20 min. bij 120°C gesteriliseerd.

Tabel I

Verband tussen entingsdichtheid en t_{50} , de tijd die nodig is om helft van de thiosulfaat te doen verdwijnen. Wadmodder NIOZ-haven; Medium I.

Entingsdichtheid in g. per 200 ml medium	t_{50}
10.041	68
5.087	66
3.045	77
2.012	117
1.588	83
1.006	75
0.52135	98
0.09679	219
0.05086	1340
0.01321	2120

Tabel II

Verband tussen diepte in sediment en thiosulfaatoxidatie aktiviteit.
Balgzand, medium I; 0,5 gram, respectievelijk 1 gram 9-5-1974 en
31-5-1974; wadmodder /200 ml medium; alle waarden berekend op 1 gram
per 200 ml medium.

Ent. (g)	Diepte (cm)	t ₅₀ (u)	Aktiviteit in g.	
0.5	0-0.7	253	0.190 (1.135 , 0.032)	(aerobe laag)
	5	370	0.120 (0.747 , 0.019)	
	10	~ 2000	0.054 (0.36 , 0.0078)	
	15	~ 2000	0.054 (0.36 , 0.0078)	
	20	340	0.131 (0.81 , 0.021)	
	25	254	0.188 (1.13 , 0.031)	
	30	259	0.183 (1.10 , 0.030)	
	35	176	0.384 (2.19 , 0.067)	
1.0	0-0.7	64	≥ 6.789 (41.96 , 1.098)	(aerobe laag)
	0.7-1.5	166	0.202 (1.15 , 0.035)	
	1.5-2.5	142	0.294 (1.65 , 0.052)	
	5	154	0.240 (1.36 , 0.042)	
	7	174	0.183 (1.05 , 0.032)	
	11	169	0.195 1.11 , 0.034)	
	21	134	0.343 (1.91 , 0.061)	
	31	354	0.0628(0.39 , 0.010)	
	39	141	0.299 (1.68 , 0.053)	

Tabel III

Verband tussen thiosulfaat oxiderende aktiviteit en entings-
dichtheid. Wadmodder NIOZ-Haven; Medium II

Ent. (g)	t_{50}	t_{80}	t_{Δ} (u)
15.0	52	56	4
12.5	52	56	4
10.0	52	56	4
7.50	52	56	4
5.00	52	56	4
2.50	54	64	10
1.00	70	75	5
0.749	58	67	9
0,513	70	78	8
0,249	83	96	13
0.107	112	135	23
0.0760	108	136	28
0.0516	153	322	169
0.0254	136	284	148
0.0102	136	307	171

50%	$\ln g = 454$	$t_{50}^{-1} - 6.849$	$r = 0.962$
80%	$\ln g = 404$	$t_{80}^{-1} - 5.297$	$r = 0.973$
Δ	$\ln g =$	$22.49(t_{80} - t_{50})^{-1} - 3.360$	$r = 0.945$

Tabel IV

Verband tussen thiosulfaat oxiderende aktiviteit en entings-
dichtheid. Wadmodder NIOZ-Haven; Medium II. De waarden tussen haakjes
zijn door extrapolatie van de thiosulfaatconsumptie-kurven verkregen.

Ent. (g)	t_{50}	t_{80}	t_{Δ} (u)
15	(40)	46	6
15	(42)	49	7
15	43	50	7
2.5	42	57	15
2.5	46	68	22
1.0	56	66	10
1.0	51	68	17
0.75	56	69	13
0.75	68	148	80
0.75	51	69	17
0.50	(51)	77	26
0.50	62	107	45
0.50	52	71	19
0.251	59	98	39
0.258	(59)	102	43
0.251	69	151	82
0.103	64	112	48
0.102	85	175	90
0.104	72	166	94
0.07705	76	86	10
0.0785	68	148	80
0.0783	101	136	35
0.05667	79	148	69
0.05691	68	137	69
50%	$\ln g = 385.88 t_{50}^{-1} - 7.426 \quad r = 0.908$		
80%	$\ln g = 318.49 t_{80}^{-1} - 4.484 \quad r = 0.898$		
Δ	$\ln g = 29.65(t_{80} - t_{50})^{-1} - 2.277 \quad r = 0.794$		

Tabel V

Verband tussen thiosulfaat oxiderende aktiviteit en entingsdichtheid. Wadmodder NIOZ-Haven; Medium II. De waarden tussen haakjes zijn door extrapolatie van de thiosulfaatconsumptiecurven verkregen.

Ent. (g)	t_{50}	t_{80}	t_{Δ} (u)
2.545	68	74	6
2.825	63	65	2
0.988	51	61	10
1.305	63	65	2
0.583	45	59	14
0.648	42	66	24
0.246	63	112	49
0.231	(62)	95	33
0.127	(58)	66	8
0.115	(62)	100	38
0.0647	(62)	97	35
0.0770	(73)	87	14
0.0806	70	119	49
0.0542	82	95	13
0.0565	(70)	100	30
0.0500	69	80	11
0.0306	(70)	105	35
0.0254	84	97	13
50%	$\ln g = 254.27 t_{50}^{-1} - 5.720 \quad r = 0.523$		
80%	$\ln g = 381.84 t_{80}^{-1} - 6.317 \quad r = 0.713$		
Δ	$\ln g = 6.47 (t_{80} - t_{50})^{-1} - 2.363 \quad r = 0.630$		

Tabel VI

Verband tussen de diepte in het sediment en de Thiobacillus aktiviteit.
Alle waarden zijn berekend op een entingsdichtheid van 1 gram. De
getallen onder t_{50} zijn door extrapolatie verkregen.

Mon- ster	Ent (g)	Diepte (cm)	t_{50} (u)	Activiteit $t_{50}(g)$	t_{80}	Activiteit $t_{80}(g)$
1	0.5	0	133	0.064(0.29 , 0.014)	210	0.069(0.25 , 0.018)
	1	1	84	0.23 (1.02 , 0.056)	127	0.12 (0.42 , 0.033)
	1	1.5	123	0.086(0.39 , 0.019)	>280	<0.042(0.16 , 0.011)
	1	2.5	(74)	0.496(2.10 , 0.169)	99	0.297(1.04 , 0.085)
	1	3.5	85	0.22 (0.96 , 0.052)	139	0.092(0.33 , 0.026)
	1	4.2	68	0.85 (3.62 , 0.20)	106	0.227(0.80 , 0.065)
	1	5.3	>190	<0.011(0.057, 0.0024)	>280	<0.021(0.080, 0.006)
	1	14	200	0.010(0.050, 0.0020)	245	0.026(0.098, 0.007)
	1	23.5	64	1.297(5.52 , 0.30)	124	0.13 (0.46 , 0.037)
	1	35	>190	<0.012(0.056, 0.002)	>280	<0.021(0.080, 0.006)
2.	0.1	0	>280	<0.053(0.27, 0.014)	>280	<0.21 (0.80, 0.056)
	0.5	1	94	0.27 (1.16, 0.062)	>280	<0.042(0.16, 0.011)
	0.1	1.5	280	0.05 (0.28, 0.014)	>280	<0.21 (0.80, 0.056)
	0.5	2.5	(78)	0.72 (3.08, 0.10)	118	0.31 (1.09, 0.087)
	0.5	3.5	137	0.06 (0.27, 0.013)	177	0.098(0.36, 0.027)
	0.5	4.2	84	0.48 (2.04, 0.11)	137	0.091(0.68, 0.053)
	0.5	5.3	120	0.094(0.42, 0.020)	146	0.16 (0.37, 0.044)
	0.5	14	125	0.080(0.37, 0.018)	>280	<0.042(0.16, 0.011)
	0.5	23.5	93	0.28 (1.22, 0.065)	280	0.042(0.16, 0.011)
	0.5	35	>190	<0.023(0.11, 0.004)	280	0.042(0.16, 0.011)

Minimum lagfase 10 g 55 uur (50%) en 58.5 (80%)

Aktiviteit: 50% 4.15(18.1 , 0.95)
80% 5.02(18.0 , 1.40)

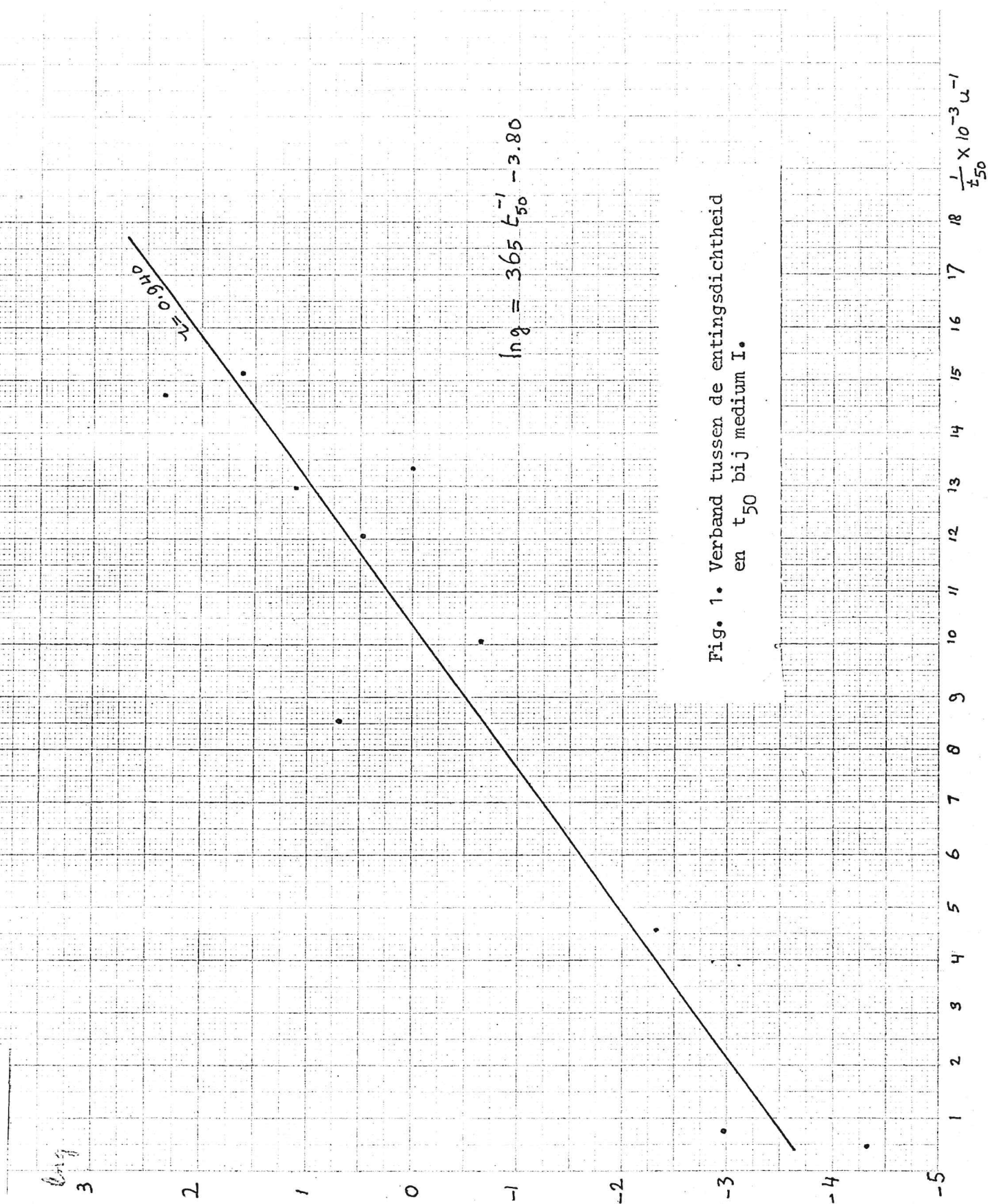


Fig. 1. Verband tussen de entingsdichtheid en t_{50} bij medium I.

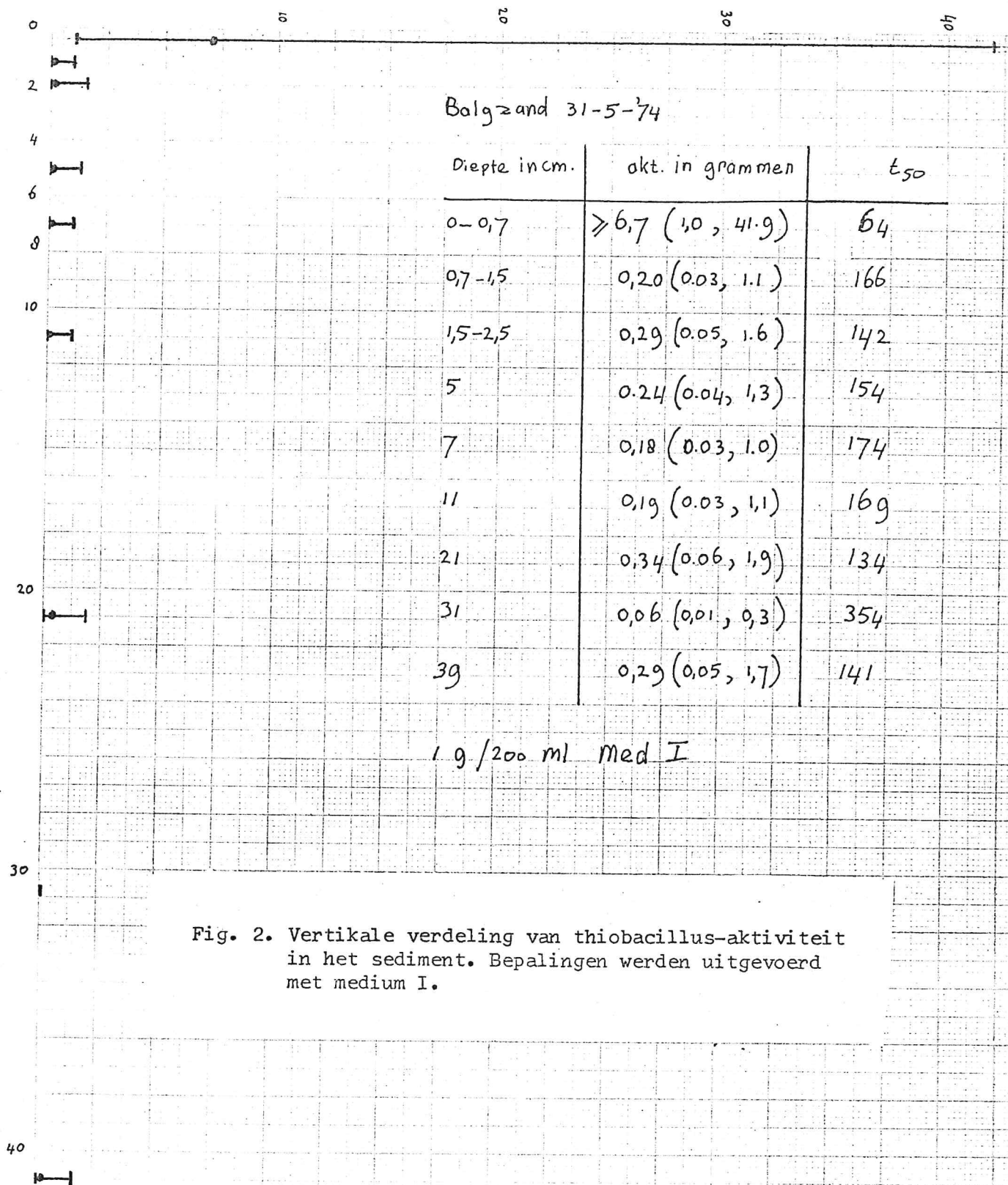


Fig. 2. Vertikale verdeling van thiobacillus-aktiviteit in het sediment. Bepalingen werden uitgevoerd met medium I.

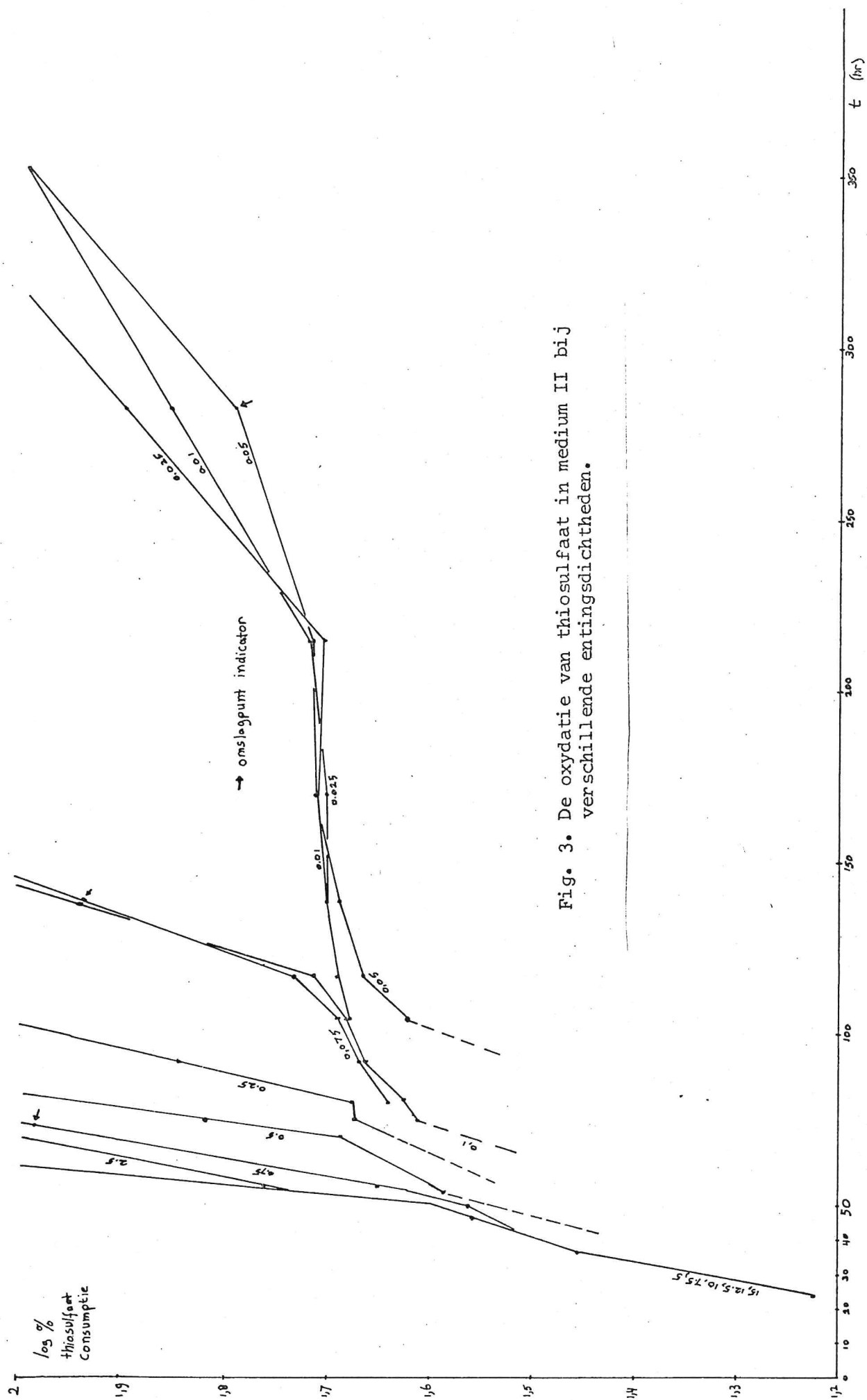
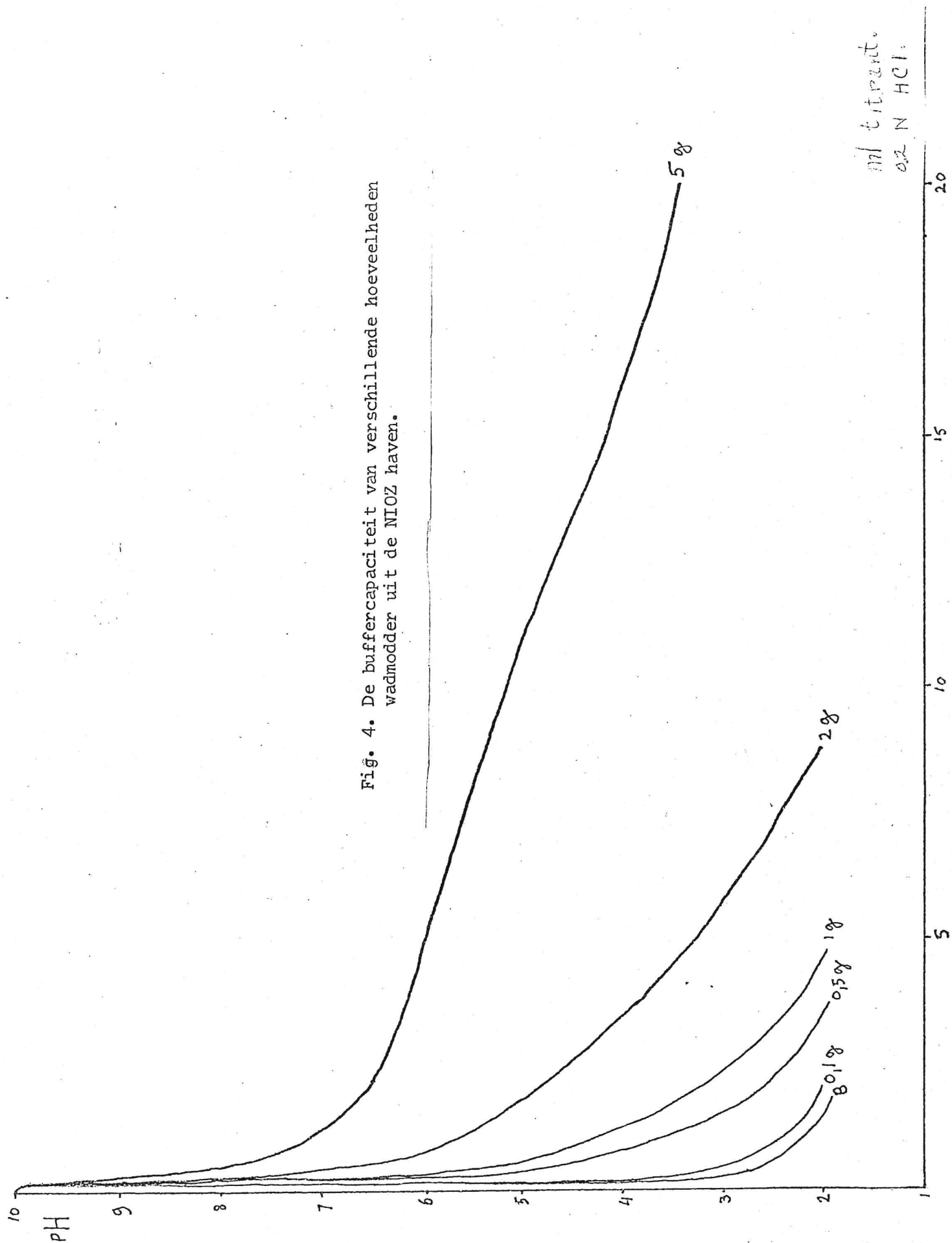


Fig. 3. De oxydatie van thiosulfaat in medium II bij verschillende entingsdichtheden.



$$\text{med I } \ln g = 365 t_{50}^{-1} - 3.80$$

$$\text{med II } \ln g = 454 t_{50}^{-1} - 6.84$$

$$\text{med II } \ln g = 404 t_{80}^{-1} - 5.29$$

$$\text{med II } \ln g = 22(t_{80} - t_{50})^{-1} - 3.36$$

Fig. 5.

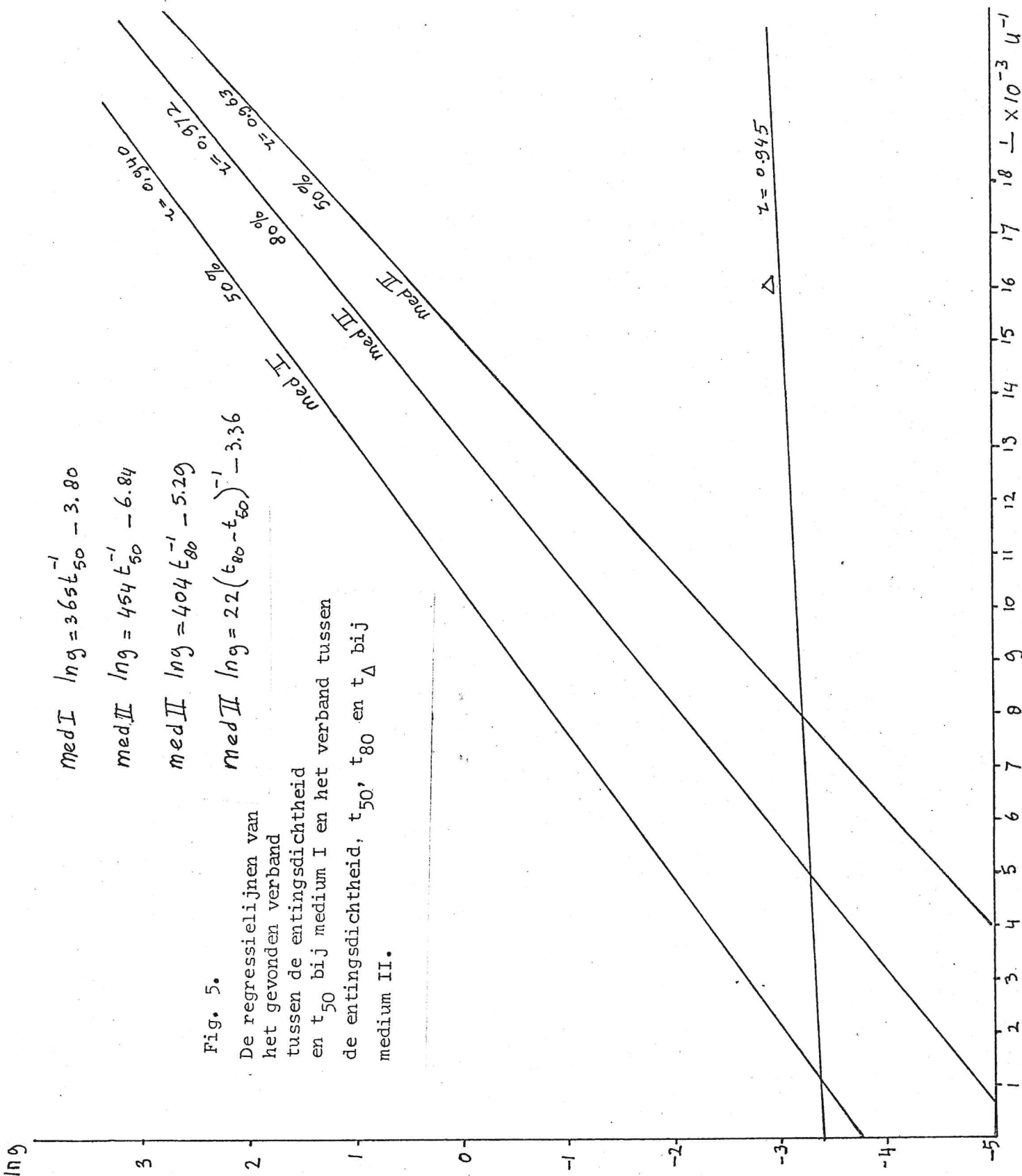
De regressielijnen van het gevonden verband

tussen de entingsdichtheid

en t_{50} bij medium I en het verband tussen

de entingsdichtheid, t_{50} , t_{80} en t_{Δ} bij

medium II.



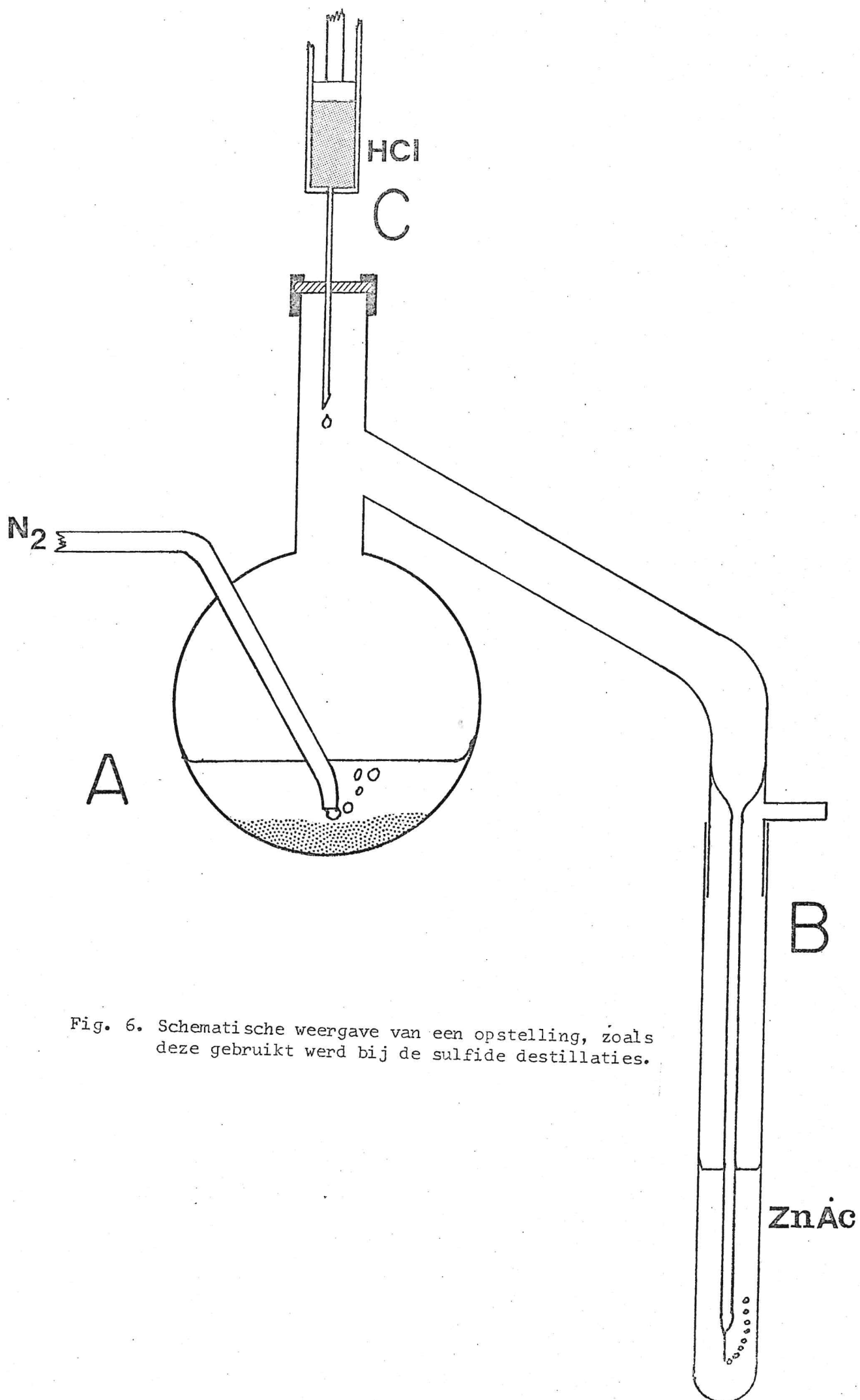
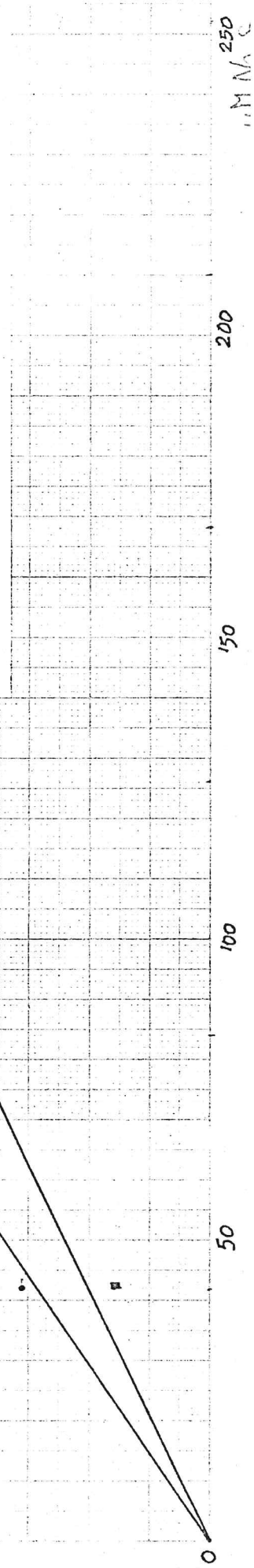


Fig. 6. Schematische weergave van een opstelling, zoals deze gebruikt werd bij de sulfide destillaties.

50-250 μ M

conc	E_{680} Cline 1% ZnAc	E_{680} Dest 1% ZnAc	opbrengst %
41,98	0,077	0,037	48
83,96	0,132	0,104	78
125,94	0,201	0,129	64
167,92	0,305	0,179	64
209,91	0,344	0,255	74
251,89	0,382	0,332	86

Fig. 7. De ijklijnen van de directe sulfidebepalingen volgens CLINE en de destillaties in de range van 50-250 μ M. Na_2S $\circ$ = directe bepalingen ; $\square$ = destillaties.



E670

250-1000 μ M.

conc.	E ₆₈₀ Cline 1% ZnAc	E ₆₈₀ Dest. 1% ZnAc	opbrengst %
85	0,036	0,020	55
170	0,069	0,028	40
340	0,126	0,113	89
510	0,184	0,174	94
850	0,302	0,290	96
1020	0,390	0,368	94

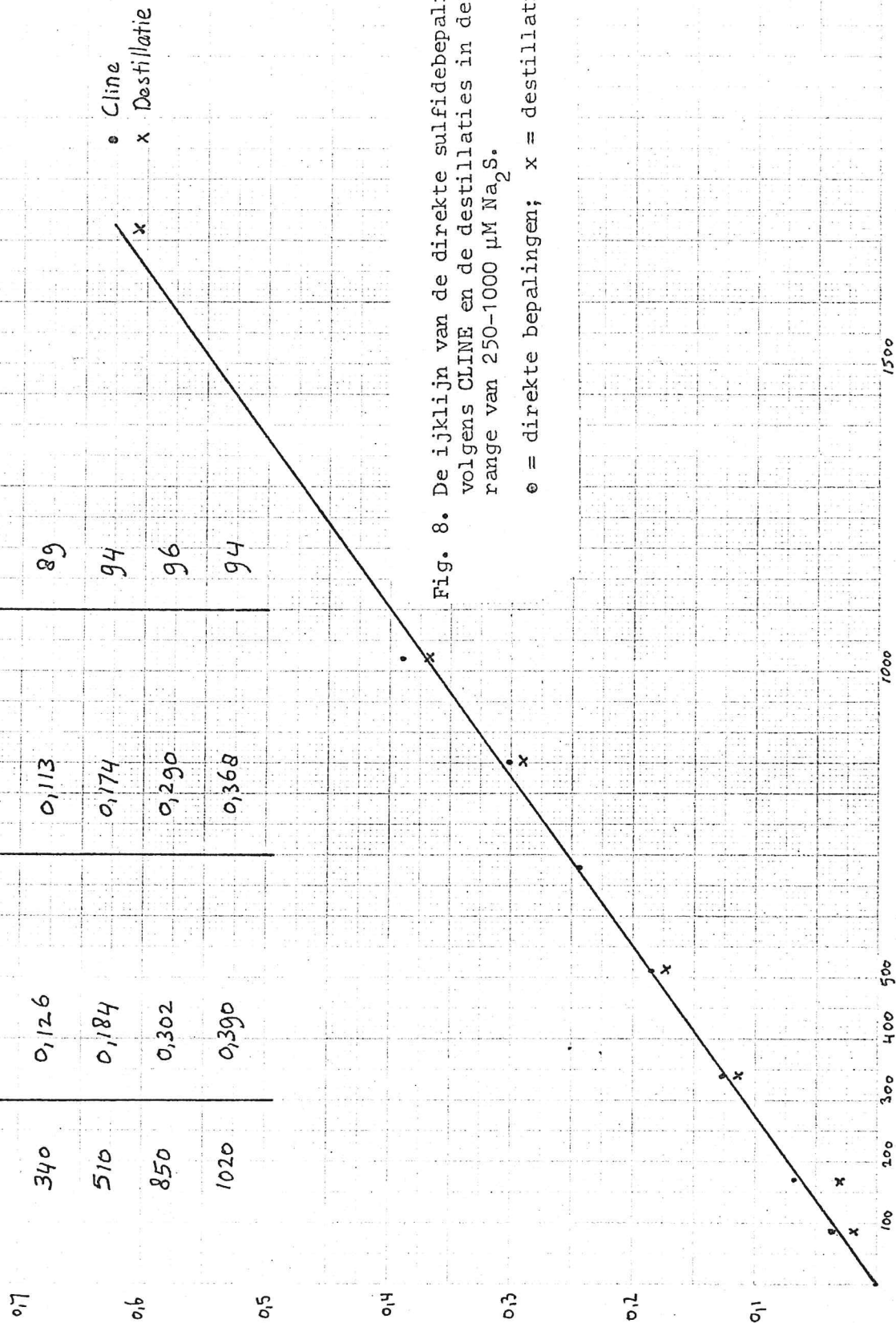


Fig. 8. De ijklijn van de direkte sulfidebepalingen volgens CLINE en de destillaties in de range van 250-1000 μ M Na₂S.

• = direkte bepalingen; x = destillaties.

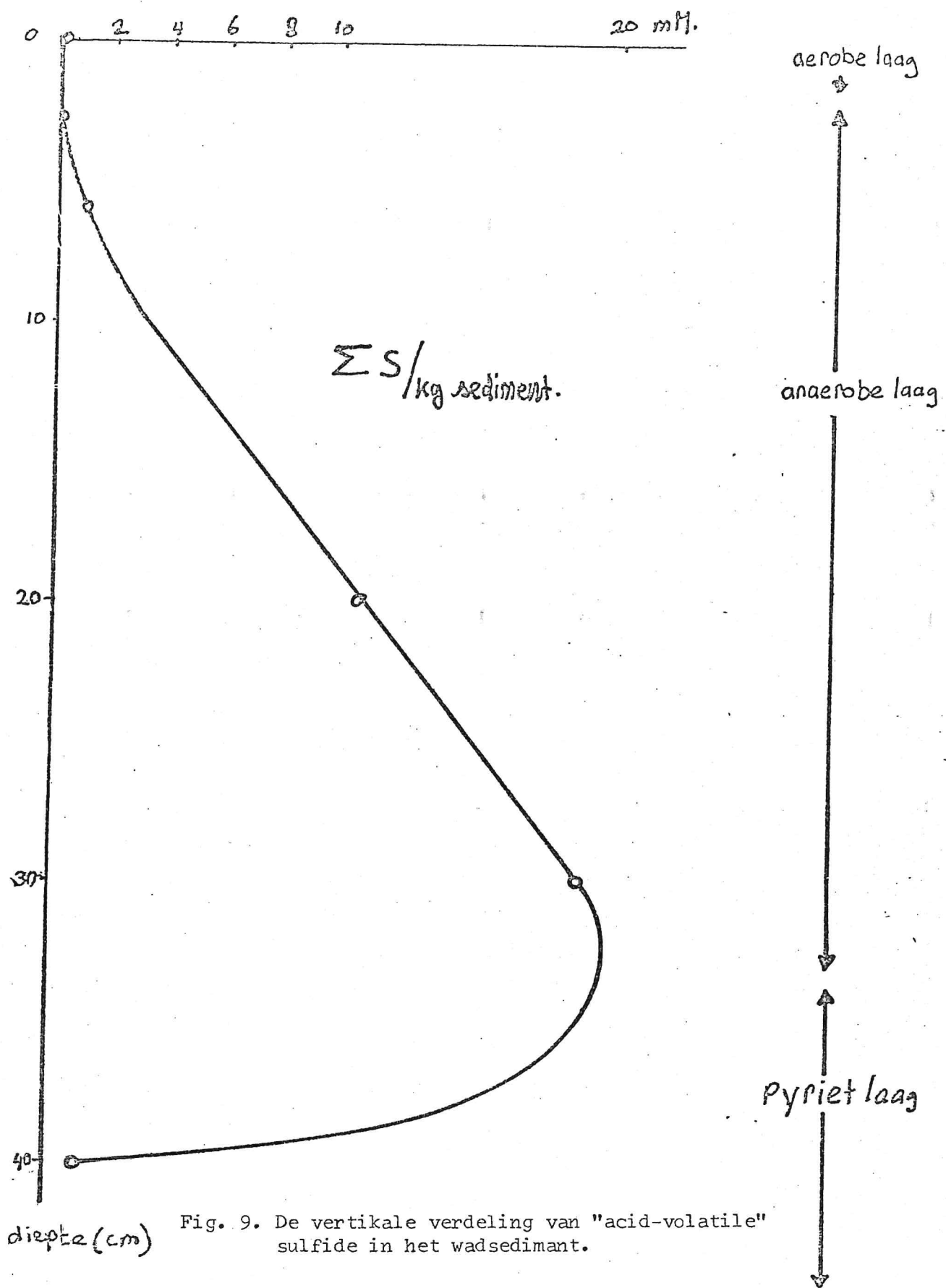


Fig. 9. De verticale verdeling van "acid-volatile" sulfide in het wadsediment.

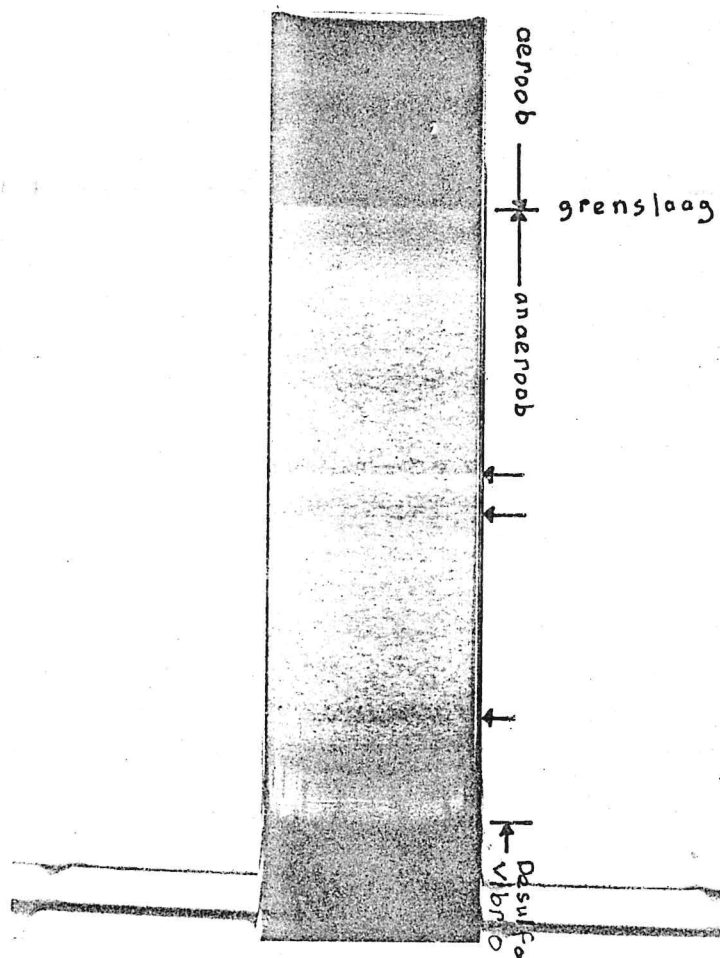


Fig. 10. Het ontstaan van banden bij de ontwikkeling van een sulfidegradiënt in een medium met de gekombineerde indicator.

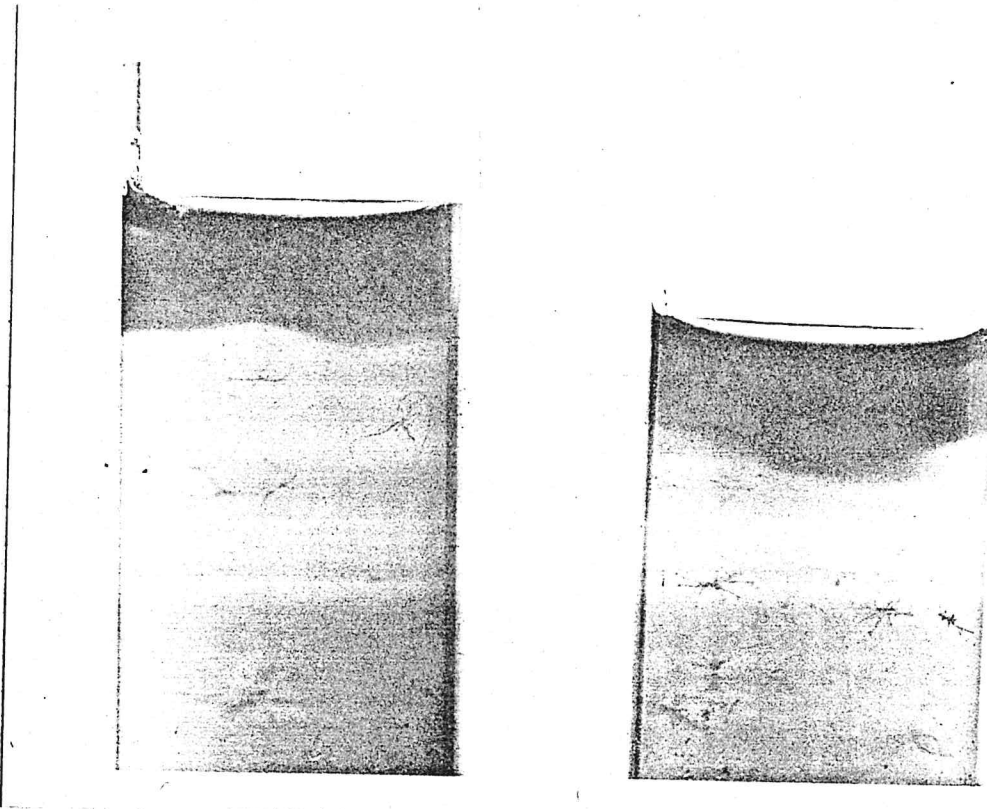


Fig. 11. Detail opname van de aëroob-anaërobe grenslaag.

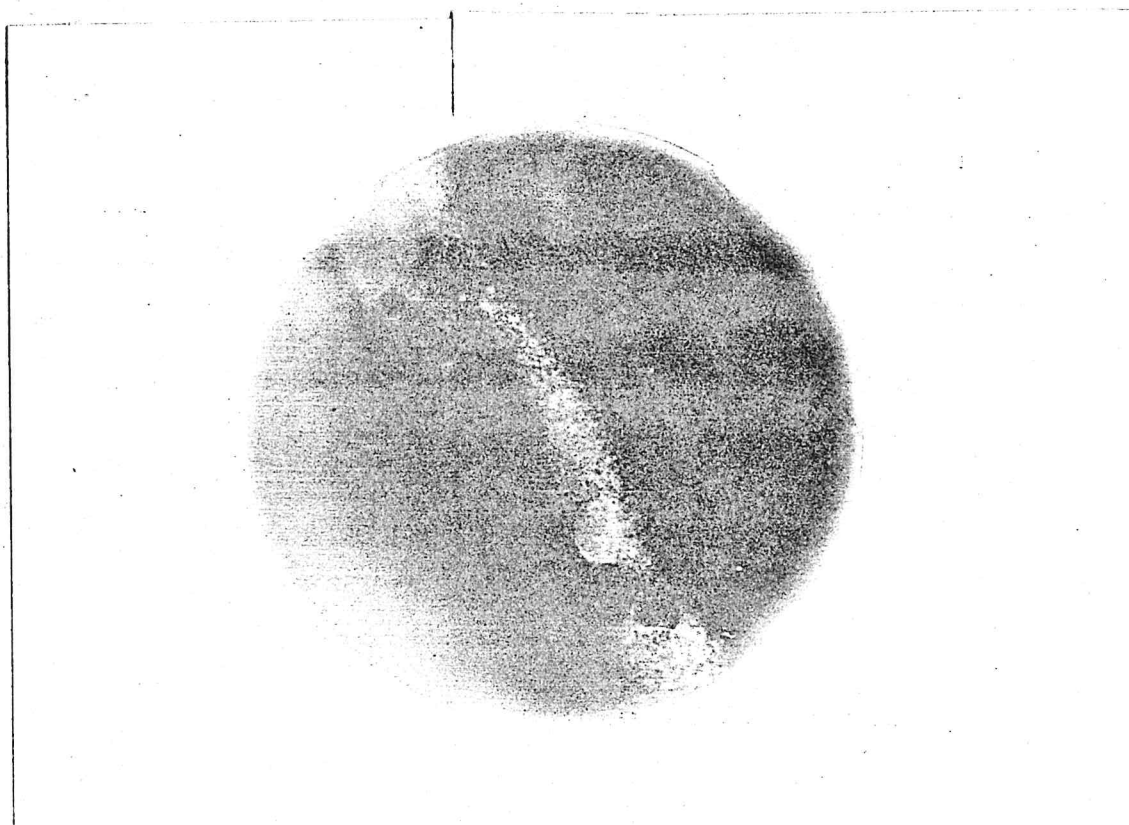
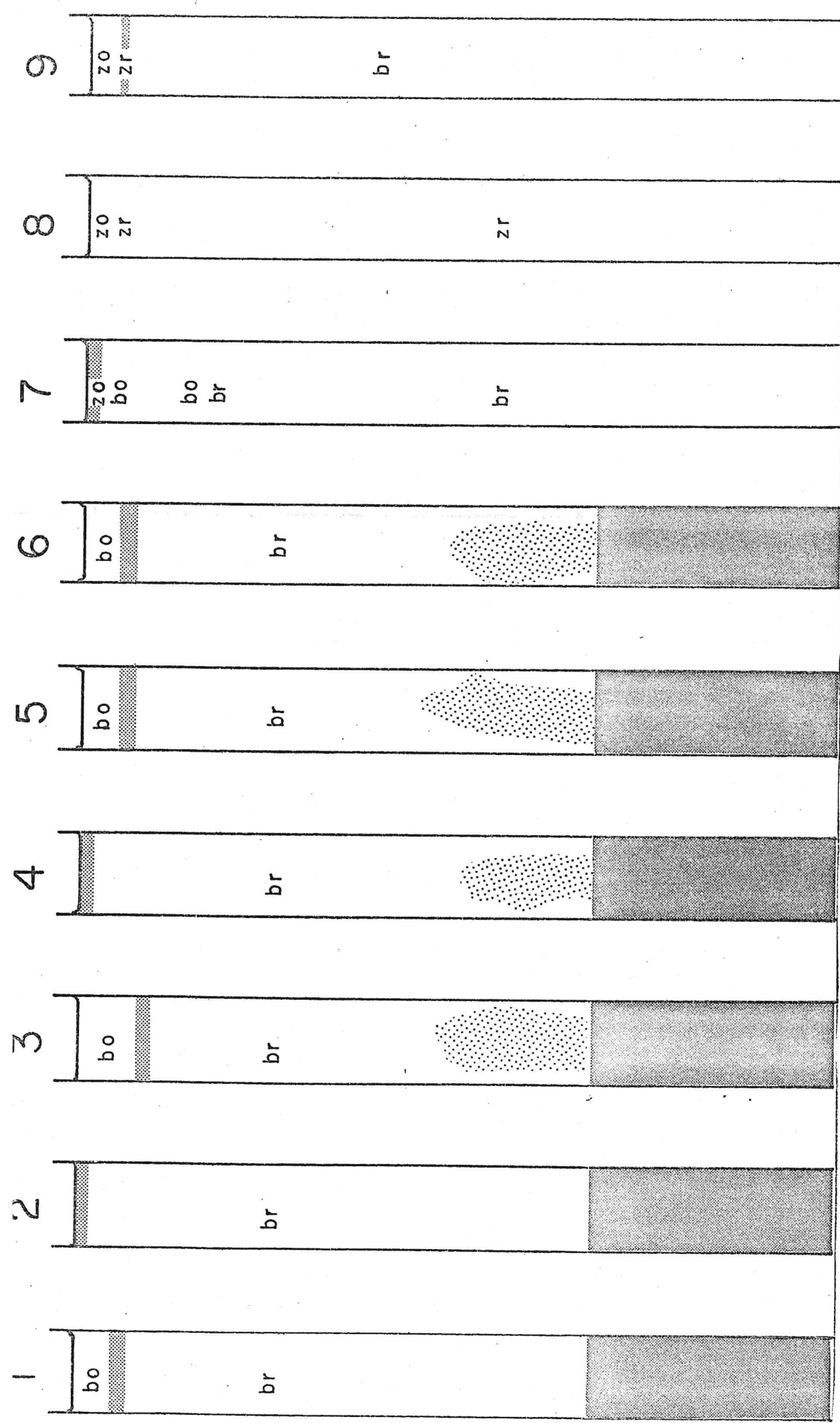
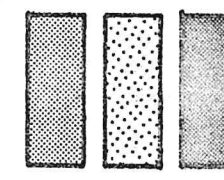


Fig. 12. De ontwikkeling van thiobacillus op een gradiëntplaat.



= zwavelneerslag en groei van bacteriën
 = troebelings
 = onderlaag Desulfovibrio



bo = basisch geoxideerd
 br = basisch gereduceerd
 zo = zuur geoxideerd
 zr = zuur gereduceerd

bo
 br
 zo
 zr

Fig. 13.
 Schematisch overzicht
 van de experimenten met
 sulfide en zuurstof-
 gradiënten.

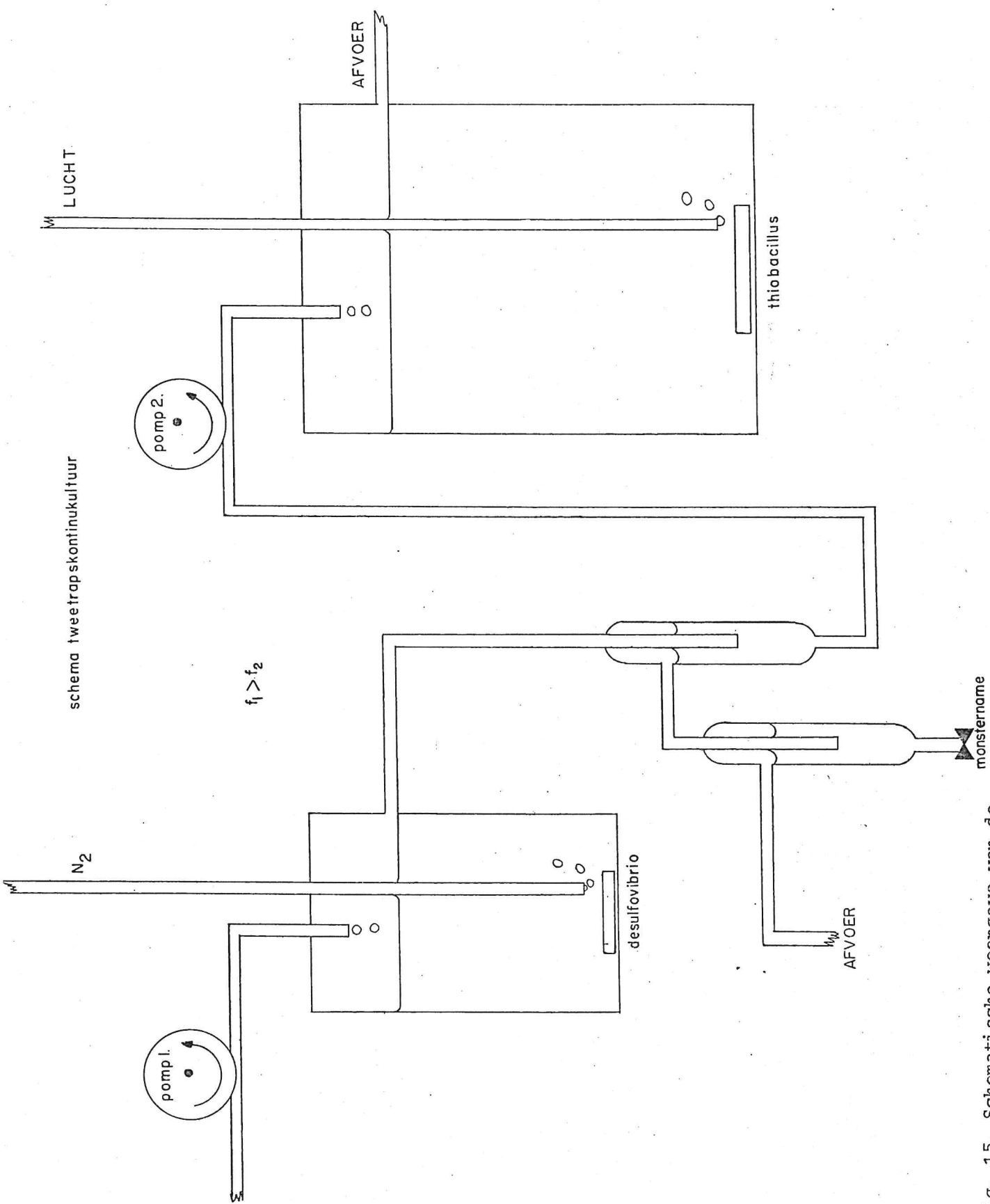


Fig. 15. Schematische weergave van de tweetraps kontinu kulture.

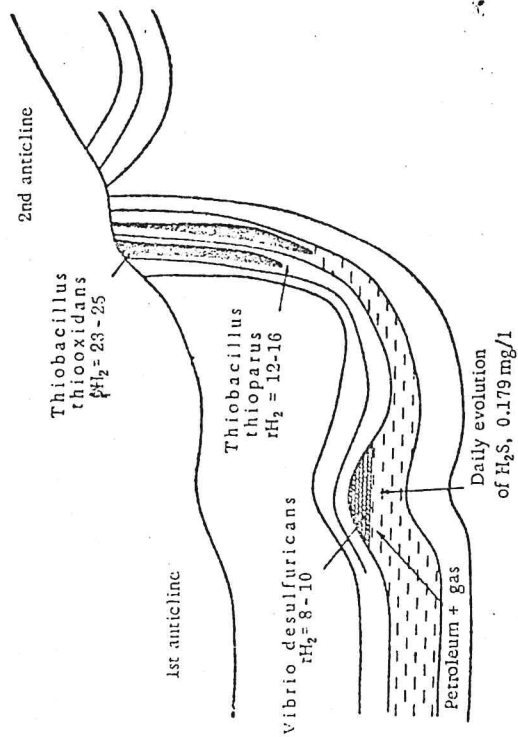


FIGURE 14. Diagrammatic illustration of the participation of different groups of microorganisms in the formation and destruction of the epigenetic sulfur deposits of Shor-Su (Kuznetsov et al., 1962)

% zuurstofopname / min.

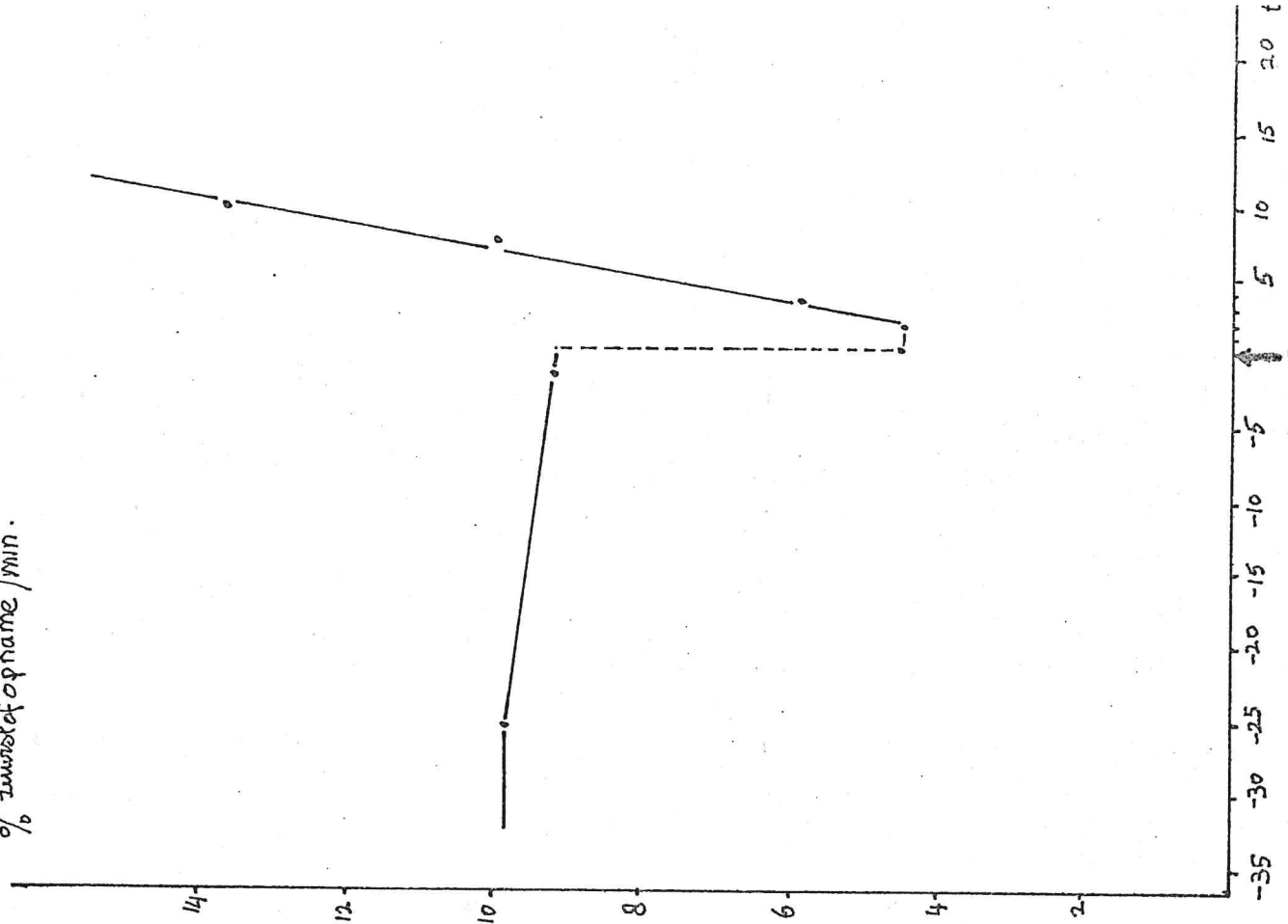


Fig. 16. Het verloop van de zuurstofname in de thiobacillus-trap van de tweetraps-chemostaat vanaf 35 uur voor de koppeling van het systeem.