

HET VRAAGSTUK DER CELLULOSE-GISTING

DOOR

Dr. J. LORIE.

Gistingsverschijnselen zijn sedert eeuwen bekend, het oudste vermelde dagteekent van onmiddellijk na den zondvloed, toen de aarde nog ternauwernood droog was.

Eenen tegenhanger daarmede vormt het in dit opstel besprokene, waaromtrent de geleerden het nog niet geheel met elkander eens zijn en dat dus *eenig in zijne soort* genoemd mag worden. Ik wensch daarvan een overzicht te geven, ook, omdat het voor ons vaderland van actueel belang is, zooals later zal blijken.

Spoedig viert het vraagstuk zijn gouden feest, want den 18^{den} Maart 1850 werd het voor het eerst door MITSCHERLICH¹ te berde gebracht, en daarbij het volgende medegedeeld.

Wanneer men versche aardappelschijfjes eenigen tijd, bij niet te lage temperatuur, in water laat staan, scheiden zich de cellen van elkander, vervolgens vergaan de celwanden en de zetmeelkorrels worden vrij. Spoediger treedt het verschijnsel op, wanneer men, bij de versche schijfjes, halfverrotte voegt of ook het daarvan afgefiltreerde vocht. In de vloeistof was geen spoor van schimmel te ontdekken, wel wemelde zij van »*Vibrionen*'' (vorm van bacteriën), die vermoedelijk het werkzame bestanddeel zijn. In welke stof de cellulose werd omgezet, kon MITSCHERLICH vooralsnog niet vaststellen. Van eene gas-

¹ MITSCHERLICH: *Ueber die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle.* (Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Aus dem Jahre 1850).

ontwikkeling maakte hij geene melding, allicht had zij zoo langzaam plaats, dat zij aan de waarneming ontsnapte.

Of deze verschijnselen met de volgende identisch zijn, is bij mij nog aan twijfel onderhevig. Mocht zulks niet het geval zijn, dan wordt het gouden feest tot een zilveren teruggebracht, want het was eerst in 1875, dat geregelde proeven genomen werden door eenen Rus, Dr. LEO POPOFF.

Hij liet¹ rioolmodder uit de Ill bij Straatsburg, waarin allerlei keukenafval, in glazen kolven staan en ving de zich ontwikkelende gassen op. Aanvankelijk bevatten zij nog zuurstof, eenigen tijd daarna nog stikstof, beiden uit de lucht in de kolf afkomstig, daarna slechts koolzuur en moerasgas (CO² en CH⁴). De hoeveelheid van het laatste nam voortdurend toe, om ten slotte die van het eerste te overtreffen. Eenige opeenvolgende analyses leverden, na uitdrijving der zuurstof, de volgende samenstelling van het gasmengsel op.

Koolzuur, CO ²	55,81	56	45,9	43,3 pct.
Moerasgas, CH ⁴	42,54	42,7	54,1	56,6 pct.
Stikstof, N	1,65	1,3	0	0,1 pct.

Uit welk nader bestanddeel der modder ontwikkelde zich nu dit gasmengsel?

Een scheikundig onderzoek toonde aan, dat stikstofhoudende lichamen niet aan de gisting hadden deelgenomen, dat suiker, zetmeel, enz. in de brij niet aanwezig waren, maar hoofdzakelijk vezels en vliezen van celstof of *cellulose*, het minder vergankelijke bestanddeel van het plantenlichaam. Als oorzaak der gisting beschouwde hij micrococcen, (bacteriën) hoofdzakelijk de roode *Micrococcus prodigiosus*.

Verschillende stoffen werden nu aan eene dergelijke gisting onderworpen, na door eene kleine hoeveelheid modder geïnfecteerd te zijn. Daarvan passen het best in den gedachtengang van dit opstel die met zweedsch filtreerpapier, scheikundig zuivere cellulose. Een drietal opgevangen gasmengsels toch hadden de volgende samenstelling.

CO ²	25,7	26,05	34,07 pct.
CH ⁴	14,42	26,91	37,12 >
H	14,36	3,4	1,06 >
N	45,52	43,64	27,75 >

De proef werd dus niet lang genoeg voortgezet, om het geheele

¹ 1875. Dr. LEO POPOFF. »Ueber die Sumpfyasgähmung» (*Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere*. X. Herausgegeben von PFLÜGER. Bonn).

verdwijnen van waterstof (H) en stikstof (N) te bereiken; wel ziet men, als in het vorige geval, een toenemen van het moerasgas of methaan ten koste van het koolzuur. Nog meer is zulks te betreuren voor eene volgende proef, waar niet geïnfecteerd werd met de ruwe modder, doch met een weinig der zooveen vermelde micrococcen-massa. Hierbij was, na eene maand, voldoende gas opgevangen voor eene analyse, die tot uitkomst had:

CO^2 19,29; CH^4 17,91; H 32,76 en N 30,04 pct.

Van minder *rechtstreeksch* belang voor ons doel zijn de thans te vermelden onderzoeken van VAN TIEGHEM.¹

In 1865 had TRÉCUL aan eene bepaalde vorm van bacteriën den naam gegeven van »*Amylobacter*,» doch zonder een verband tusschen hen en eene cellulosegisting te veronderstellen. Nu maken, volgens v. T., deze amylobacteriën de cellulose eerst oplosbaar, waarschijnlijk door ze in glucose (druivensuiker) om te zetten, om ze vervolgens in gassen te splitsen (waaronder koolzuur). Daarbij ontstaat tevens een zuur, dat geneutraliseerd moet worden, zal de gisting voortgang hebben.

Ook toonde hij aan, dat slechts zachte celwanden worden omgezet; oude en geïncrusteerde, als cuticula (dekvliesje der opperhuid), kurk, lignine (houtstof), enz. bieden weerstand. Er is dus »*vergistbare*», tegenover »*niet vergistbare*» cellulose.

Het gevormde zuur bleek *boterzuur* te zijn, terwijl nevens koolzuur slechts *waterstof* optrad. Voor ons doel heeft *deze* gisting verder geen belang, men ziet echter hoe het vraagstuk gaandeweg aan scherpte wint.

Beter helpen ons de onderzoeken van HOPPE-SEYLER,² hoogleeraar te Straatsburg, in wiens laboratorium ook POPOFF had gewerkt.

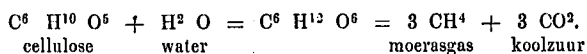
Bij zijn proeven liet H.-S. *uitsluitend* zweedsch filtreerpapier gisten, na infectie met eenige modder, zooals hij *uitdrukkelijk* verklaart. (Ik kom daarop later terug!).

Als eerste uitkomst stelde hij vast, dat de ontwikkeling der beide gassen CH^4 en CO^2 alleen dan plaats heeft, als in de gistende

¹ 1879. »*Sur la Fermentation de la Cellulose*» en »*Identité du Bacillus amylobacter et du Vibron butirique de M. PASTEUR*» (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 88, Février; 89, Juillet).

² 1886. Dr. F. HOPPE-SEYLER. »Ueber Gährung der Cellulose, mit Bildung von METHAN und KOHLENSÄURE». (HOPPE-SEYLER's *Zeitschrift für physiologische Chemie*, X Strassburg).

vloeistof bacteriën van bepaalden vorm aanwezig zijn, die *hij toen* niet kon onderscheiden van *Amylobacter* (toch verschillen zij er van, zie bladz. 214 en 217). De ontleding ging volgens deze zeer schematische vergelijking,



Ten tweede gaat de geheele fermentatie zeer langzaam en treedt meer CO^2 dan CH^4 op, zoowel aan het begin als aan het einde der proef. Aan het begin, omdat er nog lucht in de kolf is, dus zuurstof. De fermentatie heeft daarbij een *gewijzigd beloop*, reeds gevormd CH^4 wordt echter *niet* geoxydeerd.

Aan het einde, omdat de gasontwikkeling *zeer langzaam* gaat en er dan, door diffusie lucht in de kolf komt. In verband daarmede bevatten de laatste gasmengsels eenige stikstof.

Ten derde treedt veel meer koolzuur op, ten koste van methaan, in tegenwoordigheid van gebonden zuurstof (als $\text{Fe}^2 \text{O}^3$ (ijzeroxyde) $\text{Mn}^2 \text{O}^3$ (mangaanoxyde), sulfaten) of van chlorophyllhoudende (groene) algen, die zuurstof voortbrengen en koolzuur ontleden. Zij werken dus juist tegengesteld aan de bacteriën en zoo *kan* een evenwichtstoestand optreden, waarbij in het geheel geen gas optreedt, niet-tegenstaande eene zeer levendige stofwisseling. De algen ontleden koolzuur en brengen zuurstof voort. De bacteriën produceeren geen methaan, maar wel koolzuur, omdat zij steeds zuurstof vinden, en het koolzuur wordt telkens op nieuw ontleed. Het filtreerpapier verdwijnt geheel en gaat door de bacteriën naar de algen over.

Bij zulk eene proef, in tegenwoordigheid van $\text{Fe}^2 \text{O}^3$ en CaS O^4 (gips), werden 5800 m.G. cellulose »vergist» en 3420 c.M.³ CO^2 verkregen (gasvormig en gebonden), tegen slechts 330 c.M.³ CH^4 . Daarnevens ontstonden CaC O^3 (koolzure kalk), Fe S (zwavelijzer) en Fe C O^3 (koolzuur ijzer). Zonder gips was de verhouding van beide gassen als 1 : 1, met gips als 10 : 1.

Ik kom nu tot de belangrijke dissertatie van Dr. A. H. C. VAN SENUS¹, die het vraagstuk voor ons doel weder iets verder brengt.

In navolging van POPOFF en HOPPE-SEYLER liet hij modder (uit den Witten Singel te Leiden) in kolven gisten en analyseerde de zich ontwikkelende gassen; de procentische samenstelling daarvan bedroeg:

1890 »Bijdrage tot de Kennis der Cellulose-gisting» (Proefschrift, Leiden).

CH ⁴	15,9	48,42	68,15	79,93	79,67	78,98	79,5	80,28	79,06
CO ²	22,7	18,2	24,51	20,07	20,33	21,02	20,5	19,72	20,94
N	61,4	30,37	7,34						

Voor de proeven met zuivere cellulose nam hij watten, die met Singelmodder waren geïnfecteerd; zij leverden de volgende uitkomsten op:

CH ⁴	60,88	58,42	56,59	51,35	51,20	45,91
CO ²	39,12	41,58	43,41	48,65	48,20	54,09

Het, hierbij waargenomen, grooter worden van het koolzuurgehalte werd door hem toegeschreven aan de voltooide vorming van Calciumbicarbonaat (dubbel koolzure kalk). In eene zijner proeven verkreeg hij het bovenvermelde evenwicht tusschen bacteriën en algen, er vond volstrekt geene gasontwikkeling plaats.

Ook bij de gisting in mesthoopen treedt een overeenkomstig verschil op. Aan de buitenzijde heeft de lucht nog min of meer toegang en ontwikkelen zich alleen CO² en N, in het binnenste dringt de lucht niet meer door en ontwikkelen zich ongeveer gelijke hoeveelheden CO² en CH⁴.

Ook bestaat een onderscheid als tusschen »vergistbare» en »niet vergistbare» cellulose voor het darmkanaal der herbivoren. Eigenlijke cellulose en sommige wijzigingen (galactaan — soort plantenslijm) zijn voor hen »verteerbaar», andere wijzigingen, lignose (houtstof), suberien (kurkstof) in oudere plantendeelen, zijn »niet verteerbaar.»

VAN SENUS wees er tevens voor het eerst op, dat de typische cellulosegisting *anaërobisch* geschiedt (buiten toetreding der lucht). Schijnbaar pleiten daartegen zeer bekende verschijnselen, als het snel wegteren van palen, planken, touwen, enz. tusschen lucht en water, van hout in boschgrond, enz., doch men heeft hier veeleer te doen met de werkzaamheid van *schimmels*.

Waren de verschillende opstellen over deze zaak in chronologische volgorde gelezen, allicht ware dan de zeer »anregende» verhandeling van Dr. BEYERINCK¹, op grond van VAN TIEGHEM's opmerkingen (blad. 214), ter zijde gelaten, wat zeer te betreuren geweest zoude zijn.

Voor al § 12 »*Allgemeines über Anaerobiose, Reductions-function und Gährung*» opent zeer belangrijke gezichtspunten, die ruim het feit vergoeden, dat het geschrift zich eigenlijk niet met *ons* onderwerp bezig houdt. Schrijver zegt uitdrukkelijk, dat, bij de *door hem besproken*

¹ 1893. Dr. M. W. BEYERINCK. »*Ueber die Butylalkoholgährung und das Butylferment.*» (Verhandelingen der Koninklijke Akademie van Wetenschappen. Tweede Serie. Deel I. Amsterdam).

gisting, als gas uitsluitend H en CO² optreden, zonder een spoor van CH⁴, HOPPE-SEYLER (bladz. 215) dwaalde dus, toen hij den *Bacillus amylobacter* voor onze cellulose-gisting aansprakelijk stelde. Ook betwijfelt BEYERINCK, of de methaanvorming in het geheel wel met eenige cellulose-gisting samenhangt en stelt hij de vraag of, in H-S's proeven, CH⁴ en CO² zich niet uit voorhandene eiwitstoffen vormen, wat mij tegenover H-S's *uitdrukkelijke verzekering*, dat hij alleen met filtreerpapier, geïnfecteerd met eenige modder, gewerkt heeft, zeer vreemd voorkomt (verg. bladz. 214).

Eenen kleinen stap verder brengen ons de onderzoeken van OMELIANSKY¹, die wederom met filtreerpapier werkte, geïnfecteerd met een weinig Nawa-modder. Als voedingsmateriaal voor de bacteriën gebruikte hij K³PO⁴ (phosphorzure potasch), Mg SO⁴ (zwavelzure magnesia) en Am² SO⁴ (zwavelzure ammonia), waaruit zich zeer zeker geen methaan *kan* gevormd hebben, wat van het vleeschextract, door VAN SENUS gebezigd, toch nog *denkbaar* is. Hij slaagde er in, de schuldige bacteriën, die eene laag op het papier vormden, te isoleeren en te meten. Hunne lengte bedroeg 0,006—0,007, hunne breedte, 0,002—0,003 m.M. De beloofde verhandeling, over de gistingsproeven met reïnculturen, is echter nog niet verschenen.

Zonder het scepticisme van Prof. BEYERINCK zoude het als eene uitgemaakte zaak beschouwd mogen worden, dat de minder weerbarstige variëteiten van cellulose door gisting kunnen omgezet worden in een mengsel van koolzuur en methaan in ongeveer gelijke hoeveelheden. Daarenboven kreeg ik in een gesprek met onzen Delftschen bacterioloog den indruk, dat dit scepticisme aan het afnemen is, zoodat de kans bestaat, dat de geleerden het in dezen wel eens zullen worden, en wie zoude zich daarover niet verheugen?

Allicht heeft zich deze of gene mijner lezers afgevraagd: »qu'allait-il faire dans cette galère?» of, in onze moedertaal: »wat doet die kat in een vreemd pakhuis?» En inderdaad, ik voel mij verplicht rekenschap af te leggen van het feit, dat ik mij, als geoloog, gewaagd heb op het gebied der physiologische scheikunde. Ik vertrouw echter, dat die rekenschap afdoende zal bevonden worden.

In de laatste vier jaren toch doet het »brongas», ook wel »natuur-

¹ 1895. V. OMELIANSKY. »Sur la Fermentation de la Cellulose» (*Comptes rendus CXXI. Novembre*).

gas", »nortongas" of »aardgas" geheeten, veel van zich spreken.

Ettelijke analyses werden daarvan gemaakt, waaronder een drietal ten mijnen behoeve, onder leiding van Prof. BAKHUIS ROOSEBOOM te Amsterdam, wat ik niet genoeg op prijs kan stellen. Ook de heer VAN BEUKELVEEN te Delft en Dr. BOEKE te Alkmaar stelden onuitgegeven analyses ter mijner beschikking, wat mij eveneens hoogst welkom was. Ik wil het beschikbare hier wedergeven.

Brongasanalyses.									
	CH ⁴	CO ²	N	O	H	CO (kooloxyde)			
				zuurstof					
1	91,8	8,2	—	—	—	—	Delft,	OUDEMANS.	1871
2	83,6	16,4	—	—	—	—	»	»	1871
3	79,7	20,3	—	—	—	—	»	»	1871
4	88,4	11,6	—	—	—	—	»	»	1871
5	86,5	9,1	4,4	—	—	—	»	VAN BREUKELVEEN.	1897
6	84,6	9,2	6,2	—	—	—	»	»	1896
7	79,7	10,4	9	0,5	0,4	—	»	BAKHUIS ROOSEBOOM.	1898
8	57,1	6	36,3	0,4	0,2	—	Kralingen,	»	1899
9	64,2	9,3	18,9	0,3	6,4	0,8	Oudshoorn,	»	1897
10	74,8	3,4	16,2	0,4	4,6	0,6	Aalsmeer,	»	1898
11	77	8	15	—	—	—	Purmer,	ROMBOUTS.	1896
12	72,5	8	19	—	—	—	Beemster,	BOEKE.	1896
13	77	8,1	14,9	—	—	—	»	»	1896
14	82,9	10,8	6,3	—	—	—	Enkhuizen,	VAN BREUKELVEEN.	1896

De overeenstemming (in hoofdzaak) met de hiervóór aangegeven uitkomsten, valt dadelijk in het oog. Nevens eene zeer afwisselende hoeveelheid stikstof en enkele gassen van ondergeschikte beteekenis (in de vier zeer nauwkeurige analyses) hebben wij te doen met methaan in overwegende hoeveelheid, vergezeld van koolzuur.

De *stelling* kan dus met goed gevolg verdedigd worden: »Brongas is het product eener cellulose-gisting." Dat de hoeveelheid koolzuur daarin zoozeer achterstaat bij die van het methaan, ligt eenvoudig aan zijne veel grootere oplosbaarheid, zooals dadelijk blijken zal.

Prof. ROOSEBOOM had ook nog de goedheid voor mij een drietal monsters te laten onderzoeken van het brongas-water (dat het gas opgelost houdt) en vond in één daarvan 500, in een tweede 215 c.M.³. koolzuur, ten deele gebonden. Dr. BOEKE vond in een derde monster 652, de heer VAN BREUKELVEEN in een vierde 580 c.M.³ per liter.

Neemt men nu aan, dat het water 10 pct. brongas bevat, wat waarschijnlijk overdreven is, dan is de verhouding van methaan tot koolzuur in werkelijkheid:

1^o. Voor methaan het gunstigst: $86,5 : 9,1 + 215 = 86,5 : 224,1 = 1 : 2,6$ (analyse 5).

2°. Voor methaan het ongunstigst $64,2 : 9,3 + 652 = 64,2 : 661,3 = 1 : 10,3$ (analyse 9).

De cijfers dezer juistere verhouding pleiten nu niet tegen de stelling, maar laten zich gereedelijk verklaren door de omstandigheid, dat zuurstof of lucht nog toegang moet gehad hebben tot het gistingsproces (verg. bladz. 215). Het bewijs dezer hulpstelling wordt o. a. geleverd door de niet onaanzienlijke hoeveelheden stikstof, die tevens optreden.

De vraag, waar de cellulose gevonden wordt, waaruit het brongas ontstaat, is niet zoo moeilijk te beantwoorden. Soms is het verband met *veenlagen* zeer duidelijk, steeds echter komt het brongas voor in de lagere streken van ons vaderland, waar thans nog veen voorhanden of op niet te grooten afstand te vinden is (Noord- en Zuid-Holland en in mindere mate ook Friesland). Waarschijnlijk wordt het zich ontwikkelende gas in het bodemwater opgelost, dringt daarmede in de diepte en komt bij gunstige omstandigheden weder daarmede aan de oppervlakte, hetzij in natuurwellen, hetzij in opzettelijk geboorde gaten.

Veel is er tot geheele oplossing van het vraagstuk zeker nog te doen, in de eerste plaats komen daartoe proefnemingen door bacteriologen in aanmerking, doch die liggen geheel buiten het gebied mijner werkzaamheid.

Alvorens dit opstel te sluiten, moet ik een onderzoek vermelden, door Dr. J. D. BOEKE¹ aan dit onderwerp gewijd. Daarin worden reeds de proeven van POPOFF met rioolmodder vermeld en de veronderstelling gewaagd, dat het brongas zich uit veen zoude ontwikkelen. Zeer drukke bezigheden en het ontbreken eener universiteits-bibliotheek, in de plaats zijner inwoning (Alkmaar), maakten echter, dat hij die onderzoekingen liet rusten, zoodat ik, in beide opzichten in gunstiger omstandigheden verkeerende, die kon voortzetten en uitbreiden. Een ander opstel van mijne hand, meer bepaald over het brongas zelf, verschijnt in het Tijdschrift van het Koninklijk Nederlandsch Aardrijkskundig Genootschap.

Utrecht, Februari 1899.

¹ Het Natuur- of Brongas in den Bodem van Nederland" (*De Natuur* 1896).