

Rechten voorbehouden

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

De chemostaat als middel om de toxiciteit van giftige stoffen
op een Desulfovibrio kultuur te bepalen

door

J.M.A. van de Velde

Intern verslag

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 8

De chemostaat als middel om de toxiciteit van giftige stoffen
op een Desulfovibrio kultuur te bepalen

door

J.M.A. van de Velde

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als ingenieurs studie
in het tijdvak februari 1973 - augustus 1973

aan

het NIOZ op Texel

voor

Prof. dr. P.G. Fohr

Vakgroep Waterzuivering

Landbouw Hogeschool Wageningen

onder supervisie van

Drs J.H. Vosjan

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 8

De chemostaat als middel om de toxiciteit van giftige stoffen
op een Desulfovibrio kultuur te bepalen

door

J.M.A. van de Velde

Intern verslag

Inhoud

I. Summary	1
Samenvatting	2
II. Inleiding	3
III. Doel en opzet van de proef	7
IV. Materialen en methodes	8
A. Gesloten kultuur	8
B. Gilson respirometer	9
C. Continue kultuur	11
V. Resultaten en discussie.	15
A. Gesloten kultuur	15
B. Gilson respirometer	18
C. Continue kultuur	21
VI. Conclusie	25
VII. Enkele losstaande proeven met Desulfovibrio	25
A. Onderzoek naar een stof die abrupt de groei stopt	25
B. Tolerantie van Desulfovibrio voor H_2S	27
C. Invloed van ijzer op de groei van Desulfovibrio in een chemostaat	29
VIII. Aanhangsel	30
IX. Literatuur	31
Figuren	

I. SUMMARY

Is it possible to define exactly toxicity of pollutants upon a Desulfovibrioculture by means of the continuous culture?

Disturbing increase of pesticides and other pollutants which attain the Waddensea via the river Rhine stirred us to make several researches. Desulfovibrio, a very general representant of the Waddensea, was made an example for these researches because of

her interesting metabolitical qualities, likewise its short generationtime.

In spite of the imperfect methode of these experiment, we can by means of the continuous culture explain more about the influence a pollutant upon the growth of an organism than it would have been possible in case of a batch-culture.

During the experiment a division has been made between a) the influence upon exponential growth-rate, b) the influence upon metabolism.

In the first case culture will wash out, in the other case there will be question of a smaller growth result.

At the same time experiments have been done with pollutants in a batch-culture, as well with garthered cells.

SAMENVATTING

Onderzocht is of met de kontinue kultuur de toxiciteit van bepaalde stoffen op een Desulfovibrio kultuur exact bepaald kan worden. Dit is gebeurd vanwege de veront-rustende stijging van pesticides en anderetoxische stoffen, die via de Rijn de Waddenzee bereiken. Desulfovibrio, die als zeer algemeen voorkomende bacterie in de Waddenzee bodem voorkomt, is vanwege haar interessante metabolische eigenschappen alswel vanwege haar korte generatietijd als voorbeeld genomen.

Het resultaat van dit onderzoek is, dat, ondanks vele gebreken aan de methode, met behulp van een kontinue kultuur meer gezegd kan worden over de wijze waarop een toxische stof de groei van een organisme beïnvloed dan met behulp van een gesloten kultuur.

Tijdens de proef is er een scheiding gemaakt tussen een beïnvloeding enerzijds van de specifieke groeisnelheids constante, anderzijds van het metabolisme. In het eerste geval zal de kultuur uitspoelen, in het laatste geval zal er sprake zijn van een kleinere groeiopbrengst.

Tevens zijn parallel aan deze proef experimenten verricht met toxische stoffen in een gesloten kultuur en

met geoogste cellen.

II. INLEIDING

Het begin

Volgens een theorie van OPARIN (OPARIN, 1957; STARKA, 1968) naar het ontstaan van leven op aarde zien we, dat na de abiogene vorming van organische substantie - nog geen zuurstof, stikstof en kooldioxide in de atmosfeer - en na de in eerste instantie biologische afbraak door primitieve anaerobe bacterien van het type boterzuurgisting, de sulfaatademhaling een overheersende rol gaat spelen. Dit proces zal belangrijk blijven tot op het moment dat door photoreduktie de waterstofsulfide concentratie af zal nemen en dat door een verhoging van de redox-potentiaal zuurstof in de atmosfeer voor zal kunnen komen.

Door chemoreduktie zal de kooldioxide concentratie in de atmosfeer afnemen. Dit heeft tot gevolg dat bepaalde organismen overgaan tot de vorming van pigmenten. Deze pigmenten geactiveerd door het veranderde spectrum kunnen leiden tot de hierboven reeds gesuggereerde koolzuur-assimilatie.

Dit is het moment dat er een samenspel plaats gaat vinden tussen aerobe en anaerobe organismen, beiden strijdend om het zo belangrijke organische materiaal.

Het organisch materiaal en haar verplaatsing

Het totale bedrag aan organisch materiaal in de wereldzeeën bedraagt om en nabij $2 \cdot 10^{12}$ ton. Dit is berekend met het gegeven dat het volume van de wereldzeeën $1.369 \cdot 10^9 \text{ km}^3$ (BOWDEN, 1965) bedraagt, vermenigvuldigd met de gemiddelde concentratie aan organisch materiaal van ongeveer 1,5 mg/l (DUURSMA, 1961, 1965; MENZEL & RYTHER, 1970). De totale jaarlijkse input van organisch materiaal in de wereldzeeën is 125-175 gram organische materie/m². jaar (STEALMAN NIELSEN, 1960).

Dit geeft een jaarlijkse produktie van $4,5-6,3 \cdot 10^{10}$ ton. Vergelijking met huishoudelijk en industrieel

afval, meegevoerd met de Nederlandse rivieren, laat in eerste instantie denken dat dat geen enkele invloed uitoefent op de organische stofbalans. Hetgeen ook volstrekt juist is. Een faktor, waar echter ter dege rekening mee gehouden moet worden, is de menging van stromingen met verschillende dichtheden. Aangezien het dooreen werken van deze stromingen een langzaam proces is kunnen er plaatselijk aanzienlijke verstoringen in de balans voorkomen.

De volgende onderzoeken kunnen ons daar een indruk van geven. Concentraties van in Rijnwater verkerende stoffen bezitten na 14 dagen in de Noordzee verbleven te hebben nog een concentratie, welke 20% van haar uitgangswaarde is (ROSKAM, 1972). Gemiddeld juist in die termijn zal door een naar het noorden gerichte stroom, welke veroorzaakt wordt door de resultante van eb en vloed beweging, dit Rijnwater de Waddenzee binnen kunnen stromen (TIJSSSEN, 1969).

Met dit gegeven en uitgaande van een gemiddeld jaarlijks debiet van de Rijn van 70 km^3 , waarvan het stofgehalte op 40-60 mg/l gehouden kan worden, is te berekenen dat er $5,6-8,4 \cdot 10^8$ ton gesuspendeerde Rijnwaterdeeltjes per jaar de Waddenzee binnenstroomt. Uit onderzoeken aangaande mineralisatie processen van o.a. POSTMA komt de invloed hiervan duidelijk naar voren.

De persistente stoffen

Tegelijkertijd met deze toevoer van organisch materiaal zal de aanvoer van een deel der milieu-schadelijke stoffen geschieden.

Contaminatie van deze stoffen in de Nederlandse rivieren heeft zodanige vormen aangenomen dat deze tot verontrusting aanleiding kunnen geven (RIJNNOTA, 1973). Een deel van deze stoffen zal adsorberen op de zwevende deeltjes in het Rijnwater en zoals hiervoor reeds beschreven, de Waddenzee bereiken. Metalen zoals koper, cadmium en kwik zijn hier duidelijk voorbeelden van.

Moeilijker is het om het gedrag van de organochloorverbindingen te volgen. De reden is dat veel van deze

stoffen een vluchtig karakter bezitten. Het percentage van deze stoffen dat in de atmosfeer terecht komt en zodoende een veel bredere spreiding veroorzaakt is afhankelijk van factoren zoals de temperatuur en de verhouding water-materie in de grond. Ondanks de bredere spreiding van deze stoffen kunnen meetbare concentraties aangetoond worden. Dit geldt in het bijzonder voor estuaria, zoals de Waddenzee en wel om de volgende redenen:

- het oppervlakactieve karakter van organochloor verbindingen.
- het lyofiel karakter van deze stoffen en de daarmee gepaard gaande accumulatie in het vetachtig weefsel van "filter feeders" (VERWEY, 1952) waardoor toxische concentraties bij niches aan het eind van de voedselketen
- de aanwezigheid van agrarisch gebied.

Sedimentatie en mineralisatie

Bij een zodanige aanvoer van organisch materiaal en persistente stoffen zal in een estuarium bestaande uit geulen, platen en stroomgaten, waar, onder invloed van getijde-beweging en verschillen in waterdiepte dit materiaal kan sedimenteren (POSTMA, 1954), het aanbod voor de aerobe organismen te groot zijn.

In de waterkolom waar de menging het grootst is zal het water voldoende geaereerd blijven. Ten aanzien van gebieden welke minder onderhevig zijn aan het mengproces kan er in zekere mate sprake zijn van een gesloten systeem. In een dergelijk systeem zullen na verloop van tijd tekorten optreden aan voor het leven van bepaalde organismen essentiële voorwaarden. Een illustratie van de overgang van een oxiderend naar een reducerend ecosysteem wordt gegeven in de figuren 1 en 2. Deze figuren zijn ontleend aan experimenten in situ in de Baltische zee (HALLBERG, 1972). Voor de Waddenzee zullen de omstandigheden anders zijn, het totale beeld zal weinig verschillen.

Mineralisatie zal in een anaeroob gebied verzorgd worden door respectievelijk de processen fermentatie en

anaerobe respiratie. Karakteristiek voor laatstgenoemd proces is de zwarte kleur in het sediment, hetgeen aan- toont dat mineralisatie plaats heeft gevonden door sulfaatreductie.

De zwavelcyclus en de rol van *Desulfovibrio*

Desulfovibrio bezit een centrale plaats in de zwavel- cyclus, hetgeen uit het schema van Fig. 3 duidelijk is.

Eind vorige eeuw is deze bacterie waargenomen door VAN DELDEN en BEYERINCK. Het is de grote verdienste van deze twee landgenoten dat een eerste inzicht in bedoeld reductie proces is verkregen.

Dat juist door landgenoten zulk fundamenteel werk is verricht hangt ongetwijfeld samen met het feit dat men in onze stadjes met haar vele grachten, waarin het water vaak zeer gebrekkig ververst wordt (WIBAUT-ISEBREE MOENS, 1916), maar al te sterk herinnerd werd aan het ontstaan van waterstofsulfide, hetgeen haar oorzaak vindt in de grote hoeveelheid sulfaten die aldaar aanwezig zijn.

Naast deze grachten speelt *Desulfovibrio* tevens een belangrijke rol in mariene biologisch en geologisch opzicht. Zij bezit de mogelijkheid een groot scala orga- nische verbindingen in haar metabolisme te gebruiken (BAARS, 1930). Wanneer ammoniak en sulfaat ook in voldoende mate aanwezig zijn zal zij een ideale habitat kunnen vinden in lagen dicht onder het bodemoppervlak. In een reducerend milieu zal de ammoniak concentratie voldoende zijn (Fig. 1). Ook sulfaat is in de Waddenzee in voldoende mate aanwezig, vanwege het enerzijds relatief mobiele karakter van de Waddenzee, anderzijds de activiteiten van *Desulfovibrio*'s tegenpool *Thiobacillus* (VOSJAN, 1973).

De sulfide-vorming heeft tot gevolg dat meegevoerde metalen als metaalsulfides in het sediment opgeslagen zullen worden. Verschillende onderzoeken leren ons dat bij de vorming van metaalsulfides het toxische karakter van desbetreffende metalen drastisch verlaagd wordt (o.a. VOSJAN & V.D. HOEK, 1972).

De chemostaat

De chemostaat heeft gemeen met een proefopstelling onder volledige natuurlijke omstandigheden, dat het hier in beide gevallen gaat om een open biologisch systeem. Dit systeem heeft de eigenschap zichzelf instand te houden en autoreproductie toe te passen.

Thermodynamisch kunnen we dat als volgt verklaren. Continue toevoer van voedingsstoffen betekent voor het systeem een verlaging van de entropie. De continue afvoer van stoffen, welke een hogere entropie bezitten houdt dit in evenwicht. Dit wordt de steady state genoemd. Zolang dit proces gehandhaafd blijft, leeft het organisme.

De specifieke groeisnelheidsconstante wordt bepaald door de beperkende factor in het systeem. Deze twee factoren tegen elkaar uitgezet geven het Michaelis-Menten plot (Fig. 4). De beperkende factor wordt bepaald door de dilution rate (D). De dilution rate is de verhouding van de toegevoerde hoeveelheid per tijdseenheid (f = flow) en het volume van het cultuurvat (V). De regulerende factor moet bij een chemostaat dus gezocht worden, wanneer de omstandigheden optimaal zijn, bij de toevoer van de beperkende factor. Zodra door toevoeging van een persistente stof de omstandigheden niet meer optimaal zijn zal er een verandering optreden in het systeem.

Dit is het direkte voordeel van een continue cultuur boven een batch cultuur.

Van laatstgenoemd systeem zijn er teveel factoren onderhevig aan verandering. Te noemen zijn:
 groei volgens de groeicurve
 zuurgraad
 nutrientconcentraties
 metabolische produkten
 De chemostaat is in de jaren 50 ontwikkeld door MALEC cs.
 Enige van de meest algemene principes zullen nog bij de behandeling van de materialen gegeven worden.

III. DOEL EN OPZET VAN DE PROEF

In de Waddenzee vindt accumulatie plaats van in zeewater

gesuspendeerd materiaal. Aan dit materiaal kunnen velerlei verbindingsen geadsorbeerd worden. Ook bijvoorbeeld door de Rijn aangevoerde pesticiden.

Een groot deel van het gesedimenteerde materiaal bestaat uit organische stof, die voor een deel in de bovenste enkele centimeters dikke aerobe laag van het wadsediment gemineraliseerd wordt. In het anaerobe wadsediment wordt door o.a. sulfaat reductie nog een deel van deze materie gemineraliseerd.

De bedoeling van dit onderzoek is om het effect van enkele toxische stoffen op de mineralisatie van *Desulfovibrio* te bestuderen. Dit gebeurt in een modelsysteem, de continue kultuur of chemostaat, waarin we het effect van bepaalde stoffen op de groei en de respiratie van een organisme generaties lang onder gelijkblijvende omstandigheden kunnen bestuderen. Ook werd het effect van enkele stoffen op gesloten kulturen en geogste cellen bestudeerd.

IV. MATERIALEN EN METHODES

A. Gesloten kultuur

Het medium waarin *Desulfovibrio* is gekweekt heeft de volgende samenstelling. De opgegeven waarden zijn allen per liter gerekend.

H-Acceptor	7	mMol	sulfaat
C-bron	15	mMol	laktaat
buffer	3,8	ml	geconc. zoutzuur
	6,06	gram	tris
zouten	20	gram	natrium chloride
	0,1	gram	calcium chloride
	0,1	gram	magnesium chloride
	0,1	gram	kalium waterstof fosfaat
sporen metalen	3	mgram	ijzersulfaat
	3	mgram	citroenzuur
eiwitten	0,25	gram	trypticasen
	0,25	gram	gistextract
redox-verlagende stof	0,1	mMol	thioglyconaat
	0,1	mMol	ascorbaat

Van de verschillende stoffen, die op dit systeem beproefd zijn, zijn concentraties in een oplopende reeks toegevoegd, te weten 0 - 0,01 - 0,1 - 1 en 10 ppm. Bij de stoffen chlooramphenicol en lincosamine is het ook nuttig geacht een concentratie van 40 ppm toe

te voegen,

De volgende stoffen zijn onderzocht: streptomycine-gramicidine-chlooramphenikol-lindaan-clophon A_{50} -KCN-fenol-dinitrofenol en cetyl-triammonium bromide. Vanwege de onoplosbaarheid van lindaan, chlooramfenikol en gramicidine in waterig milieu zijn deze stoffen eerst in 3 ml. aceton opgelost, voordat ze aan het medium toegevoegd werden. Vanzelfsprekend is ook de blanco-waarde aan deze procedure onderworpen. Voor gramicidine was ook deze methode niet adequaat. Zodoende moeten de waarnemingen aangaande deze stof met enige argwaan bekeken worden.

De kultuur is gekweekt in een reageerbuis van 25 ml., welke na toevoeging van het medium en de door een verdunningsreeks verkregen concentraties van de toe te voegen stof, in een autoclaaf gesteriliseerd is.

Enting geschiedde met een goed groeiende Desulfovibriokultuur. In eerste instantie zijn 2-3 druppels van deze kultuur toegevoegd. Vanwege het slechte resultaat na 3 dagen broeden bij 30 °C is toen nogmaals geënt. Deze enting geschiedde door 1 cc van diezelfde kultuur toe te voegen.

De buizen werden vervolgens dicht gemaakt met wattenproppen en rubber stop. Vanwege het vereiste zuurstofloze karakter is steeds 0,5 µl alkalische pyrogallol toegevoegd.

B. Gilson respirometer

Een eerste vereiste voor een goed begrip van deze proef is de kennis van de metabolische eigenschappen van Desulfovibrio. Desulfovibrio bezit de eigenschap verschillende waterstof-acceptoren te kunnen gebruiken.

a. Bij aanwezigheid van sulfaat zal er een oxydatieve fosforylering optreden, waarbij de sulfaat de functie heeft van elektronen-acceptor. Dit is mogelijk aangezien Desulfovibrio een elektronen transport systeem (ETS) bezit.

Als waterstof-donor kunnen verschillende organische verbindingen fungeren. Bij deze proef is gebruik gemaakt van waterstof als waterstof-donor. Desulfovibrio kan de vereiste waterstof-ionen voor het ETS ook aan waterstof onttrekken vanwege het bezit van het enzym hydrogenase (Fig. 5).

b. Bij aanwezigheid van een geschikte koolstof-bron, zoals pyruvaat heeft ze ook de mogelijkheid uit deze verbinding waterstof vrij

te maken. Hier is sprake van fermentatie (Fig. 6). *Desulfovibrio* bezit niet de mogelijkheid om met deze vrijgemaakte waterstof en de aanwezige pyruvaat laktaat te vormen.

De opzet van deze proef is om door bepaalde omstandigheden te creëren de hierboven geschetste metabolische eigenschappen te scheiden.

Bij toevoeging van een toxische component zal de invloed van die stof op elk van beide processen afzonderlijk beoordeeld kunnen worden.

Principe Gilson respirometer (Fig. 7)

De Gilson respirometer is een combinatie van manometer en micrometer. Met een stelschroef kan het volume zodanig geregeld worden dat de druk gelijk blijft. Het volume is af te lezen door middel van een U-vormige buis, welke gevuld is met gezuiverde petroleum en gekleurd is met soedan-rood.

De verandering van het volume is een directe maat voor de activiteit van de onderzochte suspensie.

Uitvoering van de proef

De bacteriesuspensie wordt verkregen door een halve liter van een in de exponentiele fase bevindende kultuur af te centrifugeren en te spoelen met de volgende buffer:

127 ml.	1N	tris
100 ml.	1N	zoutzuur
20 gram		natrium chloride

Met 12 ml. van dezelfde buffer werd vervolgens een suspensie gemaakt. Deze werd in porties van 2 ml. verdeeld over de verschillende reactievaatjes. In het ringetje van de vaatjes werd 0,5 µl pyrogallol en 0,5 µl kalium hydroxide toegevoegd. Dit om respectievelijk sporen zuurstof en de gevormde kooldioxide op te vangen.

De temperatuur werd constant gehouden met behulp van een waterbad. Tijdens de proef werden de vaatjes in een schudbeweging gesteld om een evenwichtig verloop van de reactie te bewerkstelligen.

De volgende toxische stoffen zijn bij deze proef aan de orde geweest:

cetyl tris ammoniumbromide (CTAB)

2-4 dinitrofenol

kalium cyanide

Bij elk van deze stoffen is naast de blanco bepaling de proef verricht bij concentraties van 10 - 100 - 1000 - 10.000 μ gram/l. Deze werden in hoeveelheden van 0,2 ml in een zijarm gedeponeerd. Zodra de reactie een evenwichtig verloop leek te hebben werden ze toegevoegd aan de bacterie suspensie.

Zoals reeds opgetekend is de proef in twee verschillende onderdelen gesplitst:

a. onderzoek naar de invloed op de respiratie

-de gasfase bestaat uit waterstof

-de tweede zijarm wordt gevuld met 0,2 ml 4 gram/l natrium sulfiet

b. onderzoek naar de invloed op de fermentatie

-de gasfase bestaat uit het inerte gas stikstof

-de tweede zijarm wordt gevuld met 0,2 ml 0,05 M pyruvaat

De inzet van de proef vergt een grote nauwgezetheid. Het veranderen van de gasfase vindt plaats door 10 minuten via kraan d het gewenste gas binnen te laten stromen. Vervolgens werd gewacht met de inzet van de proef tot er geen drukverschillen meer voorkwamen. Deze drukverschillen zijn mogelijk door:

-temperatuurvariaties

-sporen sulfaat

-sporen pyruvaat

Zodra de druk constant bleef, werd desgewenst de natrium sulfiet en de pyruvaat toegevoegd, waarmee met de proef een begin gemaakt werd. Dit moment is tijdens de experimenten tijdstip nul genoemd. Met de tijd zal er een evenredige hoeveelheid waterstof hetzij opgenomen hetzij gevormd worden, respectievelijk wanneer er sprake is van respiratie of fermentatie.

Na toevoeging van een toxische component zal deze curve bij invloed een knik moeten gaan vertonen.

C. Continue kultuur (Fig. 8)

Het kultuurvat (5), waar de bacterien in groeien wordt voorzien van de benodigde voedingsstoffen via slang A. De flow waarmee dit gebeurt kan vastgesteld worden met de buret (3). De toevoer wordt constant gehouden met behulp van de peristaltische pomp (4).

Via slang (B) verlaten de uitgegroeide bacterien en de

metabolische eindproducten het kultuurvat. Deze zullen via een luchtbrug (6) hetwelk een val is voor ongenode gasten en via een zuurstofval (7) in de fractieverzamelaar terecht komen.

Deze fractieverzamelaar is zowel door een hevelaar als door een timer te regelen. In hoofdstuk VIIa wordt nader ingegaan op het voordeel een timer te gebruiken. De fractieverzamelaar maakt het mogelijk gedurende de duur van verschillende generaties het verloop van de groei te volgen.

Het is niet nodig geacht de zuurgraad te reguleren. Eigen ervaring heeft geleerd dat er geen meetbaar verschil in groei eigenschappen geregistreerd wordt bij een PH verloop van 6,9 tot 7,8. Ook anderen geven PH-waardes rond de 7,5, waarbij een grote marge aangenomen mag worden (POSTGATE, 1966). Vanwege de grotere kans op infectie bij een gecompliceerdere opstelling is daarom afgezien van een PH-regelaar. De temperatuur werd met een contact thermometer, gekoppeld aan een infrarood lamp, ingesteld op 30 °C. De invloed van de temperatuur is eenmaal waargenomen toen bij een temperatuursverlaging tot 20 °C de cultuur uitspoelde. Dit ondanks het feit dat gewerkt werd met een dilution rate welke ver van haar kritieke waarde was.

De opstelling kreeg als volgt een anaeroob karakter:

- de instelling van een kleine stikstof overdruk
- zwaar beenten, waardoor redoxverlaging
- steriliseren, waardoor een vermindering van de zuurstofdruk

Het medium had een samenstelling alswelke reeds beschreven is bij de gesloten cultuur. Niet nodig werd geacht een redox-verlagende stof toe te voegen. Concentraties van waterstof-en koolstof-bron verschilden verder bij de diverse proeven.

Groei werd bepaald als eiwit (mg/l) met biureetreagens.

Controle hierop werd verkregen door middel van:

- turbiditeitsmetingen
- sulfaatbepalingen
- pyruvaatbepalingen

De voorschriften voor deze bepalingen zijn te vinden in het aanhangsel. De inzet van de proef met een toxische stof geschiedde door in een 3 liter vat precies hetzelfde medium te maken met daarbij echter de gewenste concentratie van de desbetreffende stof. Overschakeling geschiedde door middel van de verbindingsstukken K en L.

De groei

Groei van bacterien gedraagt zich volgens een reactie van de eerste orde.

$$\mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{x_1}{x_2}$$

μ = reactieconstante of specifieke groeisnelheidsconstante

x = biomassa

voor $t_2 - t_1$ geldt: $\frac{dx}{dt} = \mu X$

De specifieke groeisnelheidsconstante is afhankelijk van een in het medium verkerende beperkende factor (s).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{s}{K_s + s} \quad (\text{Michaelis-Menten curve})$$

$\mu_{\max}$ = groeisnelheid, wanneer de kultuur zich in de exponentiele fase bevindt

μ = groeisnelheid bij een beperking van een externe factor

K_s = concentratie beperkende factor waarbij $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$.

Het verlaten van de bacterien uit het kultuurvat is afhankelijk van de dilution-rate. De hoeveelheid bacterien, welke uitspoelen, komt overeen met $D \cdot x$.

De zelfregulering van een chemostaat komt tot uitdrukking in:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X$$

Wanneer gedurende een tijd de dilution-rate groter is dan de specifieke groeisnelheidsconstante zal de biomassa afnemen. Immers $\frac{dx}{dt} < 0$. Evenwicht zal zich weer herstellen aangezien bij deze grotere dilution-rate eveneens de aanvoer van de beperkende factor en daaraan gekoppeld de specifieke groeisnelheidsconstante groter wordt. Dit tot een limiet waarbij D gelijk is aan de $\mu_{\max}$. Een dergelijke redenering kan toegepast worden, wanneer gedurende korte tijd de dilution-rate kleiner is dan de specifieke groeisnelheidsconstante.

Toevoeging van een toxische component

Een toxische stof kan invloed hebben op:

a. de specifieke groeisnelheidsconstante

b. de energiebalans

c. geen invloed

ad a: De specifieke groeisnelheidsconstante is kleiner dan de ingestelde dilution rate. De biomassa zal uitspoelen.

1: $\mu = 0$ (Fig. 10a). De uitspoeling zal geschieden volgens de formule

$$x_t = x_0 \cdot e^{-D t} \quad (\text{Fig. 9})$$

x_0 = biomassa op tijdstip $t = 0$

2: $0 < \mu < D$ (Fig. 10c). De kultuur zal uitspoelen, echter minder snel.

ad b: Verandering in de energiebalans (Fig. 10b). De specifieke groeisnelheidsconstante blijft afhankelijk van de beperkende factor in het medium. De biomassa zal dus niet uitspoelen.

ad c: geen invloed (Fig. 10d).

Theoretische concentratie van een nieuwe component in een continue systeem (Fig. 10)

Wanneer in het kultuurvat de nieuwe component niet aangetast wordt zal de concentratie op tijdstip t zijn:

$$x_t = x_0 \cdot e^{-D t}$$

x_0 = concentratie nieuwe component op tijdstip $t = 0$

Afleiding:

Tussen t en $t + \Delta t$ verandert de concentratie:

$$D \cdot t (x_0 - x_t) = \Delta x$$

$$\int_0^{x_t} \frac{dx}{x_0 - x} = \int_0^t D dt$$

$$\ln x_0 - x_t \Big|_0^{x_t} = D t$$

$$\ln \frac{x_0}{x_0 - x_t} = D t$$

$$x_t = x_0 \cdot (1 - e^{-D t})$$

De grafiek van Figuur 9 is eenvoudig af te leiden van de hierboven gegeven formule.

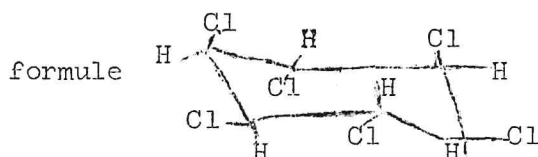
Door middel van curve l_1 is het mogelijk op elk gewenst tijdstip de concentratie van een toxische stof te bepalen. Uitgezet in de Figuur 15 kan bepaald worden bij welke concentratie een toxische stof invloed krijgt op de cultuur.

V. RESULTATEN EN DISCUSSIE

A. Gesloten cultuur

a) Lindaan

De actieve isomeer van benzeen hexachloride is:



γ -1 2 3 4 5 6 hexachlorocyclohexaan

De stof wordt bereid door middel van chlorering van benzeen onder invloed van zonlicht. Ruwe lindaan bevat voor 10-18% de actieve isomeer. Tijdens de proef is gebruik gemaakt van een mengsel dat voor 99% uit het γ - isomeer bestaat.

De stof is in de agrarische handel ter bestrijding van niet gewenste bodemdieren en om zaden te prepareren tegen insecten. Hoewel de werking van lindaan onbekend is, suggereert de specifieke toxiciteit van het γ - isomeer een sterke overeenkomst met die van DDT. De werking van lindaan zal in dat geval berusten op een verstoring van de lipoproteïne structuur van het zenuwstelsel in het bijzonder van die van insecten.

Op *Desulfovibrio* heeft deze stof geen invloed.

b) Streptomycine

Deze stof is een antibioticum, dat uit *Streptomyces griseus* geïsoleerd wordt.

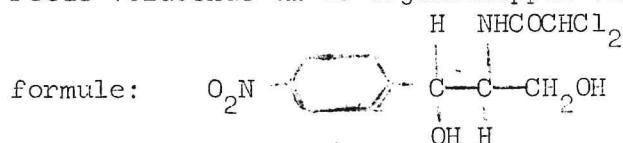
De stof is actief bij de biosynthese van proteïne. Bij gevoelige organismen zal een belangrijke actieve plaats van het m- RNA zodanige verandering ondergaan dat deze plaats andere aminoacyl-transport-RNA moleculen zal binden. Dit heeft tot gevolg dat de codering voor de peptides verandert en daarmee hunvolgorde (MAHLER, 1969).

Desulfovibrio heeft geen invloed van deze stof ondervonden. Aangetekend moet echter worden dat de hoogste concentratie van 10 ppm. in dit geval aan de lage kant is.

c) Chlooramphenikol

Deze stof is oorspronkelijk eveneens verkregen als antibiotisch product van *Streptomyces griseus*. Synthetische bereiding is echter ook mogelijk.

Dit molecuul is de klassieke inhibitor van de proteïne synthese van bacteriën. In het algemeen is een concentratie van 10-20 ppm. reeds voldoende om de eigenschappen van deze stof aan te tonen.



De invloed van deze stof is gebaseerd op verschillende punten (MAHLER)

- ophoping RNA
- zie streptomycine

Deze stof heeft een duidelijke invloed op *Desulfovibrio*.

d) Gramacidine

Dit antibioticum wordt geïsoleerd uit *Bacillus brevis*.

Formule: $(-L-VAL - L-ORN - L-LEU - D-PHE - L-PRO -)_2$
cyclisch peptide

Gramicide is zowel in waterig milieu als in aceton niet oplosbaar. Gramicide werkt in op de eindademhaling. Zij is actief op alle 3 fosforylering plaatsen (MAHLER).

Op *Desulfovibrio* heeft deze stof geen invloed. Vanwege een neerslag kan aan deze waarneming echter niet veel waarde gehecht worden.

e) Kaliumcyanide

Kaliumcyanide heeft haar werking eveneens bij de eindademhaling. Cyanide-ionen gaan een binding aan met het ijzer van het cytochroom c , waardoor de uiteindelijke elektronen overdracht op de zuurstof niet plaats vindt (MAHLER).

Desulfovibrio bezit het cytochroom c_3 . De laatste overdracht van elektronen is niet op zuurstof maar op sulfiet. Dit kan maken dat kaliumcyanide geen invloed heeft op de eindademhaling van

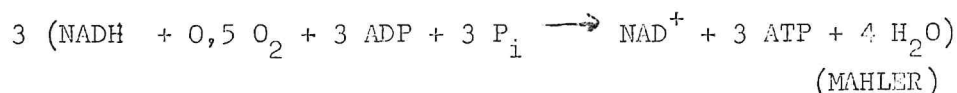
Desulfovibrio.

f) 2-4 dinitrofenol

formule:



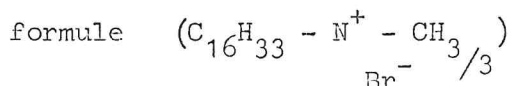
Ook dinitrofenol is een ontkoppelingsagens bij de eindademhaling. Bij de aerobe ademhaling remt de stof de volgende reactie



Aangezien deze stof bij de concentraties 1 en 10 ppm een duidelijk effect liet zien kan er sprake van zijn dat Desulfovibrio een dergelijk mechanisme voor de vorming van ATP bezit.

De felgele kleur is tijdens het experiment veranderd in een donkerbruine. Een verklaring hiervoor kan zijn dat dinitrofenol door bacteriën wordt aangetast. Misschien gereduceerd.

g) Cetylammoniumbromide (CTAB)



Oppervlakactieve stoffen spelen een grote rol in industrie, wetenschap en huishouding. Zij kunnen gekenmerkt worden met het feit dat ze de vrije energie van een oppervlak kunnen veranderen, zodra ze geadsorbeerd raken op dat oppervlak. Vanwege deze verandering van vrije energie en vanwege hun mogelijkheid lipoproteïnes op te lossen kan adsorptie van CTAB resulteren in lekkage van cellen (MAAS, 1969). Deze stof heeft invloed op Desulfovibrio bij een concentratie van 10 ppm.

Ook hier is sprake van kleuromslag. Bij het begin van het experiment waren alle oplossingen lichtbruin. Aan het eind van de proef was de oplossing van concentratie 10 ppm, donkerbruin, terwijl de oplossingen, waarbij geen invloed geregistreerd werd, kleurloos waren.

h) Zowel fenol als clophen A₅₀ hebben geen invloed op Desulfovibrio in een gesloten cultuur.

Clophen A₅₀ is een mengsel van polyfenyl chlorides.

B. Gilson respirometer

In deze experimenten werd de invloed van a. cetylammoniumbromide (CTAB), b. dinitrofenol en c. kaliuncyanide op zowel fermentatie (1) als respiratie (2) nagegaan.

a,1 Effect CTAB op de fermentatie

Het respirometervaatje bevatte 2 ml bacteriesuspensie, 0.2 ml pyruvaat en de gasfase was N_2 . In de tijd werd de H_2 productie gemeten in μl . Op tijdstip $T = 9$ werd CTAB toegevoegd, in concentraties variërend van 0 tot 10.000 $\mu g/l$. Tabel I geeft de waterstofproductie in μl op verschillende tijdstippen voor suspensies waaraan verschillende hoeveelheden CTAB toegevoegd werden.

Tabel I

Effect CTAB op de waterstofproductie

Hoeveelheid CTAB $\mu g/l$	Tijd (min.)							
	3	5	7	9	11	13	15	18
10000	54	79	108	134	158	182	LEK	
1000	40	59	82	101	133	156	178	207
100	34	58	84	109	139	163	190	216
10	34	61	85	106	153	176	197	208
0	33	59	85	101	135	158	175	201

a,2 Effect CTAB op de respiratie

Het respirometervaatje bevatte nu i.p.v. pyruvaat 0.2 ml natriumsulfiet als elektronen acceptor en de gasfase was waterstof. In Tabel II is weergegeven de hoeveelheid verbruikte waterstof in μl . Op tijdstip $T = 63$ werd CTAB toegevoegd.

Tabel II

Effect CTAB op het waterstofverbruik

Hoeveelheid CTAB $\mu g/l$	Tijd (min.)									
	10	20	35	50	60	63	70	83	87	100
10000	6	17	41	80	111	119	147	163	163	165
1000	11	29	63	112	145	149	182	215	217	218
100	14	32	75	133	173	182	215	234	236	236
10	11	25	56	99	131	139	171	198	203	201
0	10	24	61	106	141	148	176	200	204	204

In de figuren 12 a en b zijn de resultaten grafisch weergegeven. Er kan geconcludeerd worden dat CTAB geen invloed heeft op respiratie en fermentatie van niet groeiende cellen.

b, 1 Invloed Dinitrofenol op fermentatie

Op overeenkomstige wijze als a,1 werd dit experiment uitgevoerd, op tijdstip T = 50 werd dinitrofenol toegevoegd, zie Tabel III.

Tabel III

Effect van dinitrofenol op de waterstofproductie

Hoeveelheid dinitrofenol $\mu\text{g/l}$	Tijd (min.)							
	12	17	25	40	50	60	70	85
10000	32	36	56	72	125?	-	-	-
1000	21	26	45	61	67	76	81	81
100	28	33	45	64	72	82	89	96
10	25	32	46	65	75	84	87	94
0	29	36	53	72	84	88	88	88

b,2 Effect dinitrofenol op respiratie

Evenals a,2 werd in het vaatje 0.2 ml (4 g/l) natriumsulfiet als electronen acceptor toegevoegd en de gasfase was de electronen-donor waterstof. Na 30 minuten werd begonnen de waterstof afname te meten en op T = 60 werd dinitrofenol toegevoegd (Zie Tabel IV & V).

Tabel IV

Effect dinitrofenol op waterstofverbruik

Hoeveelheid dinitrofenol $\mu\text{g/l}$	Tijd (min.)											
	3	6	15	20	30	40	50	60	70	80	90	95
10000	8	8	12	15	20	28	38	58	83	98	115	125
1000	8	5	14	19	23	27	29	37	50	56	65	70
100	8	14	18	21	24	29	36	51	67	82	101	109
10	-6	-12	-21	-27	-30	4 ¹⁾	10	19	35	44	62	69
0	6	12	12	17	21	27	36	50	64	79	96	104

1) Vanaf het tijdstip T = 30 nam de hoeveelheid waterstof weer af.

Herhaling van dit experiment met toevoeging van dinitrofenol op verschillende tijdstippen, met x gemerkt.

Tabel V

Effect dinitrofenol op waterstofverbruik

Hoeveelheid	Tijd (min.)											
dinitrofenol $\mu\text{g/l}$	3	5	10	15	20	27	32	37	47	57	67	
10000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	20	26	37	43	50 ^x)	59	65	71	80	86	90	
100	19	27	32	46	57 ^x)	78	84	97	114	132	147	
10	15	25	43	61	74	98	115	131 ^x)	153	183	207	
0	31	35	46	43	53	67	74	87	102	120	134	

In de figuren 13 a, b en c zijn de resultaten grafisch weergegeven. Ook bij deze proef kon geen effect aangetoond worden.

c., Effect kaliumcyanide op de respiratie

Bij aerobe organismen werkt kaliumcyanide toxisch op de respiratie, vandaar dat deze stof gebruikt werd om het effect op de sulfaat-respiratie te bepalen. Het experiment werd in duplo uitgevoerd. Tabel VI en VII geven de resultaten, in μl waterstof-opname.

Tabel VI

Effect kaliumcyanide op waterstofverbruik

Hoeveelheid	Tijd (min.)											
kaliumcyanide $\mu\text{g/l}$	3	6	9	12	18	24	30	36	42	45	54	63
10000	7	15	20	24	31	35	40	45	54	59	78	103
1000	7	15	23	33	51	74	93	120	146	157	194	212
100	9	19	23	43	79	110	139	173	202	216	262	291
10	14	27	44	60	90	121	154	192	227	241	282	293
0	8	16	31	45	79	107	138	174	204	220	263	300

Op het tijdstip T = 9 is de kaliumcyanide toegevoegd.

Tabel VII

Effect kaliumcyanide op waterstofverbruik

Hoeveelheid kaliumcyanide $\mu\text{g/l}$	Tijd (min.)											
	3	6	9	12	15	18	24	30	33	40	47	54
100000	3	3	6	14	18	23	29	42	-	-	44	48
10000	4	12	15	22	28	34	41	40	-	-	53	58
1000	11	27	40	58	71	85	111	138	154	187	215	240
100	4	14	28	37	52	66	94	126	141	172	202	231
0	9	27	41	39	74	94	122	160	175	215	254	290

Op het tijdstip $T = 24$ is de kaliumcyanide toegevoegd.

In de figuren 14 a en b zijn de waarnemingen grafisch weergegeven.

Uit al deze proeven met de Gilson respirometer blijkt hoe gevoelig de methode is. Reeds bij minimale uitwendige veranderingen kan de proef mislukken.

Het punt wat ook een onzekere factor bij deze proeven is geweest, is het feit dat de conditie van de geoogste cellen niet bekend was. Op zichzelf is dat niet van belang. In de praktijk blijkt dat het dan erg moeilijk is om het juiste tijdstip te kiezen, waarop de toxische component toegevoegd moet worden. Bij sommige proeven is daarom een verschillend tijdstip voor de verschillende concentraties gekozen.

C. Kontinue kultuur

Bij deze proeven is uitgegaan van substraat (pyruvaat) als beperkende factor. Elk uur is gemonsterd. Dit betekent bij een $D = 0,05$ dat er per monster 17 ml bacteriesuspensie aanwezig is.

Een steady state situatie is bereikt, zodra de bacteriemassa niet noemenswaardig verandert gedurende het tijdsbestek dat het cultuurvat theoretisch drie maal verversst is.

De tijd is uitgedrukt in de reciproke van de dilution rate. In de tabellen zijn niet alle waarnemingen opgetekend. Er is steeds het gemiddelde van groepjes waarnemingen genomen. De nomenklatuur die daarvoor is gebruikt kan met volgend voorbeeld duidelijk gemaakt worden:

$$5/D \quad \text{-----} \quad 5/D + 2/20 D$$

Bij een dilution rate van 0,05 betekent het dat de gemiddelde

waarde van de waarnemingen na 100, 101 en 102 uur genomen is. Op het tijdstip 0/D wordt de toxische stof toegevoegd.

a) Clophen A_{50}

Hoewel bij het experiment in een gesloten kultuur geen sprake is van invloed van Clophen, is toch nagegaan of dat ook geldt voor een continue kultuur.

Het toedienen van de toxische stof gebeurt door een nieuw vat met hetzelfde medium te koppelen aan de opstelling. Gebleken is dat door deze handeling een verschuiving van de steady state optreedt. Dit brengt met zich mee dat de bepaling minder exact wordt. Vanwege de volgende redenen is echter wel de conclusie getrokken dat clophen een invloed heeft op de groeiopbrengst van *Desulfovibrio*. Gedurende een zestigtal uren (3/D) zijn dertig waarnemingen verricht. De eerste drie waarden (van 0/D tot 1/D) laten een constant verloop zien. Vervolgens is echter een duidelijke daling van de biomassa waar te nemen. Op het tijdstip 7/2.1/D resulteert dit zelfs in een daling van de biomassa van 27%. De waarneming op het tijdstip 7/D, de proef vindt dan gedurende 3/D uren plaats met medium zonder clophen, laat een toename van de biomassa zien van 17%. Dit is een duidelijke indicatie dat clophen inwerkt op de groei van de bacterie (Zie Fig. 10b).

Waarnemingen:

D = 0,05

pyruvaat = 35 mMol/l.

sulfaat = 25 mMol/l.

TIJD (1/D)	EIWIT		OPMERKINGEN
	ext. (nm) mg/l.		
-3	0,125	238	Dit zijn de gemiddeldes van een uur voor, een uur na en de aangegeven waarde.
-2	0,150	285	
-1	0,151	287	
0			STEADY STATE
0 — 6/20	0,136	259	inzet medium met clophen
8/20 — 13/20	0,135	257	
14/20 — 1	0,138	262	
33/20 — 2	0,128	243	
70/20 — 73/20	0,100	190	conc. clophen is 95% van haar maximale: 10 ppm op tijdstip 70/20
7 — 145/20	0,114	217	
Inzet medium zonder clophen op 4/D			

b) Chlooramphenikol

Bij de experimenten met de gesloten kultuur is voor chlooramphenikol een invloed op *Desulfovibrio* geregistreerd. Ook bij deze proef zal daar sprake van kunnen zijn.

Waarnemingen	D = 0,0625
pyruvaat	= 30 mMol/l.
sulfaat	= 25 mMol/l.

TIJD (1/D)	EIWIT mg/l.	SULFAAT mMol/l.	PYRUVAAAT mMol/l.	CHLOORAMFENIKOL mg/l.
-7/16 — -5/16	245	19,0	1,25	-
-4/16 — -1/16	250	19,0	1,25	-
0 — 3/16	253	19,0	1,00	22
4/16 — 7/16	255	18,7	0,70	62
8/16 — 11/16	226	18,7	0,70	96
12/16 — 15/16	184	19,7	0,60	118
26/16 — 19/16	150	20,3	0,30	136
20/16 — 23/16	133	20,0	1,80	150
24/16 — 27/16	94	20,6	4,40	160
28/16 — 31/16	66	21,9	7,20	170
32/16 — 35/16	48	22,9	9,60	
36/16 — 39/16	40	23,6	11,60	
40/16 — 43/16	36	24,4	13,40	
50/16 — 53/16	-	24,9	17,20	
62/16 — 65/16	20	25,3	19,00	

DUPLO	D = 0,05
pyruvaat	= 30 mMol/l.
sulfaat	= 25 mMol/l.

TIJD (1/D)	EIWIT mg/l.	SULFAAT mMol/l.	CHLOORAMFENIKOL mg/l.
0	216	-	
0/20 — 3/20	200	9,7	18
2/20 — 5/20	210	11,2	36
6/20 — 9/20	172	11,2	66
10/20 — 13/20	148	11,2	92
14/20 — 17/20	133	11,8	110
18/20 — 21/20	103	12,1	120
22/20 — 25/20	73	11,7	140
26/20 — 29/20	45	12,5	152
30/20 — 33/20	29	12,4	
40/20 — 43/20	15	13,2	

In Figuur 15 zijn verschillende curves getekend, welke beschreven zullen worden.

a) Curve a

Deze curve stelt de theoretische toename van de nieuw toegevoegde component voor. In dit geval is dat chlooramphenikol. In Fig. 11 is reeds sprake geweest van deze curve. De maximale concentratie chlooramphenikol, welke mogelijk is, is 180 ppm. Aangezien deze concentratie van de chlooramphenikol de veelvoudige is van de dodelijke, is het verstandig, ter vergroting van de nauwkeurigheid, in zo'n geval de proef te herhalen met een kleinere maximale concentratie. Juist in het gebied rond de dodelijke concentratie moet de toename per tijdseenheid van de toxische component zo klein mogelijk zijn. Dit is het geval bij een concentratie die vlak bij haar maximale is.

b) Curve b

Dit is de curve welke de biomassa van de bacterie kultuur, uitgedrukt in mg eiwit, voorstelt. De waardes stellen wederom de gemiddelden van groepjes waarnemingen voor. De waarnemingen afzonderlijk zijn eveneens bepaald in duplo.

De hoeveelheid eiwit, welke gedurende de steady state gemeten is, komt overeen met de te verwachten hoeveelheid. Dertig mMol pyruvaat geeft in een medium dat genoeg trypticase en gistextract bevat een eiwit-opbrengst van om en nabij de 240 mg. Zie ook proef VII-B hiervoor.

c) Curve c

De theoretische uitspoelcurve, waarbij de specifieke groeisnelheidsconstante (μ) nul is. Zie hiervoor de Figs 9 en 10a. Deze curve maakt het mogelijk om de dodelijke concentratie van de toxische component exact te bepalen. Het feit dat de steady state bij een overgang van het ene op het andere medium niet erg nauwkeurig is doet nu niet veel meer ter zake, omdat door middel van extrapolatie met behulp van deze theoretische curve dit wisselvallige gebied wel goed bepaald kan worden. De dodelijke concentratie van chlooramphenikol ligt tussen de 60 en 80 ppm.

d) Curve d en e

Dit zijn twee curves welke de geloofwaardigheid van curve b versterken.

Zodra de biomassa afneemt door één of andere reden zal er minder substraat (pyruvaat, curve d) en sulfaat (curve e) gebruikt worden. De verhouding van de hoeveelheden pyruvaat en sulfaat welke gebruikt worden door *Desulfovibrio* is vier op één. De verhouding van de toename van deze twee voedingsstoffen, wanneer ze niet meer gebruikt worden zal eveneens vier op één moeten zijn. Dit komt in de grafiek duidelijk tot uiting.

VI. CONCLUSIE

- De bepaling wordt nauwkeuriger door de maximale concentratie van de toxische component in het gebied van de dodelijke concentratie te kiezen.
- Belangrijk is het een indruk te krijgen of de toxische component zelf eventueel ook onderhevig is aan veranderingen.
- De continue cultuur maakt het mogelijk gedurende enkele generaties lang een organisme te volgen. Door het toevoegen van een toxische component is het mogelijk juist bij deze overgang van generaties veranderingen aan te tonen.

VII. ENKELE LOSSTAANDE PROEVEN MET DESULFOVIBRIO

A. Onderzoek naar een stof die abrupt de groei stopt

Aangezien er constant gemonsterd is, is het van belang dat minimaal gedurende 12 uur de in de fractieverzamelaar stromende suspensie niet meer van samenstelling verandert.

De mogelijkheden voor veranderingen in deze suspensie zijn:

- a. De groei van *Desulfovibrio*
 - b. De groei van een aerob organisme
- ad a) *Desulfovibrio* zal niet of nauwelijks meer kunnen groeien vanwege de volgende redenen:
- Het ontbreken van pyruvaat
 - De aanwezigheid van de voor *Desulfovibrio* zeer toxische zuurstof
- ad b) Aerobe organismen krijgen een grote kans in de fractieverzamelaar om te groeien, vanwege de ruime hoeveelheid trypticase en gistextract, welke aanwezig is. Meestal zijn er cocvormige bacterien aangetroffen.

Om deze groei tegen te gaan is met de volgende stoffen geëxperimenteerd:

2,4 N zoutzuur
 100% trichloorazijnzuur
 70% perchloorazijnzuur
 40% formaline

De experimenten hebben een verschillend karakter gehad:

- a) Bepaling van de troebelheid als maat voor de hoeveelheid biomassa na 15 minuten, 2 uur en 17 uur.
- b) Bepaling van het eiwitgehalte na 15 minuten, 24 uur en 48 uur met nu alleen 0,2 ml 100% trichloorazijnzuur.

ad a) Waarnemingen	D = 0,28			
laktaat	= 0,1 Mol/l.			
sulfaat	= 5,66 mMol/l.			
		15 min.	2 uur	17 uur
2,4 N zoutzuur	0,2 ml	0,265	0,235	0,250
	0,5 ml	0,280	0,324	0,360
	0,8 ml	0,285	0,345	0,360
	1,0 ml	0,296	0,310	0,305
100% trichloorazijnzuur	0,5 ml	0,350		0,415
	1 ml	0,385		0,445
	2 ml	0,460		0,510
	4 ml	0,570		0,340 (neerslag)
70% perchloorazijnzuur	0,2 ml	0,280	0,330	0,350
	0,4 ml	0,280	0,380	0,350
	0,6 ml	0,370	0,380	0,325
	0,8 ml	0,350	0,370	0,305
40% formaline	0,2 ml	0,280	0,192	0,485
	0,6 ml	0,262	0,200	0,225
	1,0 ml	0,230	0,200	0,185
	1,4 ml	0,248	0,195	0,200
blanco		0,235	-	-

Uit deze waarnemingen kunnen niet veel conclusies getrokken worden. Bepalingen van de troebelheid zijn over het algemeen moeilijk te interpreteren, vanwege de dubieusheid van de hele bepaling, zodra er neerslagen gevormd worden. Grote kans bestaat er voor deze neerslagen, aangezien bij de aanwezigheid van een sterk zuur snel

zwavel gevormd kan worden.

De extincties van deze proef zijn bepaald bij een golflengte van 660 nm.

ad b) Waarnemingen $D = 0,194$
 laktaat = 40 mMol/l.
 sulfaat = 15 mMol/l.

Per uur is er gemonsterd, zodat er per monster 17,8 ml suspensie aanwezig was.

Toegevoegd is 0,2 ml 100% trichloorazijnzuur.

	15 min.	24 uur	48 uur
blanko	240	-	-
1	242	290	280
2	294	253	289
3	-	274	296
gemiddeld	268	272	288

De getallen geven de hoeveelheid mg eiwit per liter aan.

Bij alle verdere bepalingen is deze concentratie van trichloorazijnzuur aangehouden. Alvorens tot een bepaling werd overgegaan is er echter vanwege de aanwezigheid van een licht neerslag eerst gedurende 15 sec. geroerd op een mechanische roerder.

Enkele zekere voordelen van deze stof met deze concentratie zijn dat enerzijds deze stof de bacteriewand niet lyseert en dat anderzijds de hoeveelheid die toegevoegd wordt zo klein is dat het volume nauwelijks verandert.

B. Tolerantie van *Desulfovibrio* voor H_2S

Wanneer bacterien groeien onder condities, waarbij de nutrienten niet aangevuld worden en de metabolische producten niet verwijderd worden, is de groei vanzelfsprekend eindig.

Onder omstandigheden dat er wel voldoende nutrienten aanwezig zijn kan door accumulatie van bepaalde uitscheidingsproducten de groei ook beperkt worden.

Gezien het hoog toxische karakter van waterstofsulfide is te verwachten dat *Desulfovibrio* eventueel beïnvloed kan worden door een door haar zelf gevormde te hoog geworden concentratie van waterstofsulfide.

Verschillende onderzoekers zijn hiermee bezig geweest. BAARS

heeft voor de mariene vorm van *Desulfovibrio* een maximale concentratie of maximale productie van waterstofsulfide van 1445 mg/l kunnen aantonen. Wanneer de waterstofsulfide tijdens het verloop van de proef echter verwijderd wordt zal men tot geheel andere uitkomsten kunnen komen. LAWRENCE P. MILLER vond bij toevoeging van een metaal, waardoor de vorming van metaalsulfides, een maximale concentratie van 2000 mg/l. Ook bij het doorblazen van inert gas of het aanvullen van het medium met pepton zijn veel hogere productiecijfers gevonden (LAWRENCE P. MILLER, 1950).

Bij gebruik van een continue cultuur zien we dat het hierboven genoemde probleem niet van belang is en dat een eenvoudige proef ons reeds toelaat conclusies te trekken aangaande de tolerantie van *Desulfovibrio* ten opzichte van waterstofsulfide. Elke toevoeging van nutrienten zal een bepaalde direct evenredige hoeveelheid bacteriemassa kunnen vormen. Tegelijkertijd met de grotere productiviteit van de bacteriemassa zal de hoeveelheid waterstofsulfide, welke gevormd wordt, toenemen.

Wanneer aangetoond kan worden dat door de grotere waterstofconcentratie de evenredigheid van nutrient en bacteriemassa mank gaat lopen is het bewijs geleverd voor haar toxiciteit.

Uitvoering

Het medium heeft dezelfde samenstelling als hiervoor reeds behandeld met de volgende variatie:

Gistextract 0,2 ml/l

Trypticase 0,2 ml/l

Verhouding Molfracties van laktaat en sulfaat: 2,5

Het toevoegen van de sulfaat en de laktaat tijdens de proef gaf herhaaldelijk aanleiding tot het bezoek van ongenode gasten. Een oplossing hiervoor is achteraf gevonden in het aanbouwen van een erlemeyer aan het voedingsvat, waardoor geen nieuwe verbindingen gemaakt hoefden te worden (Zie hiervoor schema fig. 8).

Resultaten (Fig. 16)

mMol sulfaat influent	mMol sulfaat effluent	mMol sulfaat verbruikt	mg Eiwit
5,3	1,6	3,7	57
9,2	2,0	7,2	108
4,7	0	4,7	76
11,5	0	11,5	285 ?
15,0	0,7	14,3	228

De dilution rate van het experiment is niet geheel constant geweest, nl. $0,14 < D < 0,2$. Het experiment moest steeds afgebroken worden waardoor deze variatie is ontstaan. De marge, waarin de dilution rate varieert, heeft echter geen aanleiding gegeven geen waarde te hechten aan de waarnemingen (HERBERT *cs.*, 1956).

Conclusies

- Per mMol sulfaat is 16 mg eiwit gevormd
- Uit deze gegevens kan geen invloed van waterstofsulfide op de groei van *Desulfovibrio* geregistreerd worden.

In eerste instantie is de proef ingezet met een zeer ruime overmaat aan substraat (laktaat). Het is toen echter niet mogelijk geweest een steady state te bereiken. Een verklaring hiervoor kan mogelijk gezocht worden in substraat-inhibitie.

C. Invloed van ijzer op de groei van *Desulfovibrio* in een chemostaat

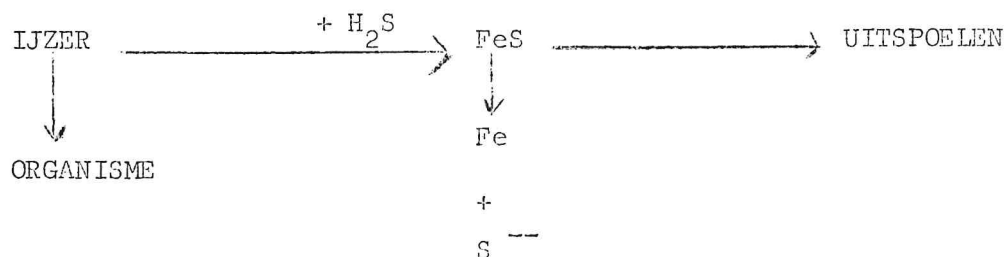
Bij alle media die voorgeschreven zijn voor een *Desulfovibrio* kultuur komt de component ijzer voor. In de loop der tijden heeft men daar verschillende functies aan toegedacht.

BEYERINCK en VAN DELDEN voegden ijzer toe uit hoofde van het verkrijgen van een goede indicator. ELION deed dit, denkende dat ferro-sulfaat een goede zuurstofbinder is. BAARS heeft een gesloten cultuur laten groeien in een medium dat steeds minder ijzer bezat door middel van overentingen in media zonder ijzer. Ondanks het feit dat hij tot niet meetbare ijzerconcentraties is gekomen, heeft hij de invloed daarvan niet kunnen aantonen.

Hoemeer er echter over het ademhalingsmechanisme van *Desulfovibrio* bekend is geworden, des te meer suggereert datzelfde mechanisme de noodzaak van ijzer vanwege de aanwezigheid van haemcomplexen. Door een toevalligheid zijn bij 3 proeven van VII-B media gemaakt met een tien maal zo kleine concentratie aan ijzer, te weten: 0,0003 mg/l. Onder die omstandigheden is het niet gelukt de cultuur in een steady state te laten groeien. Bij proeven hierop volgend met de normale hoeveelheid ijzer, maar verder onder exact dezelfde omstandigheden, sloeg de cultuur wel aan.

Een verklaring waarom in een gesloten cultuur niet en in open cultuur wel de noodzaak van ijzer is aan te tonen is door

VOSJAN als volgt gegeven:



Zodra door de vorming van waterstofsulfide het ijzer in de vorm van ijzersulfide kan verdwijnen, zal de vrije ijzer voor het metabolisme te kleine concentraties kunnen aannemen, waardoor het organisme uit gaat spoelen. Hierdoor wordt er minder waterstof-sulfide geproduceerd, waardoor het organisme weer meer ijzer ter beschikking krijgt. Op deze wijze is dus geen steady state te verkrijgen.

VIII. AANHANGSEL

Bepaling eiwitgehalte

De bepaling is gedaan volgens ~~BOHR~~INGER met biureetreagens.

Tien ml afgecentrifugeerde cellen worden met een zoutzurige natrium-chloride oplossing behandeld om de waterstofsulfide te verwijderen. Na toevoeging van de biureetreagens wordt op de spectrofotometer gemeten bij $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Principe: Hawks physiological chemistry pg 179-180.

Bepaling sulfaatgehalte

In zuurmilieu ontstaat een troebeling van bariumsulfaat als barium-chloride toegevoegd wordt aan een oplossing die sulfaat bevat.

De troebeling wordt op de spectrofotometer gemeten bij $\lambda = 420$.

Het reagens bevat reeds bariumsulfaat als condensatiedeeltjes.

Bepaling pyruvaatgehalte

Pyrodruivezuur reageert met 2-4-dinitrofenylhydrazine tot 2-4-dinitrofenylhydrazon; dit vormt met sterke loog een rode verbinding welke fotometrisch bepaald kan worden. Andere ketonzuren reageren eveneens met 2-4-dinitrofenylhydrazine. Het pyruvaathydrazon kan echter kwantitatief geëxtraheerd worden met 10% natriumcarbonaat.

IX. LITERATUUR

- ANDERSON, J.M., 1971. Assesment of the effects of pollutants on physiology and behaviour.-Proc. R. Soc. Lond. B 177: 307-320.
- BAARS, J.K., 1930. Over sulfaatreduktie door bacterien. Thesis Meinema, Delft.
- BILLEN, G., 1972. Etude des transformations du mercure dans les sediments d'une riviere. Université libre de Bruxelles.
- BILLEN, G., J. CLAUDE & R. WODLAST. Conversion of mercury compounds in the sediments of a river (manuscript).
- BOWDEN, K.F., 1965. In: J.P. RILEY & G. SKIRROW. Chemical oceanography, Academic Press, London: 43-72.
- BRYAN, G.W., 1971. The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms.-Proc. R. Soc. B 177: 389-410.
- DUURSMA, E.K. & M. MARCHAND, 1974. Aspects of organic marine pollution.-Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 1974 (in press).
- FURUKAWA, K., T. SUZUKI & K. TONOMURA, 1969. Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria.-Agr. Biol. Chem. 33 (1): 128-130.
- GONS, H.J., 1972. Desulfovibrio in een chemostaat met sulfaat als beperkende faktor. Intern Verslag Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee, Texel: 1972-12.
- GRASHUIS, J., 1963. Antibiotica als geneesmiddel. Bruna & Zoon, Utrecht.
- HALLBERG, R.O., 1970. An apparatus for the continuous cultivation of sulfatereducing bacteria and its application to geomicrobiological purposes.-Antonie van Leeuwenhoek 36: 241-254.
- , 1972. Iron and zinc sulfides formed in a continuous culture of sulfate-reducing bacteria.-Neues Jb. Miner. Mh. 11: 481-500.
- , 1972. Sedimentary sulfide mineral formation. An energy circuit system approach.-Mineral. dep. (Berl.) 7: 189-201.
- HALLBERG, R.O., L.E. BAGANDER, A.G. ENGVALL & F.A. SCHIPPEL, 1972. Method for studying geochemistry of sediment-water interface.-Ambio 1 (2): 71-72.
- HERBERT, D., 1958. Some principles of continuous culture. In: G. TUNEVALL. Recent Progress in Microbiology. Stockholm.
- HERBERT, D., R. ELSWORTH & R.G. TELLING, 1956. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study.-J. gen. Microbiol. 14: 601-622.

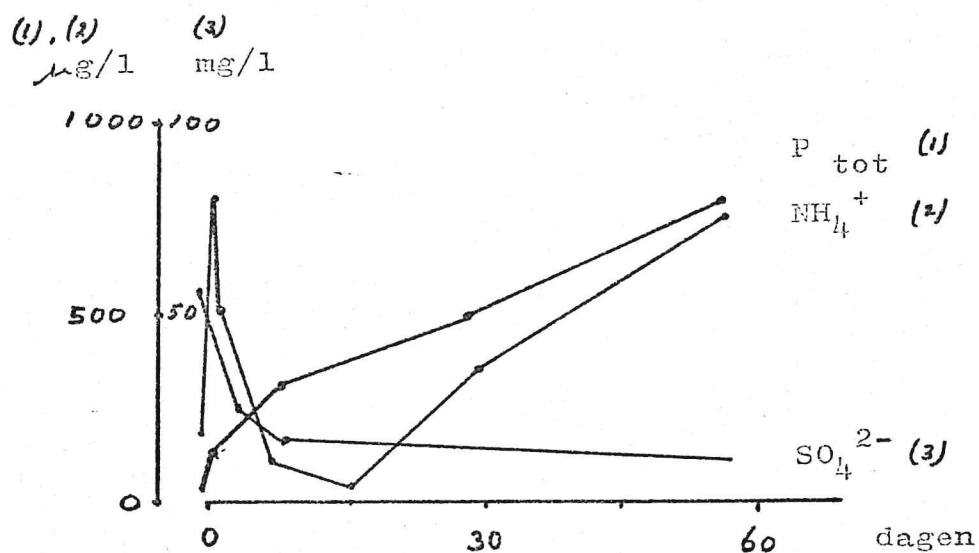
- KEIL, J.E. & S.H. SANDIFER, 1972. DDT and polychlorinated biphenyl effects of uptake on *E. Coli* growth.-*Water Research* 6: 837-841.
- MAAS, M., 1969. Cytolysis of yeast by surfactants, Broder-offset, Rotterdam.
- MAHLER, H.R. & E.H. CORDES, 1969. Biological chemistry. Harper & Row, London.
- MEYERS, D., 1973. Microorganismen en geologie. Doktoraalscriptie, Amsterdam.
- MILLER, L.P., 1950. Tolerance of sulfate reducing bacteria to hydrogen sulfide.-*Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.* 16: 73-83.
- NIEMI, A., 1972. Effects of toxicants on brackish-water phytoplankton assimilation.-*Commentat. biol.* 55: 1-19.
- POSTGATE, J., 1966. Enrichment and isolation of sulfate reducing bacteria.-*Lab. Pract.* 15: 1239-1244.
- POSTMA, H., 1967. Marine pollution and sedimentology. In: Th. A. Olson & F.J. Burgess. *Pollution and marine ecology*. Interscience: 225-234.
- ROSKAM, R. Th., 1965. Kopervergiftiging in de zee.-*Wat. Bodem Lucht* 56: 19-23.
- SALEH, A.M., 1964. Differences in the resistance of sulfate reducing bacteria to inhibitors.-*J. gen. Microbiol.* 37: 113-121.
- SAWYER, C.N. & P.L. MCCARTHY, 1967. Chemistry for sanitary engineers. McGraw-Hill, London.
- SOHNGEN, N.L., 1914. Verslag over het onderzoek naar de oorzaken van het ontstaan van de stank van de Haagsche grachten en aanwijzingen ter verbetering, 's Gravenhage.
- STARKA, J., 1968. Physiology und Biochemie der Mikroorganismen. Veb Gustav Fischer Verlag Jena, 1968: 1-608.
- STEALMAN NIELSEN, E., 1960.-*A. Rev. Pl. Physiol.* 11: 341-362.
- TIJSSSEN, S.B., 1969. Hydrographical and chemical observations in the Southern Bight, February, May, August and November 1968.-*Annls Biol.* 20: 25.
- VERWEY, J., 1952. On the ecology of distribution of cockle and mussel in the Dutch Waddensea, their role in sedimentations and the source of their foodsupply.-*Archs néerl. Zool.* 10 (2): 172-239.
- VOSJAN, J.H., 1970. ATP generation by electron transport in *Desulfovibrio desulfuricans*.-*Antonie van Leeuwenhoek* 36: 585-587.
- , 1974. Sulphate in water and sediment of the Dutch Wadden Sea.-

- KEIL, J.E. & S.H. SANDIFER, 1972. DDT and polychlorinated biphenyl effects of uptake on *E. Coli* growth.-*Water Research* 6: 837-841.
- MAAS, M., 1969. Cytolysis of yeast by surfactants, Broder-offset, Rotterdam.
- MAHLER, H.R. & E.H. CORDES, 1969. Biological chemistry. Harper & Row, London.
- MEYERS, D., 1973. Microorganismen en geologie. Doktoraalscriptie, Amsterdam.
- MILLER, L.P., 1950. Tolerance of sulfate reducing bacteria to hydrogen sulfide.-*Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.* 16: 73-83.
- NIEMI, A., 1972. Effects of toxicants on brackish-water phytoplankton assimilation.-*Commentat. biol.* 55: 1-19.
- POSTGATE, J., 1966. Enrichment and isolation of sulfate reducing bacteria.-*Lab. Pract.* 15: 1239-1244.
- POSTMA, H., 1967. Marine pollution and sedimentology. In: Th. A. Olson & F.J. Burgess. *Pollution and marine ecology*. Interscience: 225-234.
- ROSKAM, R. Th., 1965. Kopervergiftiging in de zee.-*Wat. Bodem Lucht* 56: 19-23.
- SALEH, A.M., 1964. Differences in the resistance of sulfate reducing bacteria to inhibitors.-*J. gen. Microbiol.* 37: 113-121.
- SAWYER, C.N. & P.L. MCCARTHY, 1967. Chemistry for sanitary engineers. McGraw-Hill, London.
- SOHNGEN, N.L., 1944. Verslag over het onderzoek naar de oorzaken van het ontstaan van de stank van de Haagsche grachten en aanwijzingen ter verbetering, 's Gravenhage.
- STARKA, J., 1968. *Physiology und Biochemie der Mikroorganismen*. Veb Gustav Fischer Verlag Jena, 1968: 1-608.
- STEALMAN NIELSEN, E., 1960.-*A. Rev. Pl. Physiol.* 11: 341-362.
- TIJSSSEN, S.B., 1969. Hydrographical and chemical observations in the Southern Bight, February, May, August and November 1968.-*Annls Biol.* 20: 25.
- VERWEY, J., 1952. On the ecology of distribution of cockle and mussel in the Dutch Waddensea, their role in sedimentations and the source of their foodsupply.-*Archs néerl. Zool.* 10 (2): 172-239.
- VOSJAN, J.H., 1970. ATP generation by electron transport in *Desulfovibrio desulfuricans*.-*Antonie van Leeuwenhoek* 36: 585-587.
- , 1974. Sulphate in water and sediment of the Dutch Wadden Sea.-

- Neth. J. Sea Res. 8 (2) (In press).
- VOSJAN, J.H. & C.F. BEKE, 1971. Sulfaat in water en sediment van de Waddenzee. Intern Verslag Nederland Instituut voor Onderzoek der Zee, Texel 1971-11.
- VOSJAN, J.H. & G.J. VAN DER HOEK, 1972. A continuous culture of *Desulfovibrio* on a medium containing mercury and copper ions, - Neth. J. Sea Res. 5: 440-444.
- WIBAUT-ISEBREE MOENS, N.L., 1916. Bijdrage tot de kennis omtrent de vervuiling van water in en om Amsterdam. Amsterdam: 1-46.

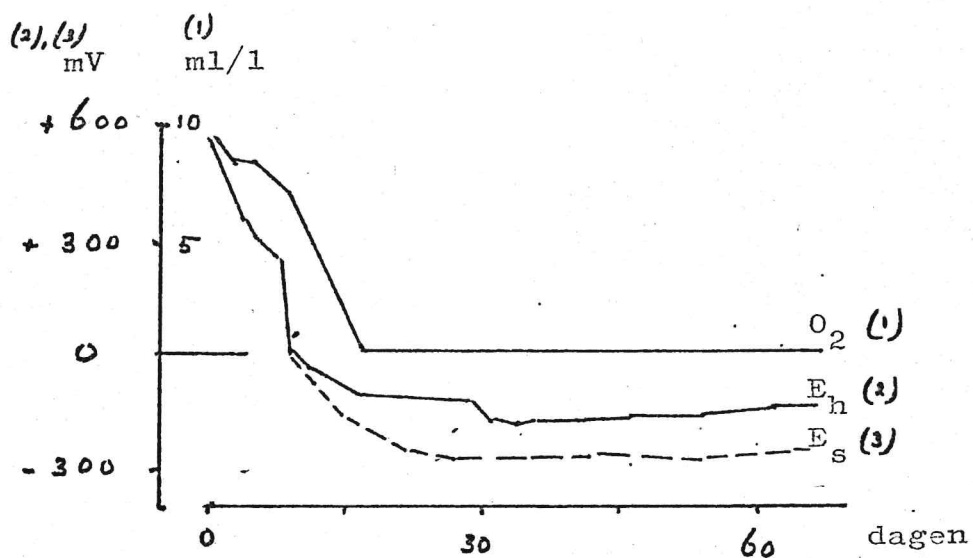
Figuur 1.

Variatie van anorganische nutriënten gedurende een chemische 'turn-over'.



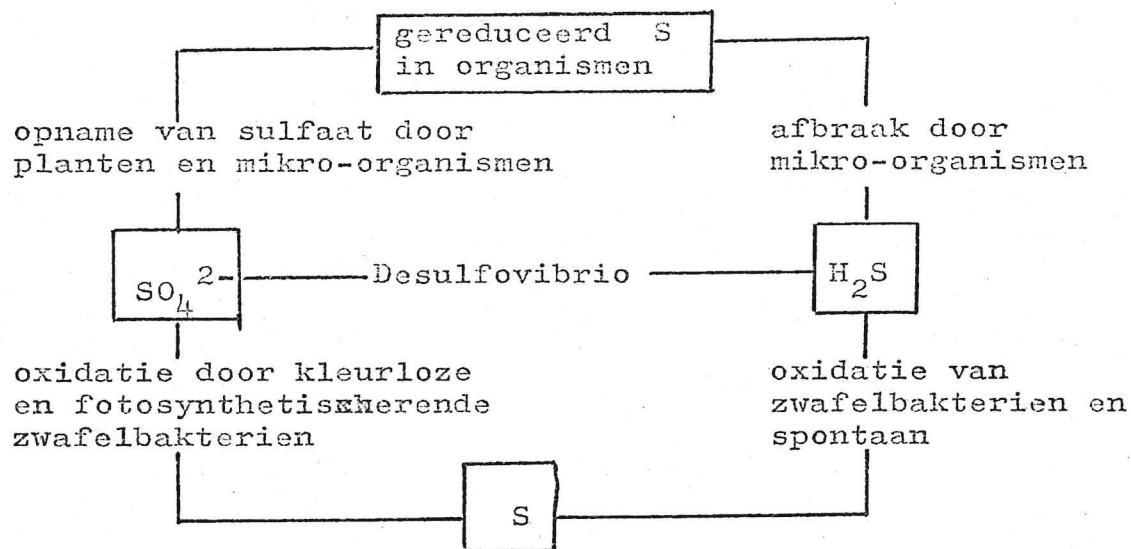
Figuur 2.

Variatie van fysisch-chemische factoren gedurende een chemische 'turn-over'.



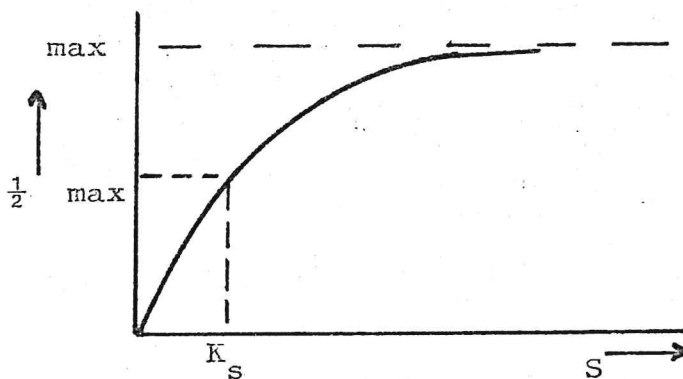
Figuur 3

Schema van de zwafelcyclus (STANIER ET AL. ,1970)

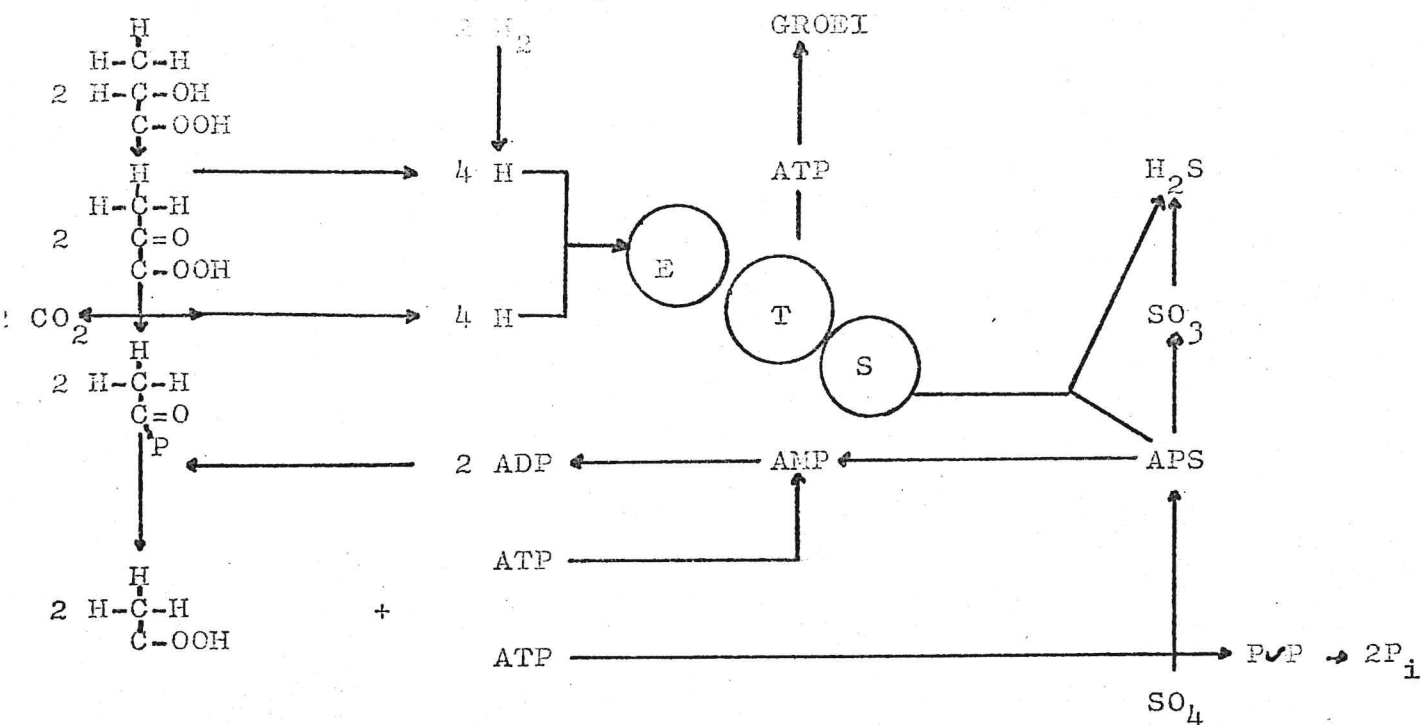


Figuur 4

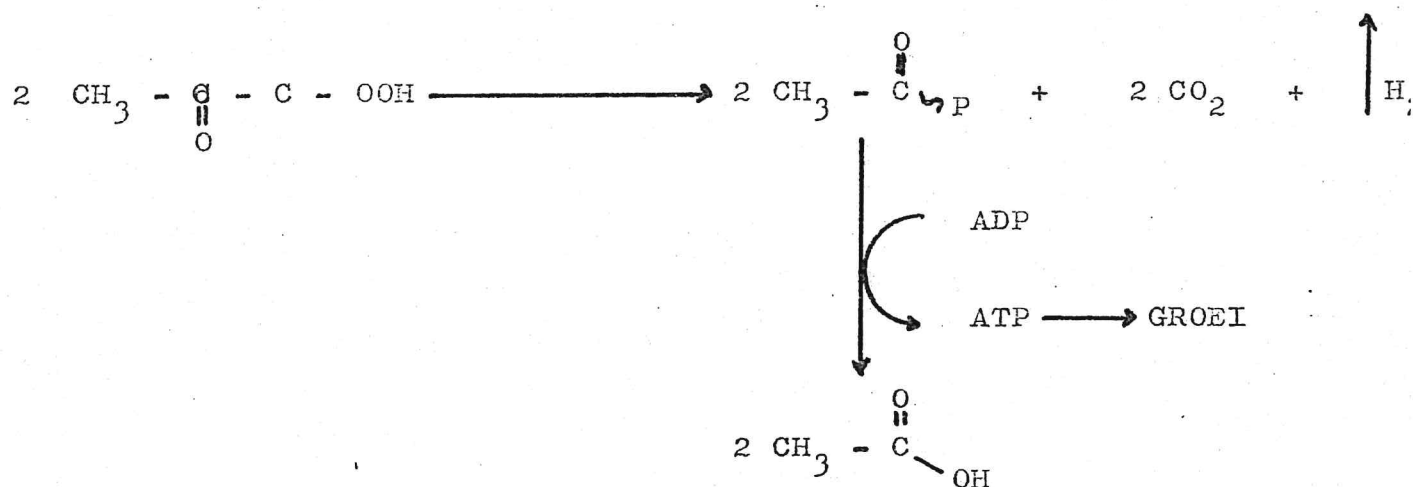
Michaelis Menten plot



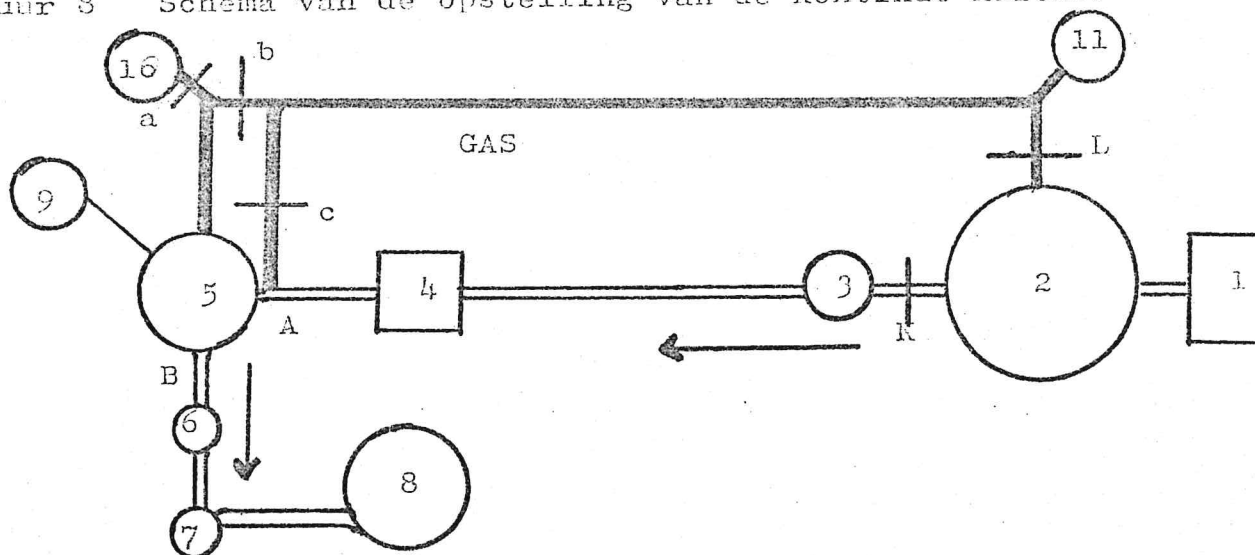
Figuur 5 Schema sulfaat-ademhaling van Desulfovibrio (VOSJAN, 1970)



Figuur 6 Schema fermentatie van Desulfovibrio



Figuur 8 Schema van de opstelling van de continue kultuur



1 erlemeyer (proef VIII-A)

2 voorraadvat

3 buret

4 peristaltische pomp

5 cultuurvat

6 bakterieval

7 zuurstofval

8 fraktieverzamelaar

9 thermometer met infraroodlamp

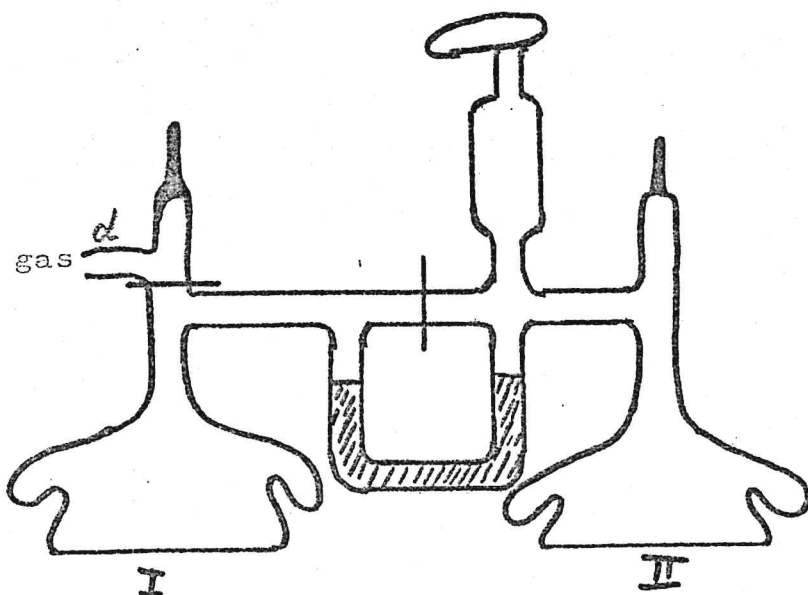
10 monsterbuis

11 N₂ cylinder

a b c klemmen, waarmee het mogelijk wordt ook direkt uit het cultuurvat te monsten. Te weten b gesloten ; a en c open .

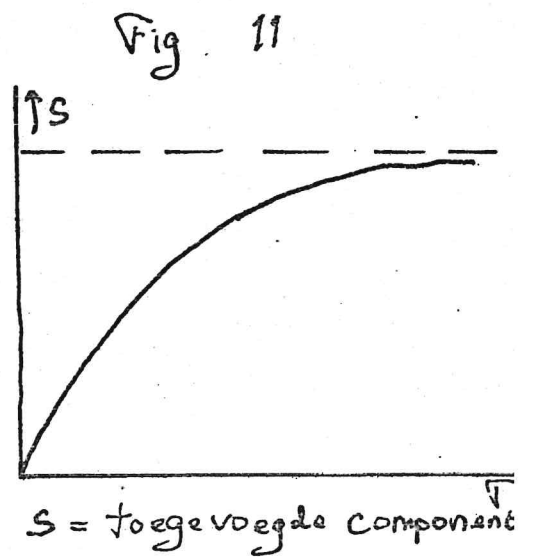
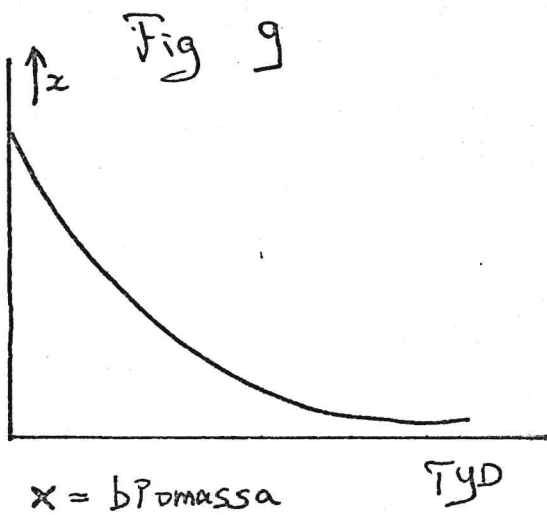
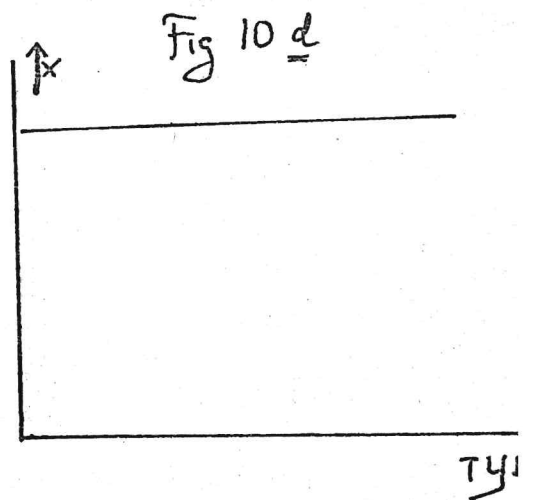
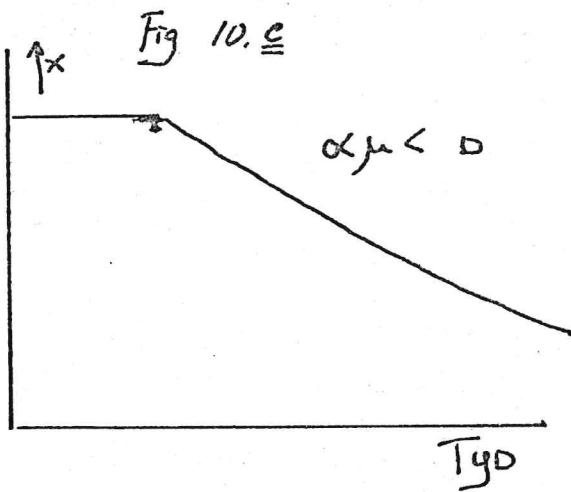
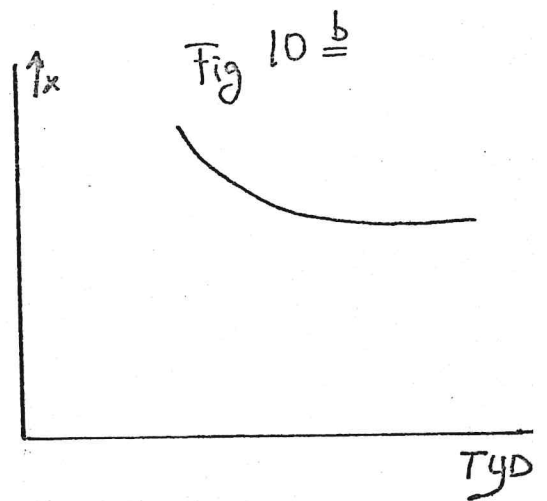
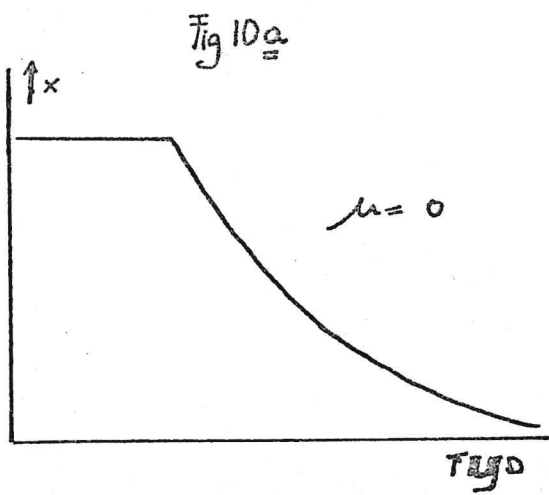
K L verbindingsstukken

Figuur 7 Respiratormeter van Gilson



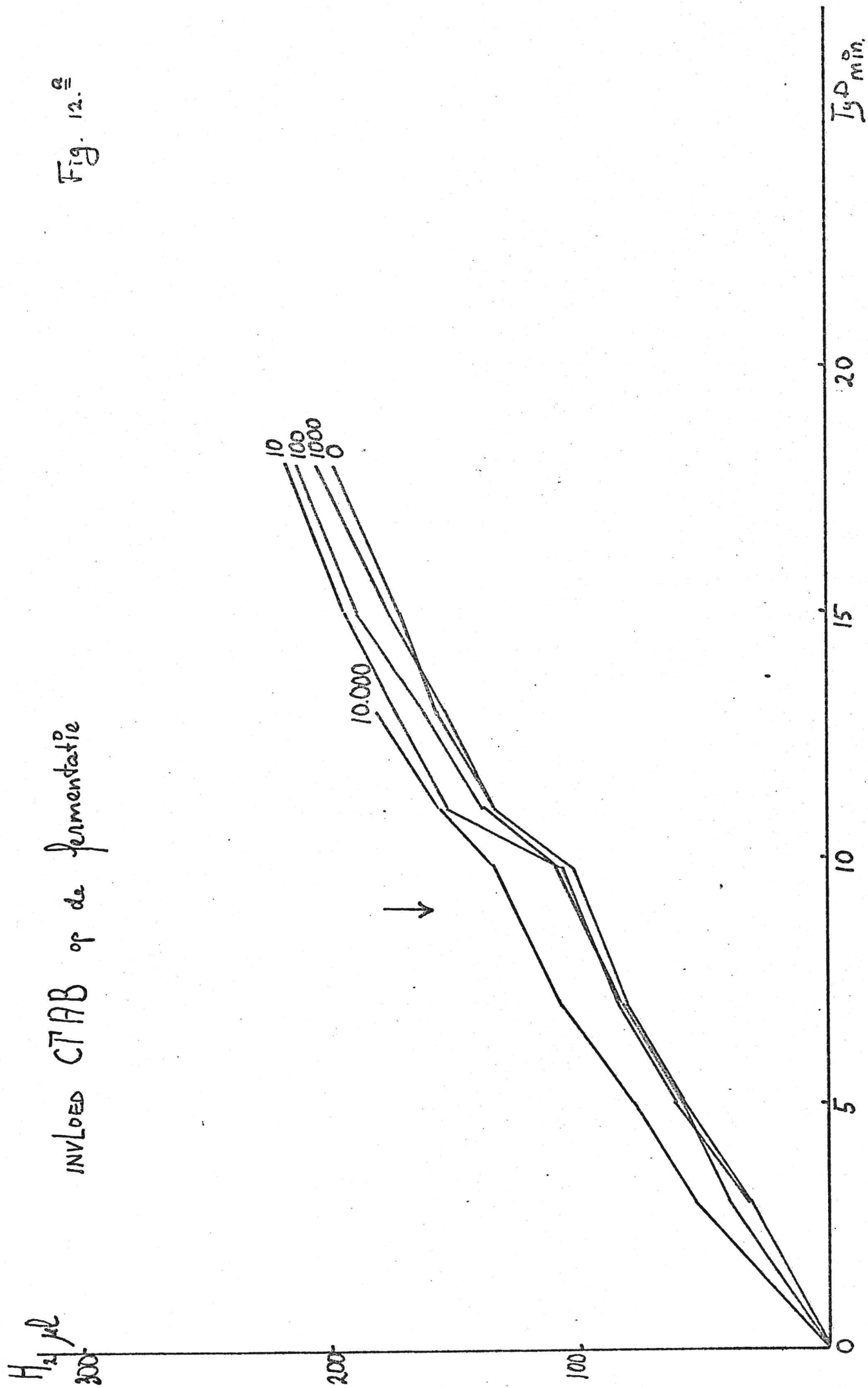
I referentievat

II reaktievat



INVLOED CTAB op de fermentatie

Fig. 12.



Inloed CTAB op de Respiratie

Fig. 12 $\frac{b}{2}$

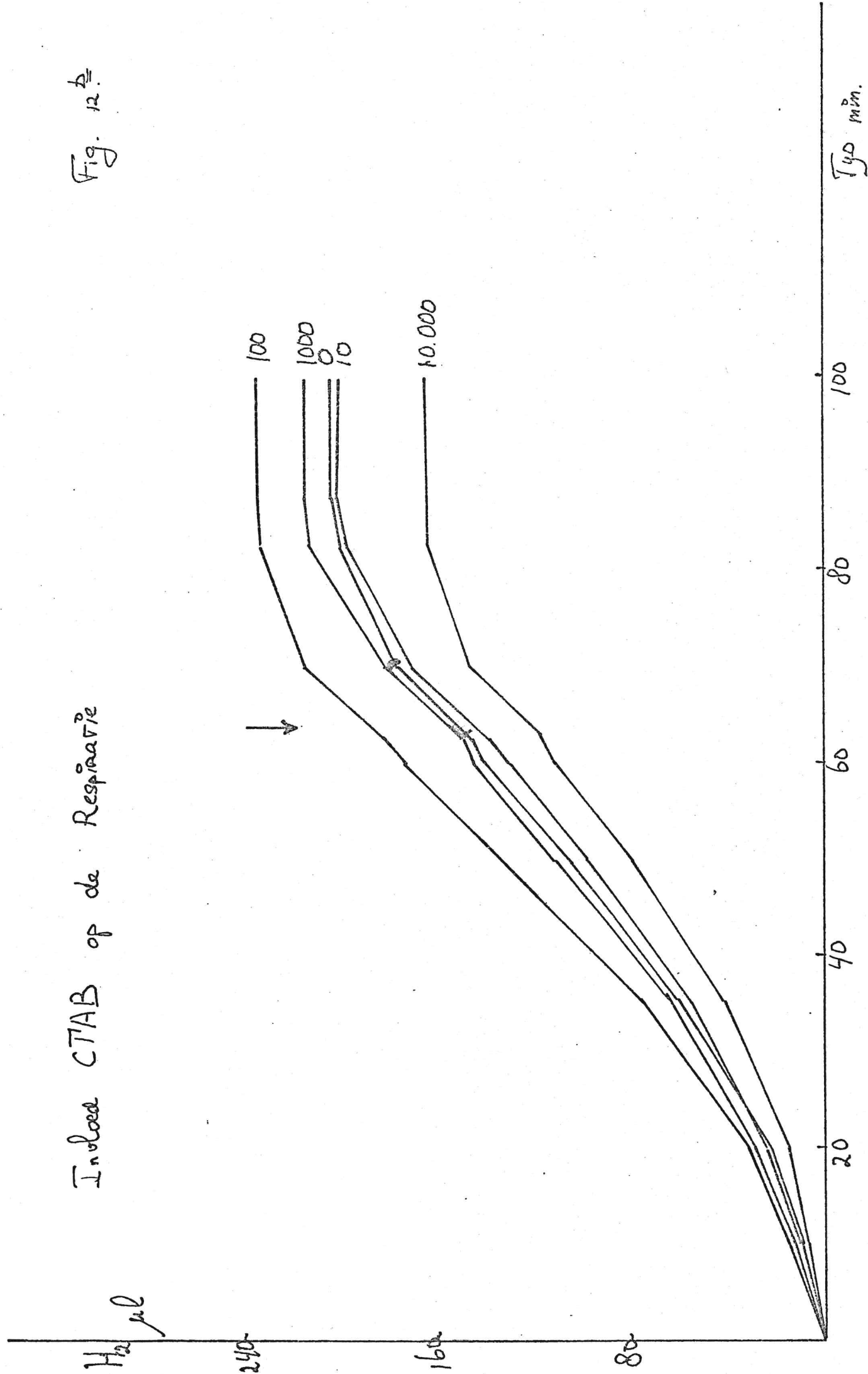
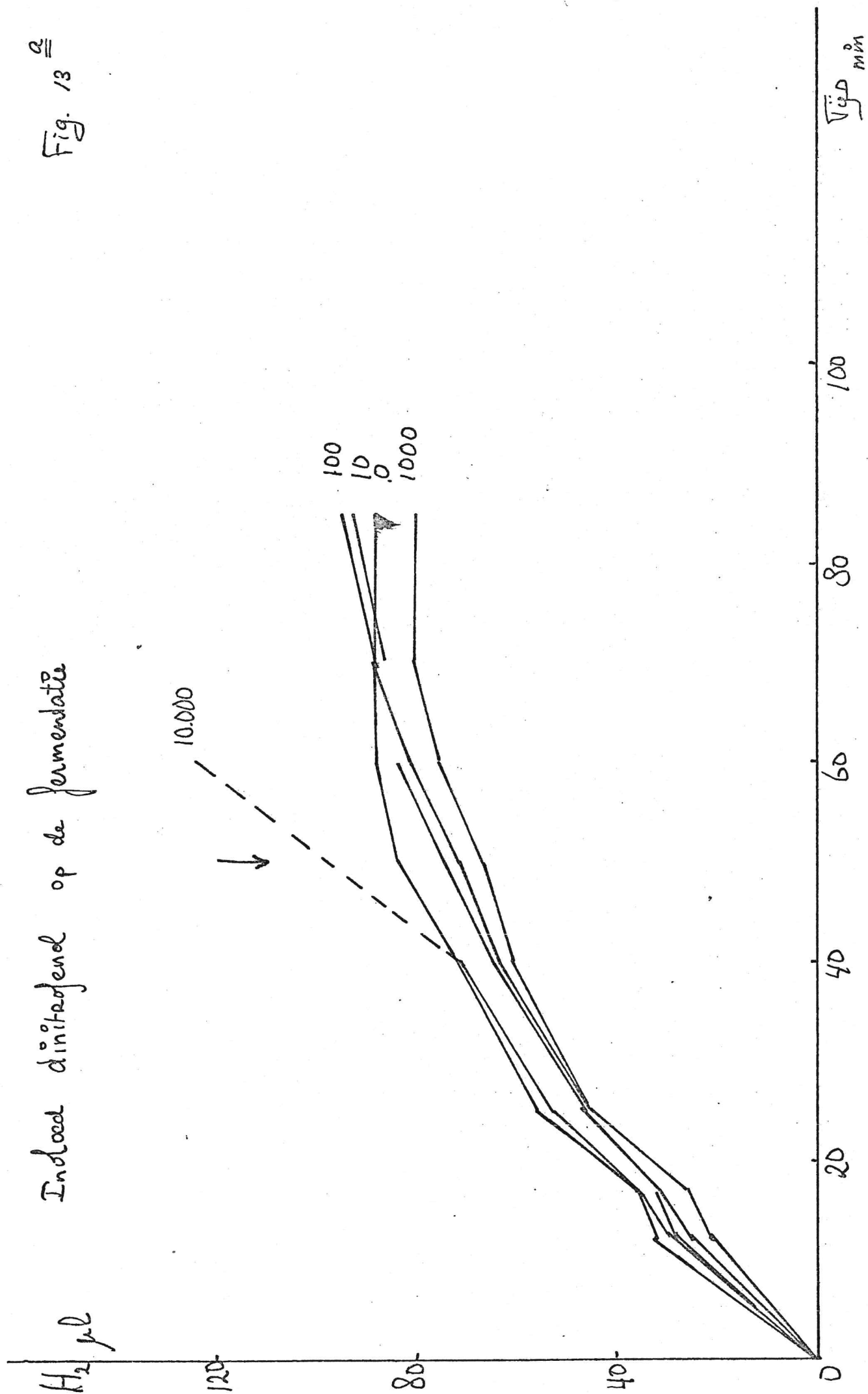


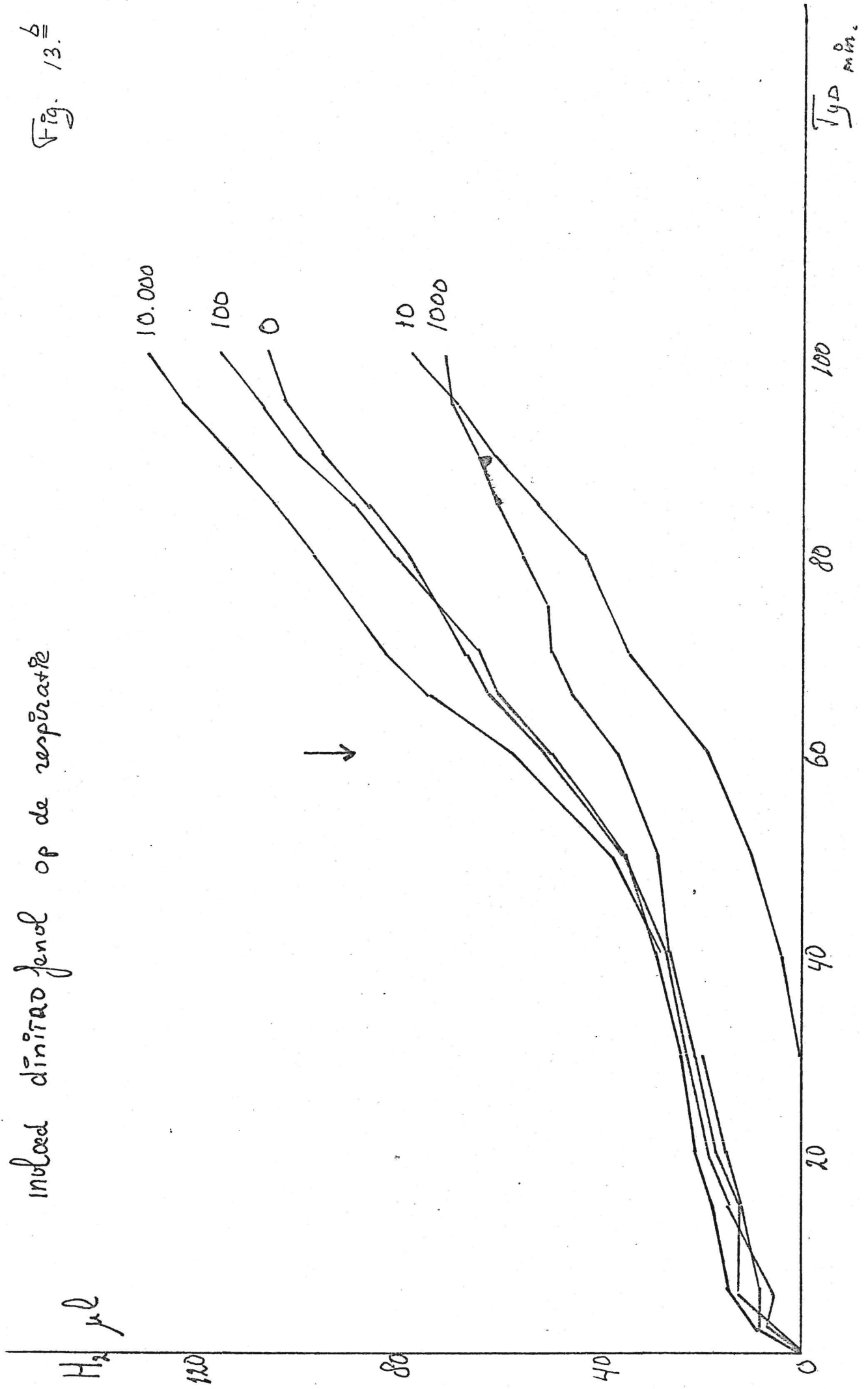
Fig. 13^a

Invloed dinitrofenol op de fermentatie



invloed dinitraatfenol op de respiratie

Fig. 13. ^b



Involad dinitrofenol op la Respiratio

Fig. 13.

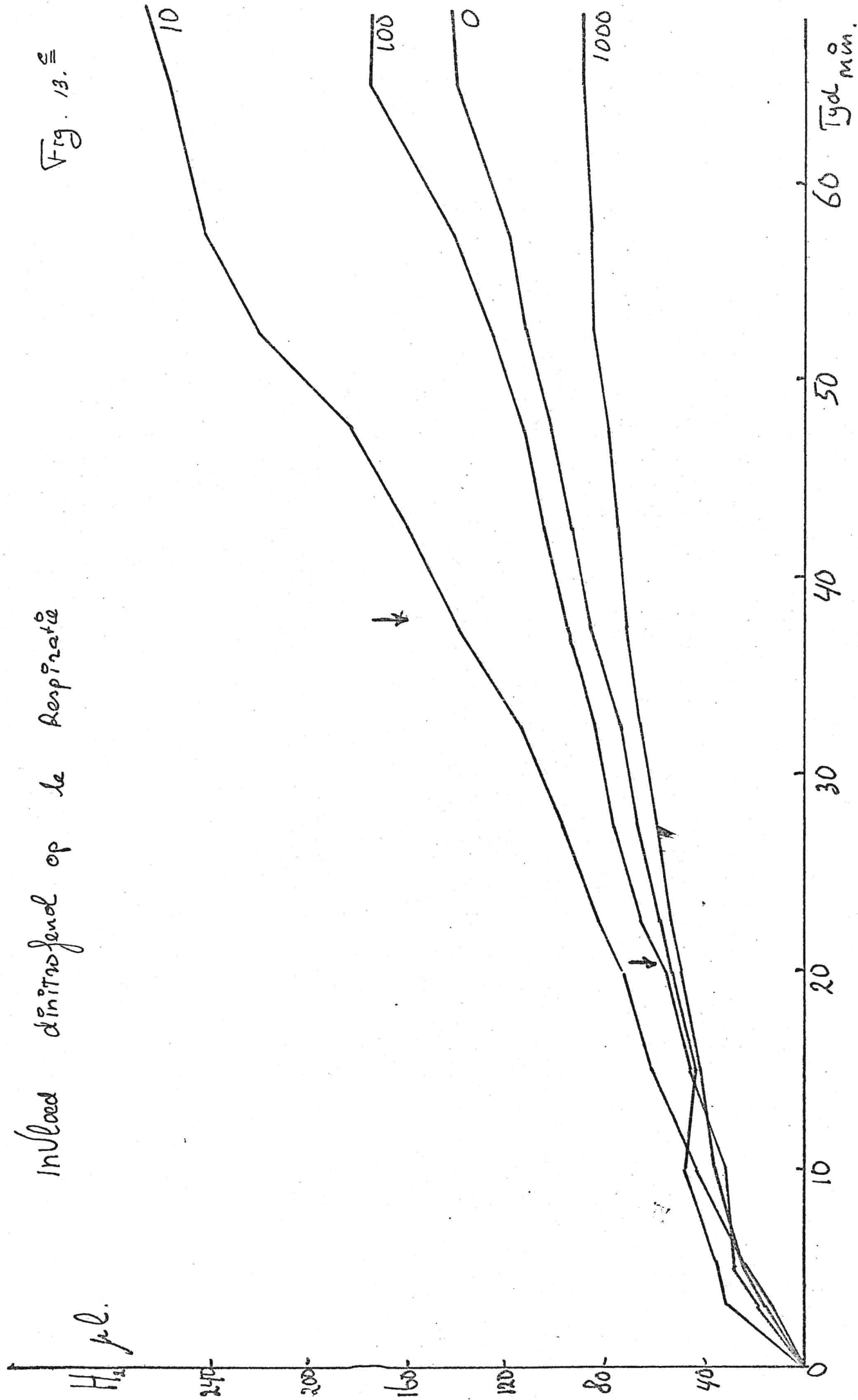
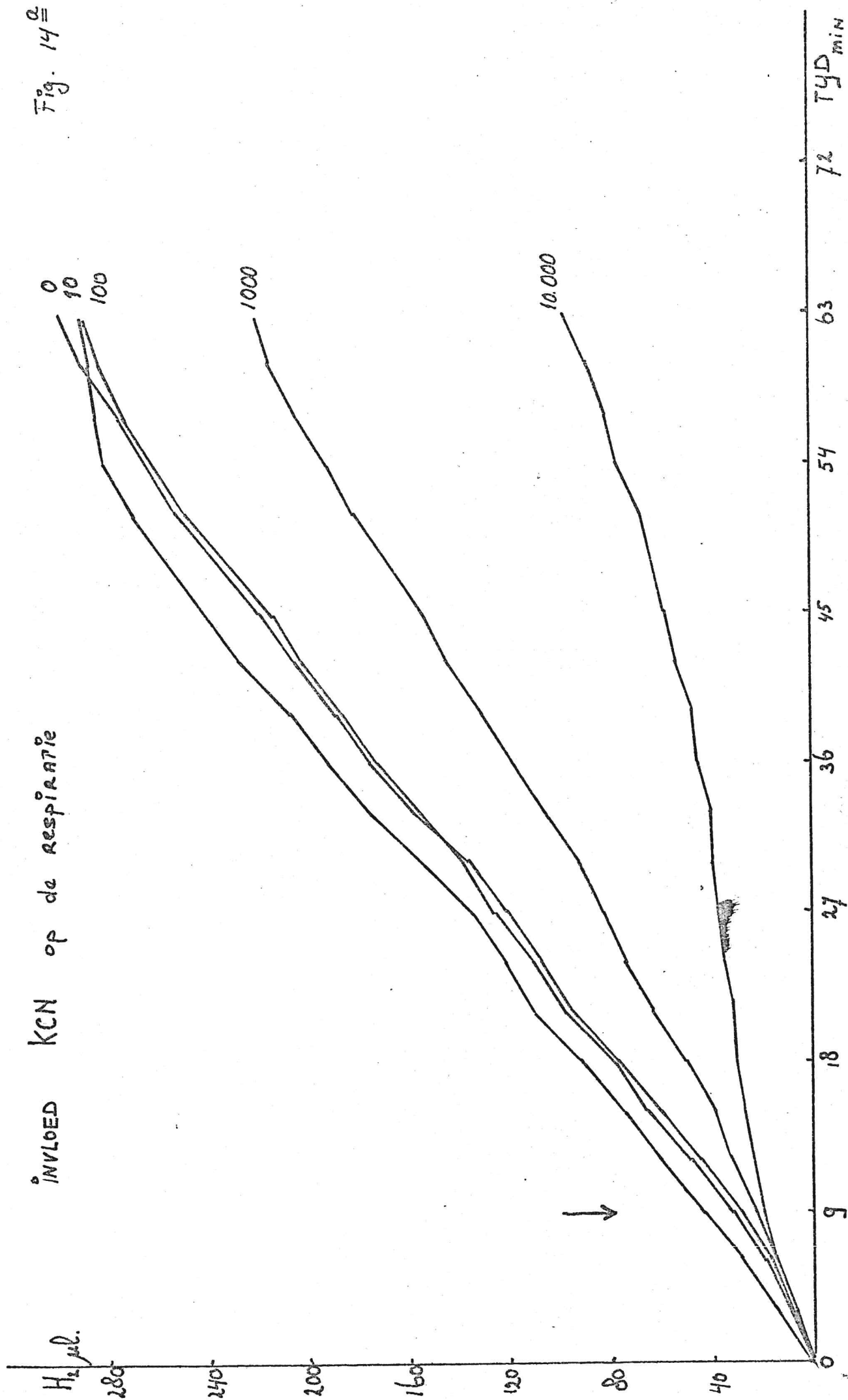
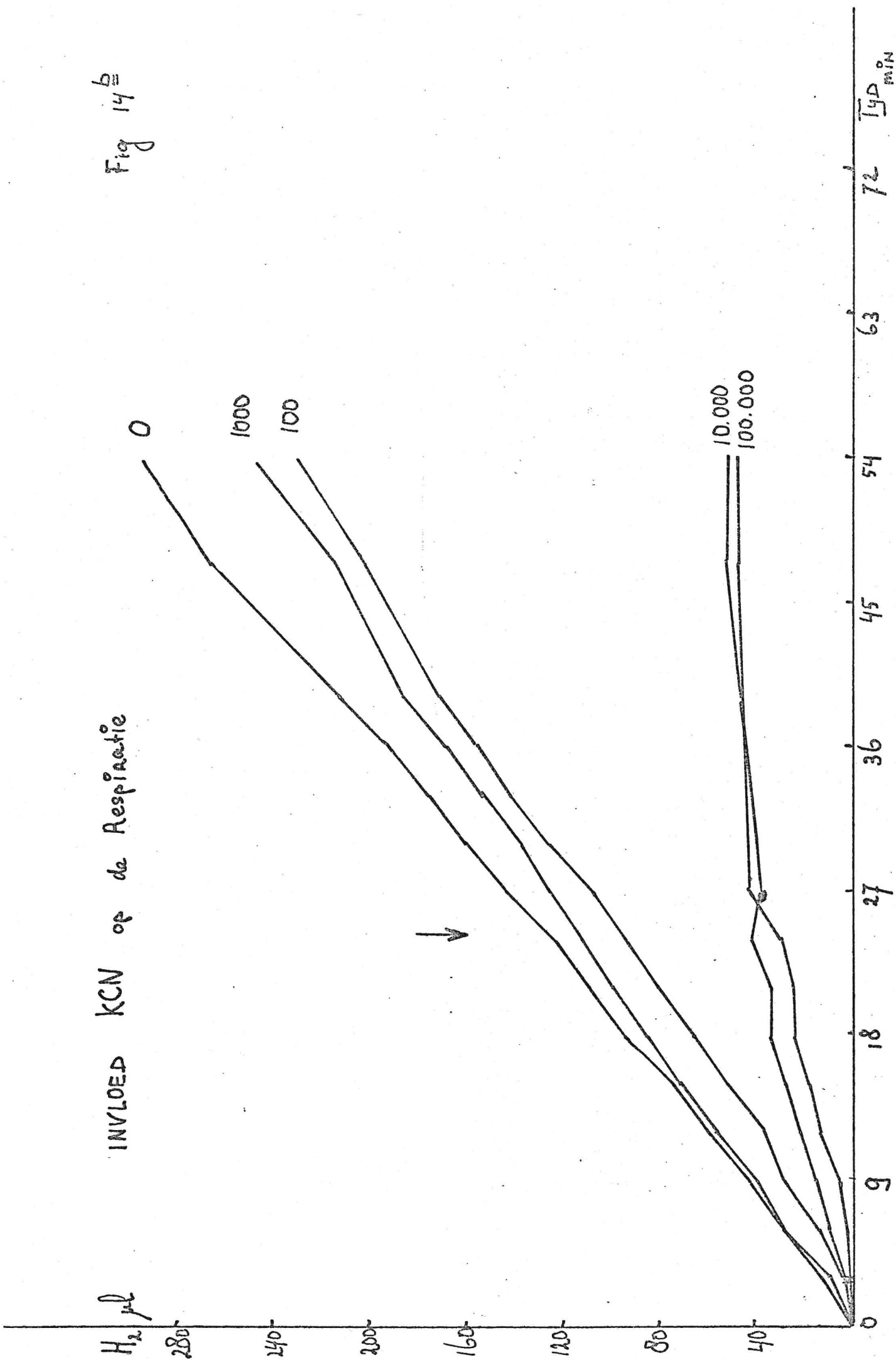


Fig. 14^a



INVLOED KCN op de Respiratie

Fig 14^b



MG.
EWIT (*)

m. Mol
PYRUVATE (o)

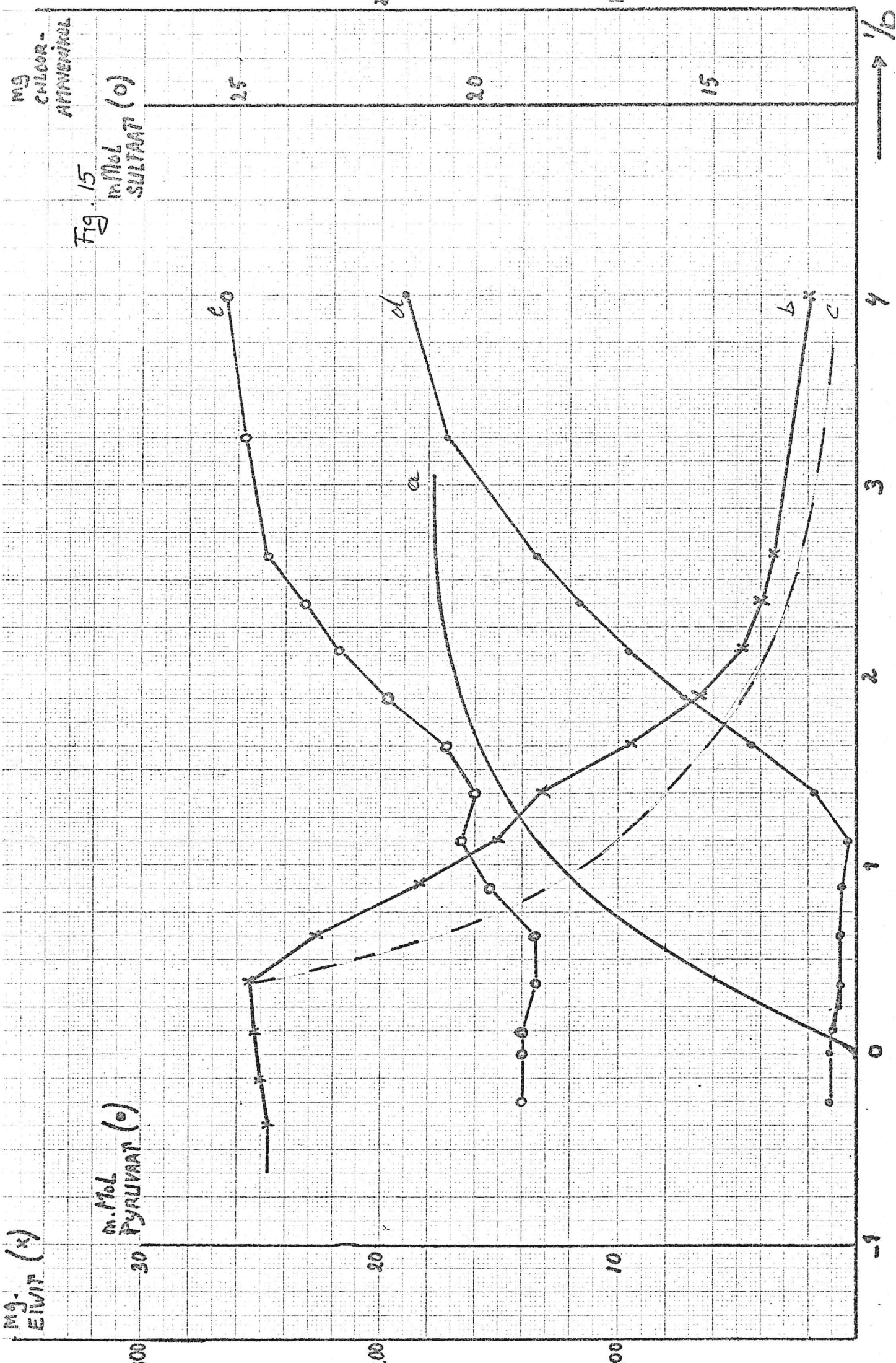


Fig. 16.

