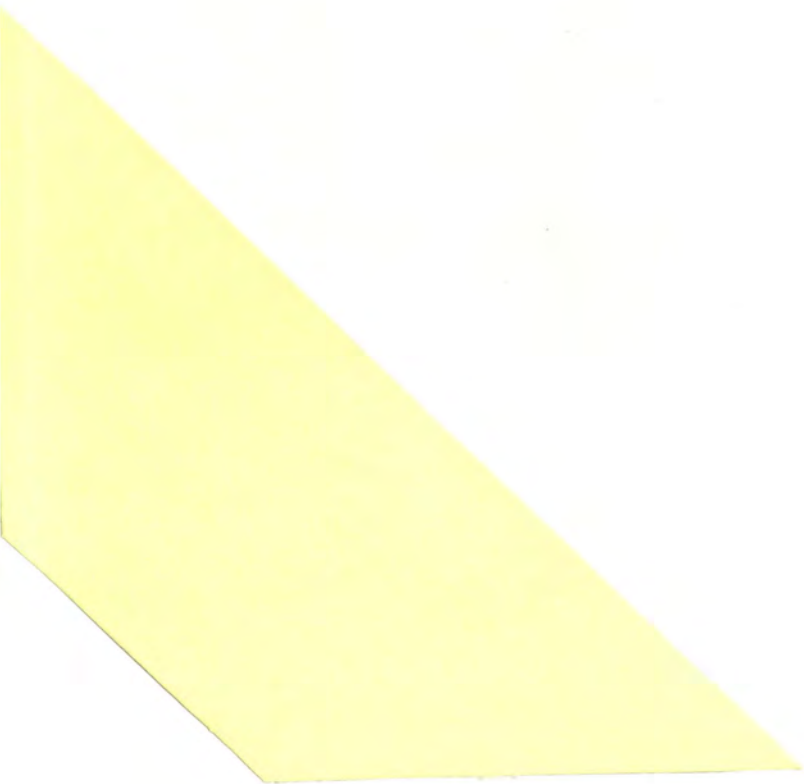


**UNAM**



**85**

**TESIS-BCCT**



**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**



**BIBLIOTECA**





ONDERZOEKINGEN  
OVER NITRIFICERENDE BACTERIËN

T. Y. KINGMA BOLTJES



INSTITUUT VOOR  
GEOLOGIA  
EN  
MINECA

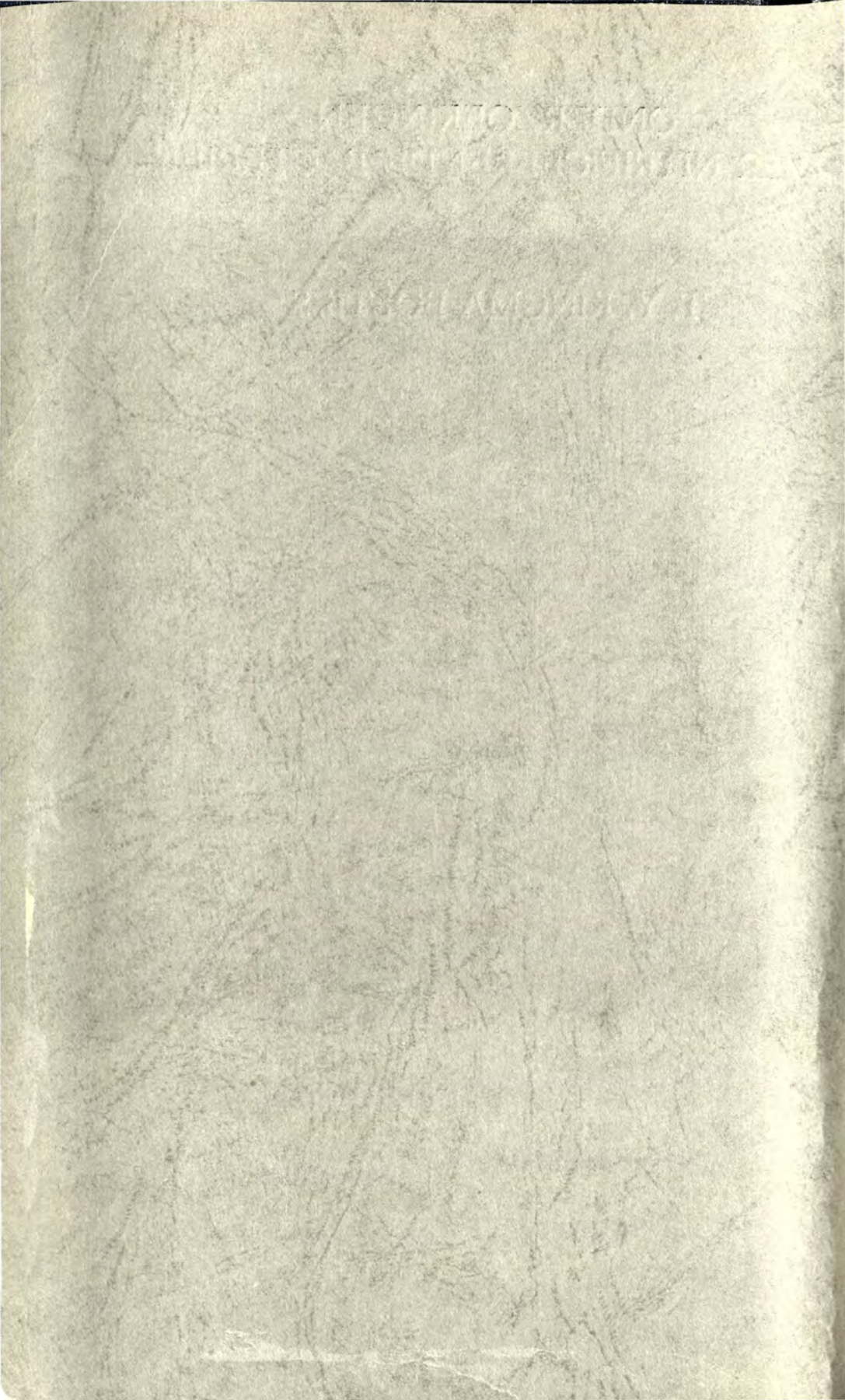


85

UNAM  
**TESIS-BCCT**

07  
libo





ONDERZOEKINGEN OVER NITRIFICEERENDE BACTERIËN

I-42

85

CLASIF. **KBT1934 I-2**  
ADQUIS. **I-42**  
FECHA .....  
PROCED. ....



# ONDERZOEKINGEN OVER NITRIFICEERENDE BACTERIËN

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING  
VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN  
DE TECHNISCHE WETENSCHAP AAN  
DE TECHNISCHE HOOGESCHOOL TE  
DELFT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR  
MAGNIFICUS, DR. J. G. RUTGERS,  
HOOGLEERAAR IN DE AFDEELING  
DER ALGEMEENE WETENSCHAPPEN,  
VOOR EEN COMMISSIE UIT DEN SE-  
NAAT TE VERDEDIGEN OP DONDER-  
DAG 28 JUNI 1934, DES NAMIDDAGS TE  
4 UUR DOOR

**TJOMME YNTE KINGMA BOLTJES**

SCHEIKUNDIG INGENIEUR

GEBOREN TE ROTTERDAM



INSTITUTO DE GEOLOGIA  
BIBLIOTECA

NAAMLooZE VENNOOTSCHAP W. D. MEINEMA — DELFT

907  
Ki60

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

*Aan mijn Ouders*  
*Aan mijn Vrouw*





## INHOUD.

INLEIDING . . . . .	9
---------------------	---

### HOOFDSTUK I.

Critisch overzicht der vroegere onderzoekingen betreffende de nitrificeerende bacteriën	12
§ 1. De oudste onderzoekingen . . . . .	12
§ 2. De klassieke onderzoekingen van WINOGRADSKY .	13
§ 3. Moeilijkheden en foutenbronnen, welke zich voordoen bij de isolatie van nitrificeerende bacteriën	17
§ 4. Vroegere publicaties, waarin tot het bestaan van heterotrophe nitrificeerende organismen wordt besloten . . . . .	22
§ 5. Onderzoekingen, waarvan de uitkomsten in overeenstemming zijn met WINOGRADSKY's inzicht aangaande de obligate autotrophie der nitrificeerende organismen . . . . .	39

### HOOFDSTUK II.

Ophooping en isolatie van nitrificeerende bacteriën . . . . .	48
§ 1. Inleidende opmerkingen . . . . .	48
§ 2. Ophooping van nitriteerende bacteriën . . . . .	48
§ 3. Het verkrijgen van koloniën van <i>Nitrosomonas</i> op kiezelzuurplaten . . . . .	51
§ 4. Ophooping en isolatie van <i>Nitrobacter</i> . . . . .	68

### HOOFDSTUK III.

Eenige opmerkingen over de verschillende soorten der nitrificeerende bacteriën en hare morfologie . . . . .	72
§ 1. De nitriteerende bacteriën . . . . .	72
§ 2. De nitrateerende bacteriën . . . . .	88

## HOOFDSTUK IV.

Over de onmisbaarheid van calcium voor de optimale ontwikkeling der nitriteerende bacteriën . . . . .	91
§ 1. Over een onbekenden factor, welke de vermeerdering van <i>Nitrosomonas</i> in het medium van WINOGRADSKY bevordert . . . . .	91
§ 2. Spectrographisch onderzoek van het ruwe zout . . . . .	98
§ 3. Proefnemingen, welke de onontbeerlijkheid van het calcium voor de optimale ontwikkeling van de nitriteerende bacteriën aantoonen . . . . .	101

## HOOFDSTUK V.

De invloed van de organische stof op de ademhaling en op de vermeerdering van de nitrificeerende bacteriën . . . . .	113
§ 1. Inleidende opmerkingen . . . . .	113
§ 2. Over den invloed van Nährstoff-Heyden op de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën . . . . .	116
§ 3. Over de oorzaken van de gunstige werking van Nährstoff-Heyden op de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën . . . . .	128
§ 4. Over de oorzaak van de remmende werking van peptonen op de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën . . . . .	142
§ 5. De invloed van glucose op de ademhaling en op de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën . . . . .	150
§ 6. Slotbeschouwing over de betrekkingen tusschen de nitrificeerende bacteriën en de organische stof . . . . .	166

## HOOFDSTUK VI.

Over <i>Hyphomicrobium vulgare</i> Stutzer et Hartleb . . . . .	168
§ 1. Overzicht der vroegere onderzoekingen . . . . .	168
§ 2. Isolatie en morphologie van <i>Hyphomicrobium vulgare</i> . . . . .	171
§ 3. De stofwisseling van <i>Hyphomicrobium vulgare</i> . . . . .	181

SAMENVATTING . . . . .	185
------------------------	-----

SUMMARY . . . . .	189
-------------------	-----



## INLEIDING.

Het z.g. nitrificatieproces, d. w. z. de onder natuurlijke voorwaarden optredende oxydatie van ammoniak tot nitraat, heeft reeds langer dan anderhalve eeuw de belangstelling der onderzoekers gehad. Dit proces speelt een belangrijke rol in den kringloop der stikstof. Daar voor het meerendeel der hoogere planten nitraten als stikstofvoeding de voorkeur verdienen boven ammoniumzouten <sup>1)</sup> en bijna alle stikstof als ammoniak uit de plantaardige of dierlijke eiwitten vrijkomt, moet de oxydatie van ammoniak noodzakelijkerwijze een belangrijke phase zijn in den genoemden kringloop.

Het optreden van nitraten in mesthoopen en in den akkerbodem na bemesting heeft reeds van oudsher de aandacht getrokken.

Behalve voor den landbouw was dit proces in vroegeren tijd ook van belang voor de directe winning der salpeter, welke men o.a. voor de bereiding van buskruit noodig had. In de zoogenaamde salpeterplantages trachtte men de organische stikstof zoo snel en volledig mogelijk in nitraat over te voeren. Hierbij bemerkte men al spoedig, dat een ruime luchttoetreding een eerste vereischte is voor een goed verloop van dit proces. In Frankrijk werden in 1777 op empirie berustende gegevens verzameld en op grond hiervan een schriftelijke instructie opgesteld, teneinde den aanleg van salpeterplantages te bevorderen <sup>2)</sup>. Ook in Duitschland werd omstreeks dien tijd deze industrie sterk aangemoedigd.

In de negentiende eeuw zijn deze salpeterplantages door de chilisalpeter en later vooral ook door de stikstofbindingsbedrijven geheel op den achtergrond geraakt.

De salpeterwinning langs biologischen weg is over het algemeen niet rendabel, omdat men slechts zoo weinig geconcentreerde oplossingen kan verkrijgen. Vrijwel algemeen neemt men aan, dat vloe-

---

<sup>1)</sup> W. MEVIUS, *Planta* 6, 379, 1928; W. MEVIUS und H. ENGEL, *Planta* 9, 1, 1930; K. PIRSCHLE, *Planta* 14, 583, 1931.

<sup>2)</sup> *Instruction sur l'établissement des nitrières*. Paris, Imprimerie royale, 1777; publiée par les Régisseurs généraux des poudres et des salpêtres. Afdrukt in: M. BOUSSINGAULT, *Chimie agricole*, Tome II, 1861.

stoffen met meer dan 4 à 5 gram natriumnitrat per Liter de nitrificatiesnelheid zeer verminderen. Een en ander brengt mede, dat er dus veel energie aan het indampen der oplossingen ten koste moet worden gelegd. Door BOULLANGER <sup>1)</sup> is een tiental jaren geleden met een opstelling, die veel overeenkomst met die van een snel-azijnzuur-fabriek vertoont, nog eens op semi-technische schaal ammoniumsulfaat tot nitraat geoxydeerd. Daar de prijs van het nitraat onder normale omstandigheden niet veel hoger is dan die van het ammoniumsulfaat, was van te voren wel te verwachten, dat het op deze wijze verkregen nitraat te duur zou worden. BOULLANGER komt dan ook tot de conclusie, dat een dergelijk bedrijf zich alleen onder abnormale oeconomische omstandigheden, bijvoorbeeld in tijden van oorlog, zou kunnen handhaven.

Tegenwoordig is het alleen maar mogelijk, de biologische salpeterwinning rendearend te laten verlopen, indien de arbeidskrachten, de uitgangsmaterialen en de brandstof goedkoop zijn. In Britsch-Indië <sup>2)</sup> heeft dit eeuwenoude bedrijf zich dan ook tot op den huidigen dag gehandhaafd. De Britsch-Indiërs leggen er zich echter niet op toe, de nitrificatie van de organische stof zoo snel en volledig mogelijk te laten verlopen, doch zij bepalen zich uitsluitend tot de extractie van den salpeterhoudenden grond, die zich om de mesthoopen bevindt.

Al biedt de technische bereiding van nitraten langs biologischen weg heel weinig vooruitzichten, toch is een grondige kennis van dit proces om uiteenlopende redenen nog altijd van veel belang. Door de landbouwkundigen wordt bijvoorbeeld nog altijd zeer veel waarde gehecht aan de bepaling van het nitrificeerend vermogen van den grond, omdat dit in nauw verband staat met de vruchtbaarheid <sup>3)</sup>.

Hoewel het optreden van de nitrificeerende bacteriën bij de reiniging van drink- <sup>4)</sup> en afvalwater minder diepgaand is bestudeerd, spelen zij daarbij een niet minder belangrijke rol. Feitelijk kan men zeggen, dat zij overal, waar men langs biologischen weg de

<sup>1)</sup> E. BOULLANGER, Ann. de l'Inst. Pasteur 35, 575, 1921; ibid. 36, 305, 1922.

<sup>2)</sup> J. W. LEATHER and J. N. MUKERJI, Agricultural Research Institute, Pusa, Bull. 24, 1911; C. M. HUTCHINSON, Agricultural Research Institute, Pusa, Bull. 68, 1916.

<sup>3)</sup> Zie bijv.: F. C. GERRETSEN, Een onderzoek naar de nitrificatie en denitrificatie in tropische gronden. Diss. Delft, 1921; S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 39, 299, 1925.

<sup>4)</sup> T. FOLPMERS, Vom Wasser 5, 32, 1931.



organische stof door oxydatie tracht te mineraliseeren, onmisbaar zijn.

Maar afgescheiden van de groote practische beteekenis van het nitrificatieproces zijn de nitrificeerende bacteriën ook in verband met haar stofwisseling uit algemeen physiologisch oogpunt uiterst belangwekkend.

De aard van deze stofwisseling is door de prachtige onderzoekingen van WINOGRADSKY grootendeels opgehelderd en hij heeft dit zoo grondig gedaan, dat er sindsdien slechts weinig is gepubliceerd, dat ons inzicht in deze kwestie verder heeft verdiept. Wel zijn er sedert nog tal van onderzoekingen verricht, waarbij meer in bijzonderheden wordt getreden, maar ten slotte bevestigen zij het werk van WINOGRADSKY. Wanneer dit niet het geval scheen, bleken later steeds fouten te zijn gemaakt.

Een door mij in 1928 aangevangen onderzoek naar de omzettingen, welke optreden bij de afvalwaterreiniging met behulp van „activated sludge”, maakte het in hooge mate gewenscht, de beschikking te krijgen over reïncultures van nitrificeerende bacteriën. Hoewel aanvankelijk geenszins werd verwacht, dat de tot het verkrijgen van deze reïncultures ingestelde proefnemingen tot nieuwe ervaringen zouden leiden, bleek spoedig, dat zich in werkelijkheid bij de ophooping en isolatie van deze bacteriën — welke isolatie na WINOGRADSKY's klassieke onderzoekingen nog slechts in zeer enkele gevallen met succes is verricht — tal van merkwaardige verschijnselen voordoen. Het bleek noodzakelijk, deze aan een nader onderzoek te onderwerpen. Met de verkregen reïncultures der nitrificeerende bacteriën werden een aantal waarnemingen verricht, welke ten deele een nieuw licht op de physiologie van deze bacteriën werpen.

Het vrij regelmatig voorkomen in de ophoopingcultures der nitrificeerende bacteriën van de, tot dusver onder den naam van *Hyphomicrobium vulgare* nog slechts oppervlakkig beschreven, bacteriesoort leidde voorts tot een nadere studie van dit in verschillend opzicht merkwaardige organisme.

---

## HOOFDSTUK I.

### CRITISCH OVERZICHT DER VROEGERE ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

#### § 1. DE OUDSTE ONDERZOEKINGEN.

Oorspronkelijk heeft men getracht, het in braakliggende gronden waargenomen nitrificatie-proces zuiver chemisch te verklaren. Toen in 1840 het ozon was ontdekt, meende men, dat deze verbinding hierbij een belangrijke rol zou spelen. PASTEUR, die er in 1872 in slaagde, te laten zien, dat men alcohol met behulp van micro-organismen tot azijnzuur kon oxydeeren, bewees terzelfder tijd, dat de algemeene opvatting, dat men bij de gebruikelijke technische azijnbereiding met een zuiver chemisch proces te doen had, onjuist was. Hij heeft toen ook reeds het vermoeden uitgesproken, dat ook de in den bodem optredende ammoniak-oxydatie door micro-organismen zou worden veroorzaakt. Eerst in 1878 toonden MÜNTZ en SCHLOESING door proeven met gesteriliseerden grond aan, dat dit werkelijk het geval was. Om echter het bewijs volledig te maken, moesten de betreffende micro-organismen eerst nog worden geïsoleerd, wat geenszins gemakkelijk bleek. SCHLOESING <sup>1)</sup>, MÜNTZ <sup>2)</sup>, FRANK <sup>3)</sup>, CELLI en MARINO ZUCO <sup>4)</sup>, ADAMETZ <sup>5)</sup>, WARINGTON <sup>6)</sup> en FRANKLAND <sup>7)</sup> werden allen in hun pogingen om dit te bereiken teleurgesteld. FRANK zelfs zoo, dat hij ten slotte weer tot de oude zuiver chemische theorie overging. HERAEUS <sup>8)</sup> was de eerste, die pretendeerde, een reïncultuur te hebben geïsoleerd. Later bleek,

<sup>1)</sup> TH. SCHLOESING, Compt. rend. de l'Ac. d. Sciences 77, 203, 353, 1873.

<sup>2)</sup> TH. SCHLOESING et A. MÜNTZ, Compt. rend. de l'Ac. d. Sciences 84, 301, 1877; *ibid.* 85, 1018, 1877; *ibid.* 86, 892, 1878; *ibid.* 89, 891, 1074, 1879.

<sup>3)</sup> B. FRANK, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. 4, CVIII, 1886.

<sup>4)</sup> A. CELLI et F. MARINO-ZUCO, Atti della R. Ac. dei Lincei, Rendiconti 2, 519, 1885.

<sup>5)</sup> L. ADAMETZ, Untersuchungen über die niederen Pilze der Ackerkrume, Diss. Leipzig, 1886.

<sup>6)</sup> R. WARINGTON, Journ. Chem. Soc. 59, 485, 1891.

<sup>7)</sup> G. C. FRANKLAND und P. F. FRANKLAND, Z.f. Hyg. 6, 373, 1888; Trans. Roy. Soc., Ser. B, 181, 107, 1890.

<sup>8)</sup> W. HERAEUS, Z.f. Hyg. 1, 193, 1886.



dat dit niet juist was en dat hij het slachtoffer was geworden van sporen stikstofoxyden, welke in de lucht voorkomen.

## § 2. DE KLASSIEKE ONDERZOEKINGEN VAN WINOGRADSKY.

In 1890 begon WINOGRADSKY <sup>1)</sup>, ondanks alle tegenslagen van zijn voorgangers, vol moed zijn onderzoekingen over de nitrificerende bacteriën. Kort te voren had hij een uitvoerig onderzoek verricht over zwavel- en ijzerbacteriën, micro-organismen, waarvoor hij bewees, dat zij hun energie ontleenen aan de oxydatie respectievelijk van zwavel- en ijzer-verbindingen. Hij begreep toen al wel, dat deze organismen en de nitrificerende organismen in physiologisch opzicht tot dezelfde groep behoorden, nl. die der anorgoxydanten en dat de bij de studie der eerstgenoemde organismen opgedane ervaringen hem bij het in reïncultuur brengen van de nitraatvormers goede diensten zouden kunnen bewijzen. Onder anderen hadden de voorafgaande onderzoekingen hem al vertrouwd gemaakt met het verschijnsel, dat er ook bacteriën zijn, die op de gebruikelijke voedingsbodems niet willen groeien en die slechts zeer weinig organische stof verdragen. Omdat hij bij de ijzer- en zwavelbacteriën had gevonden, dat 0,1% kaliumtartraat een gunstigen invloed had op hun groei, voegde hij dit ook toe aan de ophooping der nitrificerende organismen. Nitrificatie bleef evenwel uit en begon eerst in te treden, toen hij alle organische stof weg- liet.

Aanvankelijk was hij erg teleurgesteld, dat er in de cultuurvloeistof zoo betrekkelijk weinig bacteriën aanwezig waren, vooral wanneer de ammoniak uit de vloeistof was verdwenen. Eindelijk merkte hij echter op, dat, wanneer de ophooping in dit stadium was, het krijt of het magnesiumcarbonaat meer weerstand tegen opwarrelen bood dan dat in ongeënte kolfjes en dat er een min of meer samenhangend laagje was gevormd. Bij microscopisch onderzoek bleek hem, dat dit werd veroorzaakt, doordat de krijt- of magnesiumdeeltjes door een bacteriënmassa werden omhuld. Hij hoopte, dat hij, wanneer hij veel van dit materiaal op een gelatineplaat bracht, koloniën van de nitrificerende organismen zou krijgen, maar van nitrificatie was op deze platen geen spoor te bemerken. Hij kwam toen op

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 4, 213, 257, 760, 1890; ibid. 5, 92, 577, 1891; Arch. des Sciences Biologiques, St. Petersburg, 1, 88, 1892.

het schitterende denkbeeld van de z. g. n. negatieve-plaat-methode, d. w. z. om, juist door gebruik te maken van de eigenschap der nitrificerende organismen, niet te willen groeien op organische voedingsbodems, deze in reïncultuur te krijgen. Hij suspendeerde wat van het bezinksel uit de ophooping in steriel water, liet opnieuw bezinken en bracht, met behulp van een capillairtje, de bezonken vlokjes op een gelatineplaat. Nadat deze plaat eenige dagen in de thermostaat bij 18° C. had gestaan, nam hij met behulp van een capillairtje en een praepareer-microscoop de steriel gebleven deeltjes van de plaat en entte deze weer in een ammoniakale oplossing, waarin na eenigen tijd inderdaad nitrificatie optrad. Op deze wijze kreeg WINOGRADSKY in 1890 zijn eerste reïncultuur. Daar hij hetzelfde organisme ook in een beweeglijk stadium had gezien, stelde hij voor de geïsoleerde bacteriesoort den naam *Nitromonas*, later *Nitrosomonas*, voor.

Gelijktijdig met dit onderzoek had ook de aard van de stofwisseling der nitrificerende organismen reeds de volle aandacht van de diverse onderzoekers. HERAEUS<sup>1)</sup>, getroffen door de ontwikkeling van flinke bacteriënhuidjes en -vlokjes, — die intusschen, naar later bleek, niet afkomstig waren van de nitrificerende organismen — was de eerste, die dacht aan een koolzuurassimilatie, alhoewel dit hemzelf toch vreemd voorkwam, omdat de koolzuurassimilatie toentertijd alleen nog maar voor de groene planten was vastgesteld. HUEPPE<sup>2)</sup>, een leerling van HERAEUS, kwam bij voortzetting der proefnemingen tot de conclusie, dat er hier inderdaad koolzuurassimilatie plaats heeft onafhankelijk van het licht: „eine Chlorophyllwirkung ohne Chlorophyll“.

WINOGRADSKY aanvaardt eveneens de koolzuurassimilatie, maar bestrijdt, dat hier nu ook dezelfde reactie plaats zou hebben als bij de koolzuurassimilatie door de groene planten. Hij trachtte deze laatste uitspraak te ondersteunen door er op te wijzen, dat de zuurstof, die in dat geval vrij zou komen, een nitrificatie onder anaërobe voorwaarden mogelijk zou moeten maken, hetgeen niet het geval bleek te zijn. Bij deze redeneering werd intusschen in het geheel geen rekening gehouden met de quantitative en energetische verhoudingen. Ware dit wel geschied, dan zou het argument uiteraard zijn dwingende kracht aanstonds hebben verloren.

<sup>1)</sup> l.c. p. 226.

<sup>2)</sup> Vergel.: S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 4, 257, 1890.



WINOGRADSKY zelf meende, dat het niet onmogelijk is, dat er hier primair uit de ammoniak en het koolzuur een amide wordt gevormd.

Spoedig hierna stelde WINOGRADSKY <sup>1)</sup> een onderzoek in naar de verhouding tusschen de door *Nitrosomonas* geoxydeerde stikstof en de gelijktijdig geassimileerde koolstof. Het bleek, dat omstreeks 35 gewichtsdeelen ammoniakstikstof moeten worden geoxydeerd om 1 gewichtsdeel koolstof geassimileerd te krijgen.

Ten deele stelde zijn reïncultuur hem teleur, omdat zij alleen in staat was, de ammoniak tot nitriet te oxydeeren en niet tot nitraat. Het was hem en anderen onderzoekers al reeds vaak opgevallen, dat in de ophooping en de oxydatie veelal bij het nitriet ophield, terwijl men in de natuur dit tusschenproduct bijna nooit waarnam. Oorspronkelijk weet men dit aan het onnatuurlijke vloeistofmilieu en later trachtte men dit te verklaren door aan te nemen, dat het vermogen van het organisme om nitrieten tot nitraten te oxydeeren verloren was gegaan.

GODLEWSKI <sup>2)</sup> liet inmiddels zien, dat de toeneming van bacteriën-materiaal werkelijk het gevolg was van een koolzuurassimilatie en niet van het feit, dat de bacteriën van sporen organische stof uit de lucht leefden. Hiertoe cultiveerde hij zijn bacteriën onder klokken, waarin zij door sterk zwavelzuur met permanganaat of door sterke loog van de buitenlucht waren gescheiden. Onder de klokken, afgesloten door sterk zwavelzuur, vond wel nitrificatie plaats, onder die met loog niet. Tevens bleek hieruit, dat *Nitrosomonas* voor zijn koolzuurassimilatie het vrije koolzuur noodig heeft en dit niet ontleent aan de aanwezige carbonaten.

DUCLAUX <sup>3)</sup> was de eerste, die vermoedde, dat er twee micro-organismen noodig zouden zijn om de ammoniak tot nitraat te oxydeeren. WINOGRADSKY leek dit onwaarschijnlijk, omdat hij deze specialisatie te ver gedreven vond. Ten slotte werd hij echter door de ervaringen met ophooping, waarin wel nitrificatie <sup>4)</sup> plaats vond, wel gedwongen, ook tot deze theorie over te gaan. Als gevolg van

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 4, 760, 1890.

<sup>2)</sup> E. GODLEWSKI, Bull. int. de l'Ac. des Sciences de Cracovie, 409, 1892; ibid. 178, 1895.

<sup>3)</sup> Vergel.: S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 5, 577, 1891.

<sup>4)</sup> In het vervolg zal de volledige oxydatie van ammoniak tot nitraat als *nitrificatie*, tot nitriet als *nitritatie* en de oxydatie van nitriet tot nitraat als *nitratie* worden aangeduid.

zijn veranderde opvatting zette hij nu voor het eerst ophooping en met nitriet in en hieruit leerde hij, dat bij de nitrificatie werkelijk nog een tweede organisme werkzaam was. Met behulp van kiezelzuurplaten, die hij intusschen was gaan gebruiken, omdat de negatieve-plaat-methode hem niet bevredigde, slaagde hij er spoedig in, deze bacterie in reïncultuur te brengen. Het door hem geïsoleerde organisme is een klein onbeweeglijk staafje, waaraan hij den naam *Nitrobacter* gaf.

Het verschijnsel, dat in de ophooping en met ammoniumsulfaat het vermogen om tot nitraat te oxydeeren verloren gaat, vooral wanneer men direct na het verdwijnen van de ammoniak overent, was volgens hem te wijten aan de omstandigheid, dat de zoo beweeglijke *Nitrosomonas* niet voldoende zuurstof overliet voor den onbeweeglijken *Nitrobacter*. WARINGTON <sup>1)</sup> sprak daarentegen de meening uit, dat het de ammoniak was, welke *Nitrobacter* in zijn groei belemmerde, hetgeen later ook is bevestigd.

Omdat de *Nitrobacter*-cultures nog veel armer waren aan bacteriën-materiaal dan de *Nitrosomonas*-cultures, zag WINOGRADSKY er van af, voor het eerstgenoemde organisme de verhouding tusschen geoxydeerd nitriet en geassimileerde koolstof te bepalen.

WINOGRADSKY kwam tot de overtuiging, dat de door hem geïsoleerde organismen streng autotrooph zijn, waarmee men zeggen wil, dat zij met anorganische stoffen in hun levensbehoefte kunnen voorzien en dus, wat hun stofwisseling betreft, onafhankelijk zijn van de door andere organismen geproduceerde organische stof.

Zelfs stelden WINOGRADSKY en OMELIANSKY <sup>2)</sup> vast, dat de reïncultures van zijn nitrificerende organismen sterk door kleine hoeveelheden van zeer uiteenloopende organische verbindingen in hare ontwikkeling werden geremd.

Deze waarnemingen leidden er toe, dat vele onderzoekers meenden, dat de nitrificerende bacteriën van WINOGRADSKY, zoo zij al niet van ondergeschikte beteekenis waren, dan toch zeker niet alleen verantwoordelijk gesteld konden worden voor de nitrificatie in den akkerbodem. Dit bezwaar bracht OMELIANSKY <sup>3)</sup> ertoe, een onderzoek in te stellen naar de mogelijkheid, organische stikstof met

<sup>1)</sup> Vergel.: S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 5, 615, 1891.

<sup>2)</sup> S. WINOGRADSKY und W. OMELIANSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 5, 329, 377 u. 429, 1899.

<sup>3)</sup> W. OMELIANSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 5, 473, 1899.



behulp van mengcultures van de autotrophe en andere bacteriën te nitrificeeren. Hierbij bleek, dat, wanneer er maar een vulgaire bacterie als bijv. *Bacillus ramosus* aanwezig was, die de ammoniak uit de organische verbinding vrijmaakte, de nitrificatie zeer goed ging, doch dat deze in het tegenovergestelde geval uitbleef. WINOGRADSKY wees er voorts op, dat de gevoeligheid van de door hem geïsoleerde bacteriën voor organische stof juist een zeer gunstige eigenschap is. Hierdoor immers worden de nitraten pas gevormd, nadat de gemakkelijk aantastbare organische stikstof reeds is verdwenen, zoodat het voor de denitrificeerende bacteriën onmogelijk is, nog nitraten te ontleden en er dus geen stikstofverliezen ontstaan.

Toch sluit een en ander de mogelijkheid niet uit, dat er nog andere micro-organismen zijn, die eveneens het vermogen bezitten, stikstofverbindingen tot nitraten te oxydeeren en het behoeft dus niet te verwonderen, dat er door verschillende onderzoekers in deze richting is gezocht.

### § 3. MOEILIKHEDEN EN FOUTENBRONNEN, WELKE ZICH VOORDOEN BIJ DE ISOLATIE VAN NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

Na WINOGRADSKY zijn er een groot aantal onderzoekers geweest, die ook hebben getracht, de door hem beschreven nitrificeerende organismen in reincultuur te krijgen, om hierdoor beter met hunne eigenschappen vertrouwd te raken, of om de door WINOGRADSKY waargenomen feiten te kunnen verifieeren. Maar behalve deze onderzoekers zijn er ook velen geweest, die hebben getracht, nog andere micro-organismen te ontdekken, welke eveneens tot nitrificatie in staat waren, of welke mogelijkerwijze zelfs de organische stikstof direct tot nitraat konden oxydeeren.

WINOGRADSKY, goed op de hoogte van de vele moeilijkheden, welke zich bij dergelijke onderzoekingen voordoen, heeft evenwel alle publicaties, waarin of het streng autotrophe karakter van de door hem geïsoleerde bacteriën wordt ontkend, of waarin de isolatie van andere nitrificeerende micro-organismen wordt gerapporteerd, steeds zeer streng becritiseerd. Vooral onmiddellijk na zijn ontdekking heeft WINOGRADSKY soms een heftigen strijd moeten voeren om te bewijzen, dat de uitkomsten van deze onderzoekingen het gevolg waren van gemaakte fouten. Sindsdien zijn er regelmatig publicaties verschenen, waarin bijna zonder uit-



zondering dezelfde fouten voorkomen als in die van hun voorgangers. Maar ondanks alle critiek van WINOGRADSKY en ondanks het feit, dat het steeds onwaarschijnlijker wordt, dat er ook nog andere micro-organismen tot nitrificatie in staat zijn, verschijnen er nog altijd dergelijke publicaties. Deze stichten veel verwarring, vooral ook omdat zij dikwijls zonder commentaar in hand- of leerboeken, als bijv. in die van WAKSMAN, BERGEY, LIESKE en anderen, worden opgenomen.

Hoewel reeds meerdere malen door WINOGRADSKY in zijn critieken de verschillende moeilijkheden, welke zich bij het in reïncultuur brengen van de nitrificerende bacteriën voordoen, zijn behandeld, komt het mij toch gewenscht voor, deze hier nog eens uitvoerig te bespreken.

Bijna steeds zal men, om de een of andere bacterie in reïncultuur te brengen, moeten beginnen met te trachten, een ophooping van het gezochte micro-organisme te krijgen. Zoo zal men bij een onderzoek naar nitrificerende bacteriën beginnen met een kolfje, dat een oplossing van een ammoniumzout of van een nitriet met nog eenige andere anorganische zouten bevat, te enten met tuingrond of ander materiaal. Op het eerste gezicht lijkt dit een zeer selectief medium en vele bacteriologen meenen dan ook, dat men na eenige over-entingen dicht bij een reïncultuur is. Het ligt dan ook voor de hand, dat men, om van deze, niet op de gewone organische voedingsbodems groeiende, nitrificerende bacteriën een reïncultuur te krijgen, nogal eens zijn toevlucht heeft genomen tot de verdunningsmethode. De praktijk heeft evenwel geleerd, dat deze methode slechts zelden tot het doel leidt. De eenige onderzoeker, die hiermede succes had, is HEUBÜLT <sup>1)</sup>. Wanneer men echter zijn publicatie leest, krijgt men sterk den indruk, dat het min of meer een gelukkig toeval is geweest. Ook met eenmaal verkregen reïncultures van nitrificerende micro-organismen doet men de ervaring op, dat, indien infectie met bacteriën uit de lucht plaats heeft, deze in de anorganische media even snel, of nog sneller, groeien dan de zich slechts langzaam vermeerderende nitrificerende bacteriën. Daarom is het zeer gewenscht, de cultures voortdurend op reinheid te blijven controleren. Hieruit volgt dus, dat het vertrouwen, dat vele onder-

---

<sup>1)</sup> J. HEUBÜLT, *Planta* 8, 398, 1928.

zoekers in de selectiviteit van deze media stellen, geheel misplaatst is <sup>1)</sup>).

Maar ook toepassing van de plaat-methode biedt geenszins altijd waarborgen voor het verkrijgen van reïncultures. In het bijzonder geldt dit bij toepassing van de doorgaans gebruikte kiezelzuur-platen. Deze platen toch hebben één onaangename eigenschap, waarmede men wel degelijk rekening moet houden, wil men geen fouten begaan. Evenals de agar-agar-platen persen zij na stolling water uit, maar in zeer veel sterkere mate en wel het meest in de entstreep, waar door den platinadraad of door het omgebogen glazen staafje een lichte druk is uitgeoefend. Vooraf drogen in een thermostaat helpt wel iets, maar na afstrijken wordt in de entstreep toch opnieuw water uitgeperst. Daar het filmpje water langzaam opdroogt, doordat aan den eenen kant de uitpersing lang doorgaat en aan den anderen kant het water niet snel genoeg verdampt, hebben de afgestreken micro-organismen den tijd om zich in dit waterlaagje te ontwikkelen en zal er dus na opdrogen op de plaat een dun huidje van bacteriën komen te liggen. Van dit huidje ziet men microscopisch niets, wanneer men de plaat tenminste niet zeer nauwkeurig onderzoekt. Het spreekt vanzelf, dat, wanneer men van dergelijke entstrepen een kolonie afneemt, deze niet rein zal zijn. Hierbij komt nog, dat de nitrificerende organismen zich meestal alleen daar ontwikkelen, waar zij dicht opeen liggen, dat is dus in het begin van de streep, waar juist de kans op infectie het grootst is. Een eerste vereischte is dus, wil men de grootst mogelijke kans hebben om een reïncultuur te krijgen, dat men de platen nauwkeurig onder den microscoop onderzoekt en daarna van die plaatsen, waar de situatie het gunstigst lijkt, met de grootst mogelijke zorg een kolonie tracht te nemen. Juist bij de isolatie der nitrificerende bacteriën is het namelijk van doorslaggevend belang, dat de uitgezochte kolonie inderdaad rein is en bij het afnemen van de plaat rein blijft. Men wordt hier namelijk genoodzaakt een groote fout te maken, want, in plaats van de kolonie eerst te suspendeeren in wat steriel water en haar daarna opnieuw op een plaat af te strijken, ziet men hier van deze z.g.n. plaat-op-plaat-methode af en ent de kolonie eerst in een cultuurvloeistof om haar pas na cultiveeren opnieuw op een plaat af te strijken. Deze werkwijze wordt helaas

<sup>1)</sup> Duidelijk blijkt dit ook uit het onderzoek van BERSTEYN; vergel.: P. BERSTEYN, Arbeiten aus dem Bakt. Inst. der T. H. zu Karlsruhe 3, 83, 1903.



ook bij de isolatie van andere bacteriën nog maar al te dikwijls gevolgd. Het verwerpelijke van deze methode is hierin gelegen, dat, indien men het vloeistofmedium ent met een kolonie, waarin zich ook maar één enkele verontreinigende kiem bevindt, deze niet wordt gelocaliseerd, maar integendeel alle gelegenheid heeft, zich weer volop in het medium te vermeerderen. Het resultaat is dan uiteraard, dat men na korten tijd weer denzelfden toestand heeft bereikt als in de uitgangscultuur.

De reden, waarom men bij de nitrificeerende bacteriën niet de plaat-op-plaat-methode kan volgen, is, dat de koloniën, zooals reeds is opgemerkt, in het algemeen zeer klein blijven. Daarbij komt nog, dat slechts een gedeelte van de uitgezaaide cellen zich tot een kolonie ontwikkelt, zoodat dus de kans, dat men na suspenderen en opnieuw afstrijken op de tweede plaat weer een kolonie zal kunnen vinden, al heel klein is. Men zal nu echter om de boven uiteengezette reden zeer voorzichtig moeten zijn met de beoordeeling van de langs dezen weg verkregen cultures. Immers, daar de begeleidende bacteriën, zooals reeds werd opgemerkt, bijna steeds minstens even snel groeien als de nitrificeerende bacteriën, behoeft het niet te verwonderen, dat, wanneer men de cultuurvloeistof met een geïnficeerde kolonie heeft geënt, de kans om van een tweede plaat een reine kolonie te krijgen nog even klein is als bij de eerste plaat. Werkt men niet zeer zorgvuldig, dan zal men er langs dezen weg nooit in slagen, een reïncultuur te krijgen.

Een andere nogal eens voorkomende fout is, dat men niet realiseert, dat de nitrificeerende bacteriën, hoewel zij door de aanwezigheid van organische stof min of meer in hare levensfuncties worden belemmerd, na verwijdering van de organische stof toch nog levensvatbaar zijn gebleven. Het is toch juist deze eigenschap, welke de toepassing van de negatieve-plaat-methode mogelijk maakt. Wanneer men dus uit een nitrificatie-ophooping afstrijkt op een organisch medium, dan is er alle kans, dat in de koloniën der tot ontwikkeling komende, heterotrophe, verontreinigende organismen nog kiemen der nitrificeerende bacteriën aanwezig zullen zijn. Ent men nu een dergelijke kolonie in een mineraal nitrificatiemedium, dan kan het niet verwonderen, dat andermaal nitrificatie intreedt, welke dan evenwel ten onrechte aan het heterotrophe organisme wordt toegeschreven. Daarbij komt nog, dat — zooals wij in Hoofdstuk V nader zullen zien — het niet uitgesloten is, dat er ook bij aan-



wezigheid van organische stof soms min of meer nitrificatie plaats heeft. Ook deze omstandigheid is oorzaak, dat verschillende onderzoekers op een dwaalspoor zijn geleid.

Behalve de hierboven besproken fouten, welke het gevolg zijn van een min of meer slordige bacteriologische techniek, zijn er echter nog verschillende andere, waarop ook reeds door WINOGRADSKY meerdere malen de aandacht is gevestigd. Een der hier bedoelde fouten wordt veroorzaakt, doordat sommige onderzoekers onbekend zijn met het verschijnsel, dat een alkalische vloeistof na eenigen tijd steeds een positieve nitriet-reactie geeft, doordat de vloeistof stikstofoxyden, welke bij verbranding van lichtgas in sporen ontstaan en welke dus steeds in de laboratoriumlucht voorkomen, heeft geabsorbeerd. Wanneer men dus na eenigen tijd nitriet in de cultuurvloeistof kan aantonen, behoeft dit nog niet het gevolg te zijn van de werkzaamheid van de daarin aanwezige micro-organismen. Hierbij komt nog, dat de gebruikelijke colorimetrische nitriet-reacties zeer gevoelig zijn, zoodat sporen nitriet reeds een vrij intensieve kleur geven, waardoor het voor dengene, die dit niet realiseert, schijnt, alsof er werkelijk reeds vrij veel nitriet is gevormd. Om deze illusie nog meer volkomen te maken, verdwijnt tenslotte de ammoniak ook nog vanzelf uit de alkalische vloeistof. Op dit laatste verschijnsel is zoo nu en dan wel eens de aandacht gevestigd, maar men vindt nergens gegevens aangaande de mate, waarin dit geschiedt. Om hiervan een indruk te geven zij medegedeeld, dat na 40 dagen alle ammoniak is verdwenen uit 50 cc cultuurvloeistof met 0,1% ammoniumsulfaat, wanneer men dit in Erlenmeyers van 300 cc, zoodat de hoogte van het vloeistoflaagje ongeveer 1 cm is, met magnesiumcarbonaat wegzet in een thermostaat van 28° C. Heeft men een Erlenmeyer van 50 cc inhoud met 10 cc cultuurvloeistof, dan krijgt men reeds na 10 of 14 dagen geen ammoniakreactie meer. Gebruikt men kolfjes met kriet, dan duurt dit in verband met de lagere pH veel langer; immers de snelheid, waarmee de ammoniak uit de cultuurvloeistof verdwijnt, is sterk afhankelijk van de alkaliteit van het medium. Wanneer men bij de nitrificatie-proeven magnesiumcarbonaat gebruikt, wat meestal het geval is, kan men dus om de oxydatie van de ammoniak te volgen niet volstaan met alleen na te gaan, of de ammoniak verdwijnt.

Behalve met het uit de lucht in de media komende nitriet moet men er ook rekening mee houden, dat bij gebruik van leidingwater

de daarin aanwezige nitraten door micro-organismen tot nitrieten kunnen worden gereduceerd. Heeft men zich van te voren van de afwezigheid van nitraten overtuigd, dan moet men nog rekening houden met de mogelijkheid, dat het gevormde nitriet is ontstaan door reductie van nitraat, dat in de cultuurvloeistof is gekomen, doordat deze stikstofdioxyde uit de laboratoriumlucht heeft geabsorbeerd. Maar behalve dit moet men ook nog bedenken, dat de reacties op nitraat meestal lang niet zoo gevoelig zijn als die op nitriet, zoodat dus de kans bestaat, dat er, ondanks een negatieve nitraatreactie, toch nog voldoende nitraat aanwezig is om na reductie een positieve nitrietreactie te geven.

Op grond van de voorafgaande uiteenzettingen kan het dan ook niet verwonderen, dat er in de litteratuur talrijke publicaties zijn te vinden, waarin het optreden van een geringe hoeveelheid nitriet in ammonium-houdende media onder den invloed van heterotrophe bacteriën wordt beschreven. Wanneer men wil bewijzen, dat deze sporen nitriet inderdaad hun ontstaan te danken hebben aan de oxydatieve werking van het aanwezige micro-organisme, kan men niet volstaan met de mededeeling, dat men van dit alles op de hoogte is, maar men moet ook blijk geven, alle voorzorgen te hebben genomen om deze fouten te vermijden en dit is dikwijls niet eenvoudig.

In verband met het voorafgaande is het wel zeer opmerkelijk, dat slechts zeer zelden melding wordt gemaakt van het optreden van sporen nitraat in nitriethoudende media. Dit vindt ongetwijfeld zijn verklaring in het feit, dat het nitriet nooit vanzelf uit een oplossing verdwijnt en dat het heel moeilijk is, sporen nitraat naast zeer veel nitriet te bepalen.

Uit het gegeven overzicht volgt wel duidelijk, dat er gelegenheid genoeg is om fouten te maken en dat men om deze te vermijden nauwelijks critisch genoeg kan zijn.

#### § 4. VROEGERE PUBLICATIES, WAARIN TOT HET BESTAAN VAN HETEROTROPHE NITRIFICERENDE ORGANISMEN WORDT BESLOTEN.

Voorloopig zullen de publicaties van onderzoekers, die de resultaten van WINOGRADSKY bevestigen, buiten beschouwing worden gelaten en hier alleen worden vermeld, voor zoover dit noodig zal zijn om enkele feiten, te staven. In deze paragraaf zullen de publi-



caties, welke de resultaten van WINOGRADSKY niet bevestigen, aan een critische analyse worden onderworpen.

Om het geheel overzichtelijker te maken, zullen de publicaties in twee groepen worden verdeeld. In de eerste groep van publicaties, waarin het afwijkende resultaat het gevolg geweest kan zijn van een fout in de bacteriologische techniek, zal men meestal vinden, dat de hoeveelheden gevormd nitriet of nitraat ongeveer het bedrag bereiken, dat men uit hoofde van de toegevoegde hoeveelheden ammoniak of nitriet mag verwachten. In de tweede groep daarentegen is steeds slechts van sporen nitriet of soms nitraat sprake.

De eerste onderzoekers, althans voor zoover mij bekend, die na het onderzoek van WINOGRADSKY mededeelden, dat zij er in waren geslaagd, een heterotrooph micro-organisme met nitraterend vermogen te isoleeren, zijn STUTZER en zijn medewerkers geweest. Daar dit een zeer leerrijk geval is, zal deze geschiedenis wat uitvoerig worden beschreven.

STUTZER en BURRI <sup>1)</sup> beginnen hun publicatie met een beschrijving van de moeilijkheden, die zich bij een dergelijk onderzoek voordoen, zoodat men den indruk krijgt, dat het geheele onderzoek op een solide basis rust. In den loop van het onderzoek worden zij echter steeds minder critisch. Wanneer zij de eerste maal een kolonie hebben geïsoleerd, welke uit een micro-organisme schijnt te bestaan, dat in een mineraal medium wel nitrateert, maar niet in tegenwoordigheid van organische stof, waarvan het echter wel kan groeien, dan verklaren zij terecht, dat zij zeer betwijfelen, of het wel een reine kolonie is geweest, omdat zij afkomstig was van een niet-reine plaat. Bij nader onderzoek blijkt hun dan ook, dat de kolonie inderdaad niet rein was. Eenigen tijd later zoeken zij opnieuw een kolonie uit, welke weliswaar een ander uiterlijk heeft, maar welke precies dezelfde eigenschappen bezit als de voorgaande, zooals na enting in mineraal en organisch milieu blijkt. Ditmaal trekken zij de reinheid van de geïsoleerde kolonie niet in twijfel, alhoewel deze ook afkomstig is van een niet-reine plaat. Het eenige verschil tusschen de beide genoemde koloniën is, dat de nitratie wel eens opnieuw begon, wanneer zij deze laatste kolonie op een organisch medium en hierop aansluitend een mineraal medium entten, terwijl

---

<sup>1)</sup> A. STUTZER und R. BURRI, Centralbl. f. Bakt. II, 1, 721, 1895; *ibid.* 2, 105, 196, 1896.



dat bij de eerste nooit gelukte. Nu is het evenwel opmerkelijk, dat de onderzoekers uitdrukkelijk vermelden, dat de laatste kolonie zeer slijmerig was, zoodat het dus niet te verwonderen is, dat in dit geval de aanwezige *Nitrobacter* gemakkelijker mee werd overgeënt dan in het geval van de eerstgenoemde droge kolonie.

WINOGRADSKY <sup>1)</sup> is tegen deze uitkomsten niet direct in een publicatie opgekomen, maar heeft er STUTZER eerst opmerkzaam op gemaakt, dat zijn resultaten het gevolg zouden kunnen zijn van een mengcultuur. Tevens ried hij hem aan, de reinheid van zijn cultures te controleeren, zoodat hij dus zelf het onderzoek kon herroepen, indien bleek, dat hij werkelijk met mengcultures had gewerkt. STUTZER heeft dit echter niet gedaan, maar stuurde WINOGRADSKY op diens verzoek een van zijn cultures. WINOGRADSKY heeft deze cultuur onderzocht, waarbij bleek, dat het een mengcultuur was van drie verschillende micro-organismen. In de publicatie, waarin WINOGRADSKY verslag uitbrengt van dit onderzoek, zegt hij, dat hij het zijn plicht acht, dit onderzoek van STUTZER streng te critiseeren, daar de publicatie zoo suggestief is geschreven, dat zij er voor diegenen, die niet zijn ingewijd in deze materie, zeer geloofwaardig uitziet. Dit zou verwarring kunnen stichten, hetgeen hij wil voorkomen.

STUTZER <sup>2)</sup> schijnt uit dit geval niets te hebben geleerd, want ongeveer een jaar later verschijnt er een artikel van hem en één van zijn assistenten, waarin zij zich keeren tegen deze publicatie van WINOGRADSKY, daar zij meenen, zeer ten onrechte zoo te zijn becritiseerd. Zelfs durven zij beweren, dat zij wel wisten, dat de door hen aan WINOGRADSKY gezonden cultuur niet rein was, omdat zij op dat moment geen andere cultuur ter beschikking hadden. Hierop laten STUTZER en HARTLEB een aantal publicaties over hun „*Salpeterpilz*” volgen. Verwarder verhandelingen zijn niet denkbaar. Zij gaan zelfs zoover, dat zij de sporangiën van hun „*Salpeterpilz*” voor de zoëgloea van *Nitrosomonas* verklaren. Op een congres wordt door STUTZER en HARTLEB over dit onderwerp een lezing gehouden. GÄRTNER <sup>3)</sup> en FRAENKEL <sup>4)</sup> vinden het medegedeelde zoo onwaarschijnlijk, dat zij

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 2, 415, 449, 1896.

<sup>2)</sup> A. STUTZER und R. HARTLEB, Centralbl. f. Bakt. II, 2, 701, 1896; *ibid.* 3, 6, 54, 161, 235, 311, 351, 1897.

<sup>3)</sup> A. GÄRTNER, Centralbl. f. Bakt. II, 4, 1, 52, 109, 1898.

<sup>4)</sup> C. FRAENKEL, Centralbl. f. Bakt. II, 4, 8, 62, 1898.

STUTZER om een reincultuur verzoeken, opdat door hen deze onderzoekingen kunnen worden gecontroleerd. Door deze onderzoekers werden, onafhankelijk van elkaar, dertien verschillende micro-organismen geïsoleerd uit de hun ter hand gestelde cultures, zoodat zij zeer terecht alle werk van STUTZER en HARTLEB waardeloos verklaarden.

Het einde van deze geschiedenis is, dat STUTZER <sup>1)</sup> in 1901 erkent, dat zijn cultures niet rein waren en dat het hieraan te wijten is, dat de resultaten zoo zeer afwijken van die van WINOGRADSKY. Ten slotte schijnt het hem te zijn gelukt, de autotrophe, nitrificerende organismen in reincultuur te brengen.

Men zou zoo denken, dat dit voor degenen, die deze geschiedenis kennen, en vooral voor hen, die haar van nabij meemaakten, een ernstige waarschuwing zou zijn om bij eigen onderzoekingen over nitrificatie terdege op te passen, niet in dezelfde fouten te vervallen. Toch blijkt zoo iets op sommige onderzoekers niet den minsten indruk te maken. Ongeveer ter zelfder tijd, dat STUTZER en HARTLEB hun onderzoekingen over den „*Salpeterpilz*” publiceerden, rapporteerde RULLMANN <sup>2)</sup> eveneens, dat hij er in was geslaagd, een heterotroph, nitriteerend micro-organisme te isoleeren. Daar deze bacterie gekenmerkt is door een merkwaardige groeiwijze, welke toen voor het eerst werd waargenomen en welke tot op heden alleen bij dit bepaalde micro-organisme is opgemerkt, gaf hij er den naam *Nitrosobacterium formae novae* aan.

RULLMANN <sup>3)</sup> heeft later ingezien, dat deze bacterie toch niet nitriteeren kon en dat de kleine hoeveelheden nitriet, die hij in de vloeistofcultures vond, uit de laboratoriumlucht afkomstig waren.

STUTZER en HARTLEB <sup>4)</sup> meenden aanvankelijk, dat het door RULLMANN beschreven micro-organisme een bijzondere groeiwijze was van den door hen geïsoleerden „*Salpeterpilz*”. Nadat zij er met veel moeite in waren geslaagd, de bacterie in reincultuur te brengen, bleek hun wel, dat dit micro-organisme niets met hun „*Salpeterpilz*” had uit te staan. In 1899 hebben zij deze bacterie vrij

<sup>1)</sup> A. STUTZER, Centralbl. f. Bakt. II, 7, 168, 1901.

<sup>2)</sup> W. RULLMANN, Centralbl. f. Bakt. II, 3, 229, 1897; *ibid.* 4, 152, 1898.

<sup>3)</sup> W. RULLMANN, Centralbl. f. Bakt. II, 5, 716, 1899.

<sup>4)</sup> A. STUTZER und R. HARTLEB, Centralbl. f. Bakt. II, 3, 621, 1897; *ibid.* 5, 678, 1899; A. STUTZER und R. HARTLEB, Mitt. landw. Inst. Breslau 1, 75, 197, 1899



uitvoerig bestudeerd en er is door hen de naam *Hyphomicrobium vulgare* aan gegeven.

Dat het door RULLMANN beschreven micro-organisme hetzelfde is als datgene, dat door STUTZER en HARTLEB werd geïsoleerd, blijkt uit de in hun publicaties gereproduceerde photographieën, waarop het door zijn bijzondere groeiwijze gekenmerkte micro-organisme gemakkelijk is te herkennen.

In 1899 wordt door BEDDIES <sup>1)</sup> met behulp van een medium, dat ongeveer 2% organische stof bevat, een nitriteerend micro-organisme geïsoleerd, dat volgens zijn zeggen een soort sporen vormt, waardoor het zeer bestendig is tegen hooge temperaturen. Het is een zeer oppervlakkige mededeeling, waarin de door hem gevolgde werkwijze geheel onvoldoende wordt beschreven, zoodat het onmogelijk is te beoordeelen, of het onderzoek wel met de noodige zorg is verricht. Eenige cijfers betreffende de hoeveelheden ammoniak, welke in een bepaalden tijd door het door hem geïsoleerde micro-organisme kunnen worden geoxydeerd, worden evenmin gegeven. De publicaties van STUTZER en HARTLEB worden wel genoemd, maar eenig commentaar hierover ontbreekt geheel. Er zijn geen redenen aanwezig om eenige beteekenis aan deze publicatie toe te kennen.

FREMLIN <sup>2)</sup>, die volgens zijn zeggen met veel belangstelling den strijd tusschen WINOGRADSKY en STUTZER heeft gevolgd, rapporteert in 1903, dat hij er in is geslaagd, nitrificeerende bacteriën te isoleeren, welke op organische voedingsbodems groeien. Uit niets blijkt evenwel, dat deze onderzoeker er naar heeft gestreefd, de door WINOGRADSKY bij STUTZER en zijn medewerkers gesignaleerde fouten te vermijden. Ofschoon de beschrijving van de door FREMLIN verrichte proefnemingen veel te wenschen overlaat, krijgt men den indruk, dat ook hij een slachtoffer is van de verderfelijke cultuurmethode, waarbij vloeistofcultures en cultures op vaste media elkaar geregeld afwisselen. De geheele opzet van zijn proefnemingen verraadt gebrek aan systeem, zoodat de verkregen resultaten nauwelijks kunnen verwonderen. Als een staaltje, hoe slecht FREMLIN ook in staat is, de uitkomsten van andere onderzoekers te verwerken, moge worden vermeld, dat hij in een latere publicatie meedeelt, dat ook

<sup>1)</sup> A. BEDDIES, Chem. Ztg. 23, 645, 1899; ibid. 25, 524, 1901.

<sup>2)</sup> H. S. FREMLIN, Journ. of Hyg. 3, 149, 1903; ibid. 14, 364, 1914; ibid. 29, 236, 1929.

WINOGRADSKY <sup>1)</sup> heeft gevonden, dat glucose zeer bevorderlijk is voor de nitrificatie. Zoekt men echter de door hem bedoelde passage op, dan blijkt, dat hierin geen sprake is van nitrificatie, maar wel van stikstofbinding. WINOGRADSKY beveelt hier kiezelzuurplaten met glucose aan als een uitstekend substraat voor *Azotobacter*. Dat de door FREMLIN geïsoleerde heterotrophe bacteriën nitrificerend vermogen zouden bezitten, moet dan ook ten eenen male als onbewezen worden beschouwd.

Een geheel ander karakter dan de voorafgaande publicaties draagt een mededeeling van KASERER <sup>2)</sup>. Deze meent uit zijn theoretische beschouwingen over ammoniak-oxydatie te mogen afleiden, dat de mogelijkheid bestaat, dat er, behalve *Nitrosomonas*, welke ammoniak tot nitriet oxydeert, nog een micro-organisme is, dat ammoniak direct tot nitraat kan oxydeeren, een ander, dat de ammoniak tot stikstof oxydeert en ten slotte nog een soort, die stikstof tot nitraat kan oxydeeren. Deze drie soorten bacteriën zouden evenals *Nitrosomonas* autotrooph kunnen zijn. Volgens KASERER zelf is hij er ook in geslaagd, de beide eerste soorten te isoleren. Van de derde is hij niet geheel zeker, maar hij had alle hoop, dat hem binnen niet al te langen tijd de isolatie van deze laatste bacterie ook zou gelukken.

Door KASERER wordt niet uitdrukkelijk vermeld, of het micro-organisme, dat ammoniak tot nitraat oxydeert, ook heterotrooph kan groeien en dit is ook uit de beschrijving niet op te maken. Wel gebruikt hij voor de isolatie gelatineplaten, maar er wordt niet opgegeven, of aan deze platen nu uitsluitend anorganische of ook organische stoffen zijn toegevoegd. Het organisme, dat ammoniak tot stikstof oxydeert, is bovendien nog in staat, luchtstikstof te binden. De door hem gevolgde werkwijze wordt zeer onvoldoende beschreven, zoodat het onmogelijk is te beoordeelen, of zijn techniek wel correct is geweest. De door hem gevonden verschijnselen zijn evenwel zeer goed te verklaren, zonder dat het noodig is, daarvoor aan te nemen, dat er micro-organismen in het spel zijn, die de eigenschappen bezitten, welke KASERER hun toekent.

Voor de ophooping van *Bacillus nitrator*, de bacterie, die ammoniak direct tot nitraat oxydeert, gebruikt KASERER krijt om het gevormde zuur te neutraliseeren. Nu is het echter een bekend feit, dat de

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 39, 351, 1925.

<sup>2)</sup> H. KASERER, Zeitschr. f. landw. Versuchswesen in Oesterreich 10, 37, 1907.



nitratatie, wanneer men magnesiumcarbonaat voor dit doel gebruikt, pas begint, wanneer de ammoniak bijna is verdwenen. Het gevolg hiervan is, dat KASERER, wanneer hij bij de oxydatie van ammoniak tot nitraat vrijwel geen nitriet vindt, meent, dat dit zoozeer in strijd is met de gangbare opvattingen, dat er voor deze oxydatie noodzakelijk een nog onbekend micro-organisme verantwoordelijk moet worden gesteld. In latere jaren is evenwel gebleken (GERRETSEN <sup>1)</sup>) zie ook verderop in dit proefschrift), dat in tegenwoordigheid van krijt de nitratatie al direct begint en even snel verloopt als de nitritatie, zoodat het dan lijkt, of de ammoniak direct tot nitraat wordt geoxydeerd.

Wat betreft de oxydatie van ammoniak tot stikstof door de, door KASERER *Bacillus azotofluorescens* genoemde, bacterie, ook deze is in het geheel niet bewezen. De bij deze oxydatie vrijkomende stikstof heeft hij niet direct aangetoond, maar hij besluit uit het feit, dat er ammoniak verdwijnt, zonder dat hij daarvoor nitriet of nitraat in de plaats ziet komen, dat de ammoniak tot stikstof wordt geoxydeerd. Voor deze proeven gebruikt hij een cultuurvloeistof, waaraan magnesiumoxyde is toegevoegd, zoodat de pH hoog is. Dientengevolge verdwijnt de ammoniak vrij snel uit de oplossing. Hiermede heeft KASERER wel rekening gehouden. Hij vergelijkt dan ook geënte en niet geënte kolfjes en ziet, dat uit de geënte kolfjes de ammoniak eerder is verdwenen dan uit de ongeënte. De mogelijkheid, dat de kleine hoeveelheid ammoniak-stikstof, die niet vanzelf uit de cultuurvloeistof is verdwenen, door de aanwezige micro-organismen is geassimileerd, heeft hij evenwel niet overwogen. Behalve het magnesiumoxyde voegde KASERER nog 1 : 20000 formaldehyde aan de cultuurvloeistof toe, omdat dit volgens zijn theorie een gunstigen invloed moest hebben op den groei van *Bacillus azotofluorescens*. Ook deze toevoeging zal het verdwijnen van ammoniak nog in de hand hebben gewerkt.

Hoewel KASERER schrijft, dat dit slechts een voorloopige mededeeling is, waarop binnen niet al te langen tijd een uitvoerige publicatie zal volgen, is dit, voor zoover mij bekend, nooit geschied. Ook door andere onderzoekers schijnt dit werk nooit bevestigd te zijn.

Behalve in de zooeven besproken mededeeling van KASERER was

---

<sup>1)</sup> F. C. GERRETSEN, Meded. Rijkslandb. Proefst. Groningen, pag. 21, 1924.

er in de vorige publicaties steeds sprake van heterotrophe, nitrificerende micro-organismen. Eenigszins afwijkend hiervan is het resultaat van een onderzoek van BEIJERINCK <sup>1)</sup>, die uit zijn proefnemingen besluit, dat *Nitrobacter* wel in staat is, van organische stof te groeien, maar dat dan het nitrateerend vermogen blijvend verloren gaat. Hij concludeert hieruit, dat er door het cultiveeren op een organisch medium „physiologische soortvorming” heeft plaats gehad.

BEIJERINCK slaagde er bij zijn onderzoekingen namelijk niet in, van de door hem gebruikte kiezelzuur- of agarplaten met nitriet koloniën te isoleren, welke na cultiveeren in een anorganisch vloeistofmedium en daarop volgend afstrijken op platen met organische bestanddeelen geen groei meer gaven. Doordat hij met de daarop tot ontwikkeling gekomen organismen consequent de plaat-op-plaat-methode toepaste, bleek steeds, dat de door hem verkregen reïncultures geen nitrateerend vermogen bezaten.

Dat deze heterotrophe micro-organismen eens nitrateerende eigenschappen hadden, is evenwel geenszins door hem bewezen. Om dit te kunnen bewijzen, zou hij de absolute zekerheid moeten hebben gehad, dat de cultuur, waaruit de heterotrophe bacteriën waren voortgekomen, werkelijk rein was. Slechts ééncel-cultures hadden hem deze zekerheid kunnen geven. Dat zelfs iemand als BEIJERINCK geen succes had bij zijn pogingen om tot reïncultures te komen, bewijst, dat er wel zeer bijzondere moeilijkheden overwonnen moeten worden om onderzoekingen over nitrificerende micro-organismen tot een goed einde te brengen.

In de nu nog volgende publicaties wordt steeds weer als resultaat van het onderzoek gemeld de isolatie van nitrificerende micro-organismen, die ook heterotroph kunnen groeien met behoud van het nitrificerend vermogen.

De beoordeeling van het werk van JOSHI <sup>2)</sup> en dat van FRED en DAVENPORT <sup>3)</sup> wordt zeer vergemakkelijkt door de aan de publicaties toegevoegde photo's. Zoowel uit de microphoto's van een praeparaat van het nitriteerende micro-organisme van JOSHI als uit die van het nitrateerende micro-organisme van FRED en DAVENPORT

<sup>1)</sup> M. W. BEIJERINCK, Fol. Microbiologica 3, 91, 1914; zie ook: S. WINOGRADSKY, Compt. rend. Acad. d. Sc. 175, 301, 1922.

<sup>2)</sup> N. V. JOSHI, Memoirs of the Departm. of Agricult. in India 1, 86, 1915.

<sup>3)</sup> E. B. FRED and A. DAVENPORT, Soil Science 11, 389, 1921.



is direct te zien, dat de door hen gebruikte cultures niet rein waren, omdat de reeds eerder genoemde *Hyphomicrobium* hierop duidelijk is te zien. Behalve dat dit het heterotrophe karakter van de door deze onderzoekers geïsoleerde bacteriën verklaart, verklaart het ook, waarom FRED en DAVENPORT aan de door hen geïsoleerde *Nitrobacter* het vermogen tot eigen beweging meenden te moeten toekennen. Dat deze onderzoekers er niet in slaagden, nitrificerende cultures zonder *Hyphomicrobium* te krijgen, is zeer begrijpelijk wanneer men weet, dat *Hyphomicrobium* in de gebruikelijke anorganische voedingsmedia zeer goed groeit en dat zijn koloniën, zoowel in afmeting als in uiterlijk, zeer veel op die der nitrificerende micro-organismen gelijken. Ook PROUTY <sup>1)</sup>, die zelf eveneens groote moeite had om *Nitrobacter*-cultures te krijgen zonder *Hyphomicrobium*, herkent op de photo's van FRED en DAVENPORT duidelijk *Hyphomicrobium*. Het is mogelijk, dat dit organisme ook GIBBS <sup>2)</sup> veel moeite heeft gegeven, maar met zekerheid is dit uit zijn publicatie niet op te maken.

Onder de namen der onderzoekers, die er in zouden zijn geslaagd, andere nitrificerende bacteriën dan die van WINOGRADSKY te isoleren, treft men in verschillende leerboeken ook dien van SACK <sup>3)</sup> aan. SACK kan zich niet goed voorstellen, dat de nitrificerende micro-organismen van WINOGRADSKY zulk een belangrijke rol spelen in den landbouw, omdat deze zoo gevoelig zijn voor organische stof. Daarom wil ook hij nog eens onderzoeken, of het mogelijk is, nog andere nitrificerende bacteriën te isoleren.

De publicaties van STUTZER en HARTLEB worden door hem geciteerd, zonder dat dit hem aanleiding geeft tot het maken van eenige opmerkingen. Het resultaat van zijn onderzoek is zeer verrassend. Binnen korten tijd slaagt SACK er in, zonder veel moeite niet minder dan vier verschillende nitrateerende bacteriën te isoleren, die heterotroop zijn en zelfs het vermogen bezitten, cellulose aan te tasten. Later vindt hij ook nog een soortgelijk micro-organisme, dat tot nitritatie in staat is. Uit zijn mededeeling blijkt ten duidelijkste, dat SACK niet de plaat-op-plaat-methode volgde, maar steeds de koloniën van een plaat direct weer in een vloeistofcultuur entte. Er

<sup>1)</sup> CHAS. C. PROUTY, Soil Science 28, 125, 1929.

<sup>2)</sup> W. M. GIBBS, Soil Science 8, 427, 1919.

<sup>3)</sup> J. SACK, Centralbl. f. Bakt. II, 62, 15, 1924; ibid. 64, 32, 1925.

is dus niet de minste garantie, dat zijn cultures werkelijk rein waren. In dit geval was het nog mogelijk, de waarde van de mededeeling van SACK nader te toetsen, omdat door hem destijds welwillend eenige van zijn cultures aan Dr. C. B. VAN NIEL ter onderzoek werden afgestaan. Het bleek mij, dat de in de verzameling van het laboratorium aangehouden reïncultures van deze bacteriën absoluut niet in staat waren te nitrateren.

KLEIN en SVOLBA <sup>1)</sup> brengen *Nitrosomonas* in reïncultuur, ten einde hiermede onderzoekingen te verrichten over het mechanisme van de koolzuurassimilatie van de nitrificerende bacteriën. Veel moeite schijnt de isolatie hun niet te hebben gekost, daar men hierover geen enkele opmerking in hun verslag aantreft. Het resultaat is, dat zij een cultuur van *Nitrosomonas* krijgen, welke in bouillon groeit. Zij beschouwen dit evenwel niet als een aanwijzing voor een mogelijke verontreiniging van hun cultuur, maar wijten dezen groei in bouillon aan het vermogen van *Nitrosomonas*, zich aan organische stoffen aan te passen. Als voorbeeld, dat zij niet de eenigen zijn, die hebben gevonden, dat de nitrificerende bacteriën zich aan organische stoffen kunnen aanpassen, halen zij ten onrechte een publicatie van GOWDA <sup>2)</sup> aan. Hoewel het zeer begrijpelijk is, dat KLEIN en SVOLBA uit het résumé van de publicatie van GOWDA de conclusie trekken, dat het resultaat van diens onderzoek is, dat de nitrificerende micro-organismen aanpassingsvermogen aan organische stof bezitten, is dit toch niet juist. Wanneer men de geheele publicatie leest, dan blijkt daaruit duidelijk, dat GOWDA dit denkbeeld slechts heeft geopperd als zijnde een mogelijke verklaring voor het feit, dat hij er niet in kon slagen, nitrificerende bacteriën te isoleeren, welke zich niet in organische media ontwikkelden. Het onderzoek van KLEIN en SVOLBA geeft geen zekerheid, dat dit aanpassingsvermogen aan organische stof ook inderdaad aanwezig is bij de nitrificerende bacteriën. Zij beschouwen namelijk de koloniën van een gipsplaat, waarop zij ruwcultures hadden afgestreken, direct als rein, omdat zij overtuigd zijn, dat er geen heterotrophe bacteriën zijn, die op dergelijke anorganische voedingsbodems eenigermate kunnen groeien. In de vorige paragraaf werd er reeds op gewezen, dat de praktijk leert, dat er nog tal van hetero-

<sup>1)</sup> G. KLEIN und F. SVOLBA, Zeitschr. f. Botanik 19, 65, 1926.

<sup>2)</sup> R. N. GOWDA, Journ. of Bact. 9, 251, 1924.



trophe micro-organismen zijn, die in deze anorganische media minstens even snel groeien als de nitrificerende bacteriën. Hierdoor komt het ook ten deele, dat steeds een vrij groot gedeelte van de geïsoleerde koloniën der nitrificerende micro-organismen niet rein blijkt te zijn. Uit dit alles blijkt wel, dat de garantie, dat de cultures van KLEIN en SVOLBA niet verontreinigd zijn geweest, geheel ontbreekt.

Het onderzoek van MATTERN <sup>1)</sup> zij hier slechts volledigheidshalve vermeld. Daar zij de reinheid van de door haar gebruikte cultures uitsluitend op grond van het microscopisch uiterlijk daarvan beoordeelt, kan aan haar claim, met reïncultures te hebben gewerkt, geen waarde worden toegekend.

Het onderzoek van HARDER <sup>2)</sup> is meer gericht op de studie van de nitrificerende micro-organismen, die in uiteenlopende grondsoorten voorkomen. Tegen de publicatie, waarin hij dit onderzoek beschrijft, zijn enkele bezwaren in te brengen. Ten eerste laat deze op vele punten aan duidelijkheid te wenschen over en ten tweede is zij weinig critisch. Dit laatste blijkt o.m. hieruit, dat hij zonder eenig commentaar een lijstje geeft van namen van onderzoekers (waaronder ook STUTZER en BURRI), die beweren, nitrificerende micro-organismen te hebben geïsoleerd. Dit lijstje bestaat bijna uitsluitend uit namen van degenen, die er niet in slaagden, de nitrificerende bacteriën van WINOGRADSKY te isoleren. Hij schijnt zelfs zoo overtuigd te zijn, dat er ook nitrificerende micro-organismen zijn met heterotrophe leefwijze, dat hij het HEUBÜLT zeer kwalijk neemt, wanneer deze als zijn meening uitspreekt, dat alle tot dusver beschreven cultures, welke nitrificeerden en toch ook een heterotrophe ontwikkeling vertoonen, verontreinigd moeten zijn geweest. Onder deze omstandigheden behoeft het dus niet te verwonderen, dat HARDER zijn vondst van een nitrificerende *Sarcina* met heterotrophe leefwijze rustig aanvaardt en zijn cultures verder niet aan een critisch onderzoek onderwerpt. HARDER beschouwt een kolonie van een plaat, waarop een ruwcultuur is afgestroken, direct als reir, zoodat er niet de minste zekerheid bestaat, dat zijn cultuur geen mengcultuur is geweest van een *Sarcina* en *Nitrosomonas*.

Behalve deze *Sarcina* isoleerde HARDER ook nog een micro-

<sup>1)</sup> M. MATTERN, Bot. Arch. 22, 1, 1928.

<sup>2)</sup> A. HARDER, Bot. Arch. 31, 312, 1931.

organisme, dat zelfs bij zeer lage pH, n.l. 3.5, nog goed nitriteert. Hij beschrijft het als een zwak gekromd staafje met polaire ciliën, waaraan hij den naam *Microspire* geeft. Dit vertoont eenige overeenkomst met de in de laatste mededeelingen van WINOGRADSKY <sup>1)</sup> voorkomende *Nitrosospire*s, die ook nog bij lage pH nitriteeren en die WINOGRADSKY uit maagdelijke grondsoorten isoleerde. Over deze *Nitrosospire*s is echter nog weinig bekend.

Uit het voorafgaande zal wel zijn gebleken, dat geen der hierboven genoemde onderzoekers er werkelijk in is geslaagd, ook maar eenigszins te bewijzen, dat hij andere nitrificeerende bacteriën dan die van WINOGRADSKY heeft geïsoleerd, behalve misschien HARDER met zijn *Microspire*, welke voor de meeste gronden van weinig beteekenis is.

Nu rest nog de bespreking der publicaties, welke alle gemeen hebben, dat daarin wordt besloten tot het nitrificeerend vermogen van heterotrophe micro-organismen uitsluitend op grond van het feit, dat kleine hoeveelheden nitriet of nitraat in de cultuurmedia worden aangetroffen. Hoewel WINOGRADSKY al sinds de publicatie van HERAEUS vele malen critiek heeft uitgeoefend op dit soort verhandelingen, heeft dit toch niet verhinderd, dat zij regelmatig bleven verschijnen.

MÜNTER <sup>2)</sup> onderzocht de stikstofomzettingen van eenige *Actinomyceten*. Uit de resultaten van zijn analyses meent hij te mogen afleiden, dat uit de toegevoegde ammoniak sporen nitraat zijn gevormd. Doordat duplo- en blanco-bepalingen ontbreken, zijn de analyses evenwel weinig overtuigend. Hij heeft geen rekening gehouden met de mogelijkheid, dat er nitraten in het gebruikte leidingwater aanwezig kunnen zijn en dat de verschillen in de hoeveelheden nitraat, die hij in de cultures vindt, veroorzaakt kunnen zijn, doordat de onderzochte micro-organismen niet alle even sterk nitraat reduceerden. Dat zijn bacteriën nitraat kunnen reduceeren, blijkt afdoende uit het feit, dat hij minder nitraat vindt naarmate de cultures ouder worden. De beschrijving van zijn proeven laat ook veel aan duidelijkheid te wenschen over.

VIEHOEVER <sup>3)</sup> meent, dat de door hem bestudeerde ureum-

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Compt. rend. de l'Ac. d. Sciences 192, 1000, 1931; Compt. rend. de l'Ac. d'Agric. 17, 1931; Ann. de l'Inst. Pasteur 50, 350, 1933.

<sup>2)</sup> F. MÜNTER, Centralbl. f. Bakt. II, 39, 569, 1913.

<sup>3)</sup> A. VIEHOEVER, Centralbl. f. Bakt. II, 39, 272, 1913.



bacteriën ook kunnen nitriteeren. Hij geeft niet op, welke hoeveelheden nitriet er zijn gevonden, maar alleen, of het door hem gebruikte nitriet-reagens van LOSVAY een sterke of zwakke roodkleuring geeft. Hij vermeldt uitdrukkelijk, dat hij er zich van te voren van heeft overtuigd, dat de door hem gebruikte cultuurvloeistoffen geen nitriet- of nitraat-reactie gaven. Hij heeft er evenwel geen rekening mee gehouden, dat zijn nitriet-reagens veel gevoeliger is dan zijn nitraat-reagens. Daar zijn bacteriën nitraat kunnen reduceeren, is het dus heel goed mogelijk, dat een oplossing, welke geen nitraat-reactie vertoont, na reductie van het nitraat tot nitriet een positieve nitriet-reactie geeft. Uit deze publicatie blijkt dus geenszins overtuigend, dat ureum-bacteriën door oxydatie van ammoniak nitriet kunnen vormen.

RUNOW <sup>1)</sup> isoleert uit zijn nitrificeerende cultures een micro-organisme, dat op organische voedingsbodems groeit en dat in staat is te nitrificeeren. Men krijgt niet den indruk, dat RUNOW critisch is, terwijl ook de beschrijving van het onderzoek veel aan duidelijkheid te wenschen laat. Ook het gegeven cijfermateriaal is weinig overtuigend, omdat zijn duplo-bepalingen weinig overeenstemmen en de noodige blanco's ontbreken. Met absorptie van nitriet heeft hij rekening gehouden, maar verder zijn de bij de bespreking van het onderzoek van VIEHOEVER gemaakte opmerkingen ook hier van toepassing. Bovendien is het niet uitgesloten, dat de nitrificeerende bacteriën bij de proefnemingen van RUNOW als infectie aanwezig waren, omdat het door hem bestudeerde micro-organisme uit een ophooping van nitrificeerende bacteriën werd geïsoleerd en waarborgen, dat hij het heterotrophe organisme werkelijk in reincultuur heeft gebracht, ontbreken.

NELSON <sup>2)</sup> heeft een uitvoerig onderzoek verricht om aan te toonen, dat er heterotrophe micro-organismen zijn, die ammoniak kunnen oxydeeren tot nitriet en dat enkele hiervan het gevormde nitriet verder tot nitraat kunnen oxydeeren. Van deze oxydatie-producten vindt hij echter alleen zeer kleine hoeveelheden; van een volledige oxydatie is hier geen sprake. In zijn inleiding geeft NELSON een overzicht van de door hem bestudeerde litteratuur. Dit is evenwel niet meer dan een reeks korte samenvattingen van elke publicatie

<sup>1)</sup> E. W. RUNOW, Centralbl. f. Bakt. II, 77, 193, 1928.

<sup>2)</sup> D. H. NELSON, Iowa State Coll. Journ. of Science 3, 113, 1929.



afzonderlijk zonder enig commentaar. NELSON is dit onderzoek begonnen om een verklaring te vinden voor het algemeen bekende feit, dat het vrijwel onmogelijk is, door de verdunnings-methode tot een reincultuur te komen, met andere woorden, hoe het mogelijk is, dat heterotrophe micro-organismen zich zoo goed in een anorganisch medium kunnen vermeerderen. Volgens NELSON kan dit niet anders, of zij moeten de hiertoe benoodigde energie aan de oxydatie van ammoniak of nitriet ontleenen. Het vinden van sporen nitriet of nitraat zou dan volgens hem de verklaring opleveren, waarom men door de verdunnings-methode geen reincultuur van nitrificeerende bacteriën kan krijgen. Dit kan intusschen niet juist zijn. De heterotrophe bacteriën zouden zich immers, wanneer zij alleen groeiden, doordat zij ammoniak of nitriet oxydeerden, toch lang niet zoo sterk vermeerderen als de echte nitrificeerende bacteriën van WINOGRADSKY, omdat deze in denzelfden tijd, bijv. een week, ongeveer  $1000 \times$  zooveel nitriet of nitraat vormen. Het ligt dan ook voor de hand, dat de heterotrophe organismen groeien ten koste van de geringe hoeveelheid organische stof, welke nog in de vloeistof aanwezig is, of welke in de laboratoriumlucht voorkomt.

NELSON's analyses zijn niet overtuigend, daar de duplo-bepalingen onderling slecht overeenstemmen en er lang niet voldoende bepalingen zijn gedaan. Hij heeft wel rekening gehouden met het verschijnsel, dat een alkalische oplossing door absorptie van de steeds in de laboratoriumlucht voorkomende stikstofoxyden een nitriet-reactie geeft, maar er niet aan gedacht, dat er op deze wijze ook nitraten in de vloeistof komen. Het is niet zeker, of bij al zijn proeven de gebruikte cultuurvloeistoffen wel nitraatvrij waren, maar bij zijn proeven met gesteriliseerden grond is zeker nitraat aanwezig geweest. De mogelijkheid, dat sporen nitriet zijn ontstaan door reductie van het nitraat, is blijkbaar niet door NELSON overwogen.

Aan het meerendeel zijner nitraat-bepalingen is weinig of geen waarde toe te kennen, daar de wijze, waarop hij dit heeft gedaan, hoogst onzekere uitkomsten geeft, zooals ik uit eigen ervaring weet. Om uit een oplossing, waarin nitriet en nitraat naast elkaar aanwezig zijn, het nitriet te verwijderen, wordt de oplossing sterk aangezuurd, ureum toegevoegd en eenigen tijd gekookt. Wanneer de oplossing nitrietvrij is, moet de overmaat ureum worden verwijderd. Om dit te bereiken wordt door NELSON de oplossing eerst geneutrali-



seerd, waarna wat natriumperoxyde wordt toegevoegd als oxydatie-middel. Ten slotte bepaalt hij dan het nitraat volgens de methode van DEVARDA. Dat hij er niet in is geslaagd, het ureum quantitatief te verwijderen, blijkt daaruit, dat hij in oplossingen, waarin hij colorimetrisch geen nitraat kan aantoonen, met deze methode nog vrij wat nitraat vindt. NELSON zelf schijnt dit vrij onverklaarbaar te vinden. Nu vindt hij weliswaar met deze methode iets meer nitraat in de oplossingen, waarin de bacteriën zijn gegroeid, maar dat is heel goed mogelijk, doordat het bacteriën materiaal onvoldoende is verwijderd en er in deze oplossingen dus meer organische stof aanwezig is. Daar ook deze natriumperoxyde verbruikt, is het alleszins denkbaar, dat er dan ook een kleiner deel van het ureum wordt geoxydeerd. Deze zienswijze wordt gesteund door het feit, dat NELSON in die oplossingen, waaraan hij glucose heeft toegevoegd, het meeste nitraat vindt.

Het niet volledig verwijderen van alle bacteriën materiaal kan ook nog op andere wijze dan de reeds genoemde van invloed zijn op deze nitraat-bepaling, doordat men de aminostikstof met deze methode eveneens in ammoniak overvoert en haar dus als nitraat mee bepaalt.

Ook hier is dus niet het minste bewijs geleverd, dat de gevonden sporen nitriet of nitraat zijn ontstaan door het oxydeerend vermogen van heterotrophe bacteriën en zijn uitspraak, dat „the broth-test for purity of nitrifiers is worthless” is dan ook niet gemotiveerd.

EVA CAMPBELL <sup>1)</sup> isoleerde uit tuingrond een thermophil, heterotroph micro-organisme, dat nitriteerende eigenschappen zou hebben. Wanneer zij kolfjes met ammoniumsulfaat met deze bacterie ent, krijgt zij na vijf dagen een nitriet-reactie. Zij schijnt meer geïmponeerd te zijn door de sterk roode kleur van deze reactie dan door het feit, dat deze kleur wordt veroorzaakt door slechts 1 mg nitriet-stikstof per Liter, zoals haar blijkt, wanneer zij deze kleur vergelijkt met oplossingen met bekend nitrietgehalte; anders is het moeilijk te verklaren, waarom zij hier van een sterke oxydatie spreekt. Daarbij komt nog, dat zij door de hoge temperatuur, waarbij zij cultiveert, de ammoniak vrij snel ziet verdwijnen. Het komt echter niet bij haar op, eens even na te gaan,

---

<sup>1)</sup> E. G. CAMPBELL, A thermophil nitrite former. Diss. Ohio State University, 1931 [niet in druk verschenen]; Science 75, 23, 1932.

of de hoeveelheid verdwenen ammoniak en de gevonden quantiteit nitriet eenigszins met elkaar overeenkomen.

Met de mogelijkheid van absorptie van stikstofoxyden uit de lucht, of reductie van het in de vloeistof aanwezige nitraat, houdt zij niet de minste rekening.

LIPMAN en GREENBERG <sup>1)</sup> berichten in een kort verslag, dat zij een micro-organisme hebben geïsoleerd, dat in staat is, ammoniak tot nitraat te oxydeeren en tevens petroleum te ontleden. Eenig cijfermateriaal om dit te bewijzen is niet aanwezig. Er komt in deze mededeeling echter een opmerking voor, welke voldoende is om de juistheid van hun mededeeling in twijfel te mogen trekken. Zij zeggen namelijk: „It grows very well under strictly autotrophic conditions in an inorganic salt medium with ammoniumsulphate or potassiumnitrate as the source of nitrogen”. Dat een bacterie autotroop zou groeien in een anorganisch medium met nitraat, zonder dat er oxydeerbare anorganische stoffen, als bijv. ammoniak, zwavel of zwavelwaterstof, aanwezig zouden zijn, is onmogelijk. De groei, welke LIPMAN en GREENBERG in hun media hebben waargenomen, zal dan ook hoogst waarschijnlijk hebben plaats gevonden ten koste van kleine hoeveelheden organische stof uit het vloeistofmedium of uit de laboratoriumlucht.

Ondanks de strenge critiek, welke WINOGRADSKY <sup>2)</sup> op de publicatie van NELSON heeft uitgeoefend, hebben CUTLER en MUKERJI <sup>3)</sup> eenigen tijd geleden een soortgelijk onderzoek gepubliceerd. Of deze onderzoekers wel kritisch genoeg zijn geweest, mag worden betwijfeld, daar het onderzoek van STUTZER en HARTLEB zonder eenig commentaar wordt aangehaald. Ook zijn er te weinig controlebepalingen gedaan om de door hen uitgevoerde analyses overtuigend te doen zijn. Uit hun proeven blijkt, dat het nitriet niet blijft toenemen, naarmate de cultures ouder worden, maar dat na verloop van tijd de hoeveelheid nitriet weer gaat afnemen, een verschijnsel, waaraan deze onderzoekers wel aandacht hebben geschonken. Daar deze bacteriën reduceerend vermogen bezitten, moet men zorg dragen, dat de gebruikte media niraatvrij zijn en daar hebben zij niet op gelet. Dit verklaart ook, waarom zij bij hun

<sup>1)</sup> C. B. LIPMAN and L. GREENBERG, Nature 129, 205, 1932.

<sup>2)</sup> S. WINOGRADSKY, Bull. de l'Inst. Pasteur 28, 681, 1930.

<sup>3)</sup> D. W. CUTLER and B. K. MUKERJI, Proc. Royal Soc. London Ser. B. 108, 384, 1931.



proeven met grond, waarin nagenoeg altijd nitraat aanwezig is, meer nitriet hebben gevonden dan bij hun andere proeven. Van een bewijs, dat de door hen bestudeerde heterotrophe micro-organismen nitriteeren, is dus geen sprake.

WINOGRADSKY <sup>1)</sup>, die deze publicatie van CUTLER en MUKERJI ook heeft besproken, komt tot dezelfde conclusie.

Door CUNNINGHAM <sup>2)</sup> is daarentegen deze publicatie gerefereerd zonder andere aanmerking, dan dat hij het niet bewezen acht, dat de verdwenen sporen nitriet door de aanwezige bacteriën zijn geassimileerd.

Behalve het reeds in het voorafgaande opgemerkte, is er nog een bezwaar, dat voor al deze publicaties geldt en wel, dat de hierin beschreven heterotrophe micro-organismen op één lijn worden gesteld met de door WINOGRADSKY geïsoleerde bacteriën, waarvoor niet de minste reden is. Indien deze heterotrophe bacteriën inderdaad ammoniak oxydeerden, dan zou veelal niet meer dan 0,1—0,5%, in enkele gevallen 1—2%, der toegevoegde ammoniak zijn omgezet, terwijl de bacteriën van WINOGRADSKY dit quantitatief doen. WINOGRADSKY schrijft naar aanleiding van dit soort publicaties in een van zijn critieken: „On découvre bientôt dans le liquide de culture des traces d'azote nitreux que l'on calcule pour un litre, afin d'avoir des chiffres tant soit peu présentables, sans pourtant atteindre ce but, car ils ne dépassent pas généralement quelques dixièmes de milligrammes". Wanneer deze bacteriën wel iets mochten nitrificeren, dan moet de rol, welke zij in het nitrificatieproces spelen, wel zoo onbetekenend zijn, dat zij, wat dit betreft, gerust buiten beschouwing kunnen blijven. Bovendien is de betekenis van de oxydatie der stikstofverbindingen voor beide soorten micro-organismen geheel verschillend. Voor de heterotrophe bacteriën bestaat er niet het minste verband tusschen hun groei en de hoeveelheden, welke zij zouden oxydeeren; zeker is deze oxydatie voor hun groei niet noodzakelijk. Voor de nitrificerende autotrophe bacteriën is deze oxydatie echter van vitaal belang. Wanneer de vereischte stikstofverbindingen niet aanwezig zijn, heeft er geen groei plaats, terwijl bovendien de geoxydeerde quantiteiten tot op zekere hoogte evenredig zijn aan den groei.

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Bull. de l'Inst. Pasteur 30, 979, 1932.

<sup>2)</sup> A. CUNNINGHAM, Zentralbl. f. Bakt. II, 86, 320, 1932.

In een latere publicatie, waarin hij zijn proeven met de nitrificerende bacteriën van WINOGRADSKY beschrijft, maakt ook NELSON <sup>1)</sup> de opmerking, dat de rol, welke de door hem geïsoleerde heterotrophe micro-organismen in het nitrificatie-proces in de natuur spelen, onbelangrijk moet zijn.

Uit een bespreking van WINOGRADSKY <sup>2)</sup> blijkt, dat ook drie Russische onderzoekers, ROUNOFF, MICHOUSTINE en GOUBINE, op dit standpunt staan. Zij zijn van meening, dat de sporen nitriet soms ontstaan, doordat de bacteriën een oxydeerende stof afscheiden.

Op grond van al deze beschouwingen moeten wij wel tot de conclusie komen, dat er tot nu toe geen andere nitrificerende micro-organismen zijn geïsoleerd dan die, welke door WINOGRADSKY zijn beschreven.

§ 5. ONDERZOEKINGEN, WAARVAN DE UITKOMSTEN IN OVEREENSTEMMING ZIJN MET WINOGRADSKY'S INZICHT AANGAANDE DE OBLIGATE AUTOTROPHIE DER NITRIFICEERENDE ORGANISMEN.

Nu volgt de bespreking van die publicaties, waarin de resultaten van WINOGRADSKY worden bevestigd. Deze bespreking zal evenwel meestal beperkt blijven tot een korte aanduiding van hetgeen het onderzoek behelst. Alleen dan, wanneer een uitvoeriger bespreking ertoe kan bijdragen, een beter inzicht te krijgen van de moeilijkheden, welke zich bij deze onderzoekingen voordoen, of wanneer dit om andere redenen van belang kan zijn, zal hiertoe worden overgegaan.

In de eerste plaats moet dan worden genoemd OMELIANSKY <sup>3)</sup>, een leerling van WINOGRADSKY, die, zoowel tezamen met WINOGRADSKY als alleen, enkele onderzoekingen op het gebied van de nitrificatie heeft verricht. Behalve de onderzoekingen, welke ten doel hadden, den invloed van organische stoffen op de nitrificerende bacteriën na te gaan, heeft hij vooral op aansporen van WINOGRADSKY ook nog pogingen gedaan om op sneller en gemakkelijker wijze tot reincultures van deze bacteriën te geraken. In plaats van kiezelzuurplaten gebruikte hij met succes als voedingsbodems schijven filtreer-

<sup>1)</sup> D. H. NELSON, Zentralbl. f. Bakt. II, 83, 280, 1931.

<sup>2)</sup> S. WINOGRADSKY, Bull. de l'Inst. Pasteur 25, 305, 1927.

<sup>3)</sup> W. OMELIANSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 5, 329, 377, 429, 473, 537, 652, 1899; ibid. 8, 785, 1902.



papier of gips, gemengd met magnesiumcarbonaat en doordrenkt met oplossingen van de benodigde zouten. Door latere onderzoeken is dit soort platen ook wel beproefd, omdat de kiezelzuurplaten weinig bevredigende resultaten opleverden, maar meestal zonder succes, zoodat zij ten slotte weer tot kiezelzuurplaten terugkeerden.

BOULLANGER en MASSOL <sup>1)</sup> isoleerden ook nitrificeerende bacteriën, die niet in bouillon groeiden. Zij bestudeerden den invloed van een groot aantal kationen en anorganische en organische anionen op de nitrificatie.

WIMMER <sup>2)</sup> komt tot de conclusie, dat de bouillon-proef niet altijd voldoende is om na te gaan, of de cultures der nitrificeerende bacteriën wel rein zijn, omdat er ook andere bacteriën zijn, die in bouillon niet groeien. Hij verlangt daarom, dat in een oplossing van Nährstoff-Heyden in veertien dagen geen groei optreedt.

PEROTTI <sup>3)</sup> isoleerde uit Italiaanschen grond autotrophe nitrificeerende micro-organismen.

COLEMAN <sup>4)</sup> kreeg reincultures van *Nitrosomonas* en *Nitrobacter* van OMELIANSKY. Later bleek, dat de cultuur van *Nitrobacter* verontreinigd met een *Micrococcus*-soort, welke niet in bouillon groeide, maar wel in Nährstoff-Heyden, eenzelfde ervaring dus als WIMMER. Met behulp van nitriet-agar kreeg hij weer een reincultuur van *Nitrobacter*.

MAKRINOV <sup>5)</sup> maakte een studie van den invloed, welchen sommige organische meststoffen op de nitrificatie hebben. De hiervoor benodigde reincultures kreeg hij van OMELIANSKY. Later heeft hij ook zelf uit Moskouschen grond nitrificeerende bacteriën geïsoleerd, die niet op organische media groeiden. MAKRINOV vond, dat toevoeging van humusstoffen aan de gebruikelijke media een gunstigen invloed op den groei van nitrificeerende bacteriën kan hebben.

Voor zoover mij bekend, is dit het eenige geval, waarin een

<sup>1)</sup> E. BOULLANGER et L. MASSOL, Ann. de l'Inst. Pasteur 17, 492, 1903; ibid. 18, 181, 1904.

<sup>2)</sup> G. WIMMER, Zeitschr. f. Hyg. 48, 135, 1904.

<sup>3)</sup> R. PEROTTI, Rendiconti d. Acc. d. Lincei [302] 14, 228, 1905; ibid. [302] 15, 512, 1906; Ann. d. Botanica 3, 43, 1905; Ref. in: Centralbl. f. Bakt. II, 16, 258, 259, 1906 en ibid. II, 19, 357, 1907.

<sup>4)</sup> L. C. COLEMAN, Centralbl. f. Bakt. II, 20, 401, 484, 1908.

<sup>5)</sup> J. MAKRINOV, Centralbl. f. Bakt. II, 24, 415, 1910.

gunstige invloed van organische stof op den groei der nitrificerende organismen vrijwel vaststaat.

Uit geen der voorafgaande publicaties blijkt, dat de onderzoekers bijzonder veel moeite hadden met het in reïncultuur brengen van de nitrificerende bacteriën. Dit moet evenwel als een uitzondering worden beschouwd, daar men het er in het algemeen over eens is, dat dit zeer moeilijk is.

BONAZZI <sup>1)</sup> heeft veel moeite gehad met het in reïncultuur brengen en verder cultiveeren van *Nitrosomonas*; hij constateerde, dat de groei van dit organisme langzaam en onzeker was. Dit laatste feit, schrijft hij, wordt algemeen door onderzoekers op dit gebied erkend en de vraag, waarom een proces, dat in de natuur dikwijls zoo rigoreus verloopt, in synthetische media meestal langzaam gaat, is vaak het onderwerp van een discussie geweest, maar een werkelijke studie is van dit vraagstuk nooit gemaakt. De proeven van BONAZZI zelf hebben alle betrekking op uiteenloopende factoren, welke invloed uitoefenen op de stofwisseling van deze bacteriën.

GIBBS <sup>2)</sup> beschrijft in een uitvoerige publicatie, welke moeilijkheden hij ondervond bij het in reïncultuur brengen van de nitrificerende bacteriën volgens het oude recept van WINOGRADSKY. Ook geeft hij een uitvoerige beschrijving van de door hem geïsoleerde micro-organismen. Oorspronkelijk schijnt het zijn bedoeling te zijn geweest, met deze reïncultures verschillende onderzoekingen te verrichten, maar doordat de isolatie te veel tijd had gevraagd, heeft hij hiervan blijkbaar afgezien. Hij heeft veel meer moeite om *Nitrosomonas* in reïncultuur te krijgen dan *Nitrobacter*, omdat het eerstgenoemde organisme gewoonlijk niet wil groeien, wanneer koloniën ervan in een cultuurvloeistof worden geënt. Om na te gaan, of zijn cultures rein waren, entte hij deze in kolfjes met bouillon. Hierbij deed zich bij *Nitrosomonas* het merkwaardige feit voor, dat sommige dochtercultures van een reine moedercultuur niet rein waren en andere wel, terwijl de voortgezette overentingen van niet-reine cultures weer zoowel reine- als niet-reine cultures gaven. Voor dit verschijnsel geeft hij geen verklaring. Het is niet goed uit zijn beschouwingen op te maken, of hij dit in verband met *Hyphomicrobium* wil brengen, maar hij legt er wel den nadruk op,

<sup>1)</sup> A. BONAZZI, Journ. of Bact. 4, 43, 1919; ibid. 6, 479, 1921; Botanical Gazette 68, 194, 1919.

<sup>2)</sup> W. M. GIBBS, Soil Science 8, 427, 1919.



dat er in het algemeen niet genoeg rekening is gehouden met dit micro-organisme.

RUBENTSCHIK <sup>1)</sup> isoleerde uit limanen een stam van *Nitrosomonas*, die aan hoge zoutconcentraties is aangepast. Het minimum ligt ongeveer bij 3%, het optimum bij 5% keukenzout. Met veel moeite krijgt hij met behulp van kiezelzuurplaten een cultuur, welke niet groeit op organische voedingsbodems.

Zeer veel moeite om een reïncultuur te krijgen, heeft ook HEUBÜLT <sup>2)</sup> gehad. Hij heeft hiertoe verschillende vaste media gebruikt, maar zonder succes. Ten slotte kreeg hij, min of meer door toeval, met behulp van de verdunningsmethode een reïncultuur.

PROUTY <sup>3)</sup> verrichtte een onderzoek om na te gaan, of het niet mogelijk is, de nitrificerende bacteriën in reïncultuur te brengen met behulp van een andere dan de gebruikelijke, niet zeer bevredigende, techniek. Hij trachtte dit doel te bereiken door aan zijn *Nitrobacter*-cultures een kleurstof toe te voegen, welke vergiftiger is voor de in deze cultures voorkomende heterotrophe bacteriën dan voor *Nitrobacter*. Het meeste succes had hij met rosaniline, waarmede hij er in slaagde, *Nitrobacter*-cultures te krijgen, die, in bouillon geënt, geen groei meer geven. Bij nader onderzoek bleek hem evenwel, dat zijn cultures nog waren verontreinigd met *Hyphomicrobium*. Dit laatste micro-organisme kon hij op deze wijze niet elimineeren; hij moest daarvoor gebruik maken van nitriet-agarplaten.

NELSON <sup>4)</sup>, wiens eerste onderzoek reeds in de vorige paragraaf is besproken, kreeg later reïncultures van autotrophe bacteriën, door met behulp van een micromanipulator ééncel-cultures te maken. Om de kans te vergrooten, uit een ruwcultuur een nitrificerende cel te isoleeren, probeerde hij den groei der heterotrophe micro-organismen te onderdrukken. Om dit te bereiken voegde hij aan de *Nitrosomonas*-cultures kopercarbonaat toe en aan de *Nitrobacter*-cultures in navolging van PROUTY rosaniline.

Merkwaardig is het, dat de door NELSON geïsoleerde *Nitrobacter* beweeglijk is, terwijl tot nu toe alleen een onbeweeglijke vorm bekend was. Doordat hij ten onrechte aannam, dat ook FRED en DAVENPORT een beweeglijke *Nitrobacter* in handen hebben gehad,

<sup>1)</sup> L. RUBENTSCHIK, Centralbl. f. Bakt. II, 77, 1, 1928.

<sup>2)</sup> J. HEUBÜLT, Planta 8, 398, 1928.

<sup>3)</sup> CHAS. C. PROUTY, Soil Science 28, 125, 1929.

<sup>4)</sup> D. H. NELSON, Zentralbl. f. Bakt. II, 83, 280, 1931.

heeft hij aan zijn vondst niet die beteekenis toegekend, waarop zij recht zou hebben, indien hier inderdaad geen verontreiniging aanwezig zou zijn geweest. Thans blijft zeker nog de mogelijkheid bestaan, dat NELSON, hoewel hij ééncel-cultures had, deze beweeglijkheid heeft geconstateerd in een verontreinigde cultuur. Deze waarneming kan immers zoowel zijn gedaan aan een verontreinigde ééncel-cultuur, welke toevallig van de lucht uit is geïnfecteerd, of doordat er in plaats van één cel ongemerkt twee werden geïsoleerd. NELSON vermeldt in zijn publicatie niet, of alle door hem verkregen ééncel-cultures ook inderdaad rein waren, zoodat er op dit punt dus onzekerheid blijft bestaan. Deze twijfel is vooral ook gewettigd, omdat NELSON op zulk een groote schaal ééncel-cultures maakte (ongeveer 600), dat men zich afvraagt, of hij wel steeds zeker was, dat hij ook werkelijk één cel isoleerde. Bij het werken met den micromanipulator heb ik ondervonden, dat het maken van ééncel-cultures van zulke kleine organismen als de nitrificeerende bacteriën zeer tijdrovend is, wanneer men alleen die druppeltjes neemt, waarvan men met zekerheid kan zeggen, dat zich daarin slechts één cel bevindt. Dat een strenge contrôle bij het maken van een ééncel-cultuur een eerste vereischte is, behoeft geen betoog. Het komt mij voor, dat dit een punt is, dat tegenwoordig te veel over het hoofd wordt gezien en dat er te veel naar wordt gestreefd, in den kortst mogelijken tijd een maximum aantal cellen te isoleren, hetgeen aan de waarde van de methode veel afbreuk doet.

Terloops moet er nog op een onjuiste vertaling door NELSON van een zinsnede uit een publicatie van HEUBÜLT worden gewezen. Terwijl in het oorspronkelijke stuk en ook in de door NELSON geciteerde regels duidelijk staat te lezen, dat de door HEUBÜLT geïsoleerde *Nitrosomonas* niet groeit bij aanwezigheid van pepton, leest NELSON hier juist het tegenovergestelde uit. De conclusie van NELSON, dat de cultuur van HEUBÜLT niet rein zou zijn, is dus onjuist.

Hiermede is een volledig overzicht gegeven van de mij bekende publicaties der onderzoekers, die de nitrificeerende bacteriën in reincultuur kregen. Wanneer men alles nog eens nagaat, dan blijkt, dat van de dertien onderzoekers, die de resultaten van WINOGRADSKY konden bevestigen, tien geheel zelfstandig werkten, terwijl de drie anderen direct of indirect met WINOGRADSKY in contact stonden en het hierdoor dus gemakkelijker hadden.



Hier moet dan verder nog melding worden gemaakt van een aantal onderzoekers, die hebben bekend, er niet in te kunnen slagen, de nitrificerende bacteriën in reïncultuur te brengen. Dit zijn: BERSTEYN <sup>1)</sup>, MEEK en LIPMAN <sup>2)</sup>, MURRAY <sup>3)</sup>, GOWDA <sup>4)</sup> en ROMELL <sup>5)</sup>, welke laatste onderzoeker zelfs bij WINOGRADSKY heeft gewerkt.

Het aantal onderzoekers, dat reïncultures kreeg, is dus ondanks het feit, dat zoo velen zich met dit vraagstuk bezighielden, zeer klein. Men moet niet vergeten, dat het aantal der personen, dat nitrificatie-studiën heeft verricht, ongetwijfeld nog veel grooter is dan uit het voorafgaande blijkt. Want niet alleen is het gegeven overzicht niet volledig, maar ook zijn bovendien niet genoemd die onderzoekers, die zich bewust alleen met ruwcultures bezighielden en daaronder zullen er zeker ook velen zijn geweest, die wel pogingen hebben gedaan om reïncultures te krijgen. Men vraagt zich nu af, wat toch de redenen kunnen zijn, waarom zoo weinig pogingen om tot een reïncultuur te komen succes hadden. Het is nauwelijks denkbaar, dat alleen de moeilijke techniek als gevolg van de kleine afmetingen van de koloniën der nitrificerende bacteriën hiervoor aansprakelijk is. Men moet haast aannemen, dat er onbekende factoren zijn, welke een belangrijke rol spelen, een indruk, welke door de literatuurstudie wordt bevestigd. In dit verband zij hier nog gewezen op de uitkomsten van een onderzoek van den hierboven genoemden onderzoeker MURRAY. Deze kon alleen ruwcultures krijgen, die nitrificerend vermogen bezaten; in reïncultures ging dit vermogen spoedig verloren. Zijn pogingen, met vitaminen de reïncultures weer op gang te brengen, hadden geen succes.

Tenslotte zij nog melding gemaakt van de recente, zeer uitvoerige publicatie van WINOGRADSKY <sup>1)</sup> over het onderwerp in kwestie. Aan het verslag van zijn onderzoekingen gaat eveneens een kritisch overzicht vooraf van de vele publicaties, welke eerder over dit onderwerp zijn verschenen. Ook nu weer komt WINOGRADSKY tot de conclusie, dat zijn klassieke werk volkomen is bevestigd. Hij schrijft: „Il a été mis hors de doute que les agents actifs sont à chercher

<sup>1)</sup> P. BERSTEYN, Arb. aus dem Bakt. Inst. der T. H. zu Karlsruhe 3, 83, 1903.

<sup>2)</sup> C. S. MEEK and C. B. LIPMAN, The Journ. of Gen. Physiology 5, 195, 1923.

<sup>3)</sup> T. J. MURRAY, Proc. of the Soc. for Exp. Biology and Medicine 20, 301, 1923.

<sup>4)</sup> R. N. GOWDA, Journ. of Bact. 9, 251, 1924.

<sup>5)</sup> L. G. ROMELL, Medd. fr. Statens Skogförsökanstalt 24, 57, 1928.

exclusivement dans le groupe physiologique, dont l'énergétique est basée sur l'oxydation des substances inorganiques: les autotrophes. Tous les efforts pour trouver des hétérotrophes, capables d'exercer cette fonction, ont échoué et n'ont abouti qu'à des méprises".

Dat nog lang niet iedereen dit inzicht deelt, is uit het voorafgaande wel afdoende gebleken en komt ook nog tot uiting in een zeer recente publicatie van BARRITT <sup>2)</sup>). Deze schrijft naar aanleiding van zijn litteratuuroverzicht: „It would appear from this review, that amongst recent workers there exists considerable support for the views of those, who worked prior to WINOGRADSKY's clear-cut account of the autotrophic character of the organisms".

Het schijnt, dat men, om de publicaties op dit gebied naar waarde te kunnen beoordeelen, zelf ook over praktische ervaring met deze organismen moet beschikken. Vele leerboeken — behalve de reeds eerder door mij vermelde noemt WINOGRADSKY nog RIPPEL — geven hiervan het bewijs.

Daarom komt het mij voor, dat de in dit hoofdstuk gegeven beschouwingen, hoewel zij noodzakelijkerwijze veel gemeen hebben met die van WINOGRADSKY, toch, zoowel door hun aard als door hun inhoud, voldoende van deze verschillen om te kunnen bijdragen tot een beter inzicht in dit vraagstuk.

Naar aanleiding van de volgende uitspraak van WINOGRADSKY zou ik nog enkele opmerkingen willen maken.

„Notre but était de montrer plutôt que la connaissance de ces microbes importants n'a fait que très peu de progrès, et que, surtout aucune nouvelle méthode n'a été tentée pour faciliter et étendre leur étude. Tous les auteurs se sont tenus strictement à l'ancien programme, à savoir: 1<sup>o</sup>. culture élective ou d'enrichissement dans la solution ammoniacale et nitreuse; 2<sup>o</sup>. isolement à l'état de pureté au moyen des milieux consacrés; 3<sup>o</sup>. chimiosynthèse; 4<sup>o</sup>. influence des aliments organiques et de l'ammoniac sur les deux agents. Les recherches, pourrait on dire, ont tourné en rond autour de ce programme. Il paraît que ce thème gardait si longtemps son attrait de nouveauté, et que la difficulté de la technique minutieuse, nécessaire pour isoler les microbes à l'état de pureté absolue, tentait à les redécouvrir dans les différents sols de différents pays".

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY et H. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 50, 350, 1933.

<sup>2)</sup> N. W. BARRITT, The Annals of Applied Biology 20, 165, 1933.



Dat onze kennis van deze bacteriën sedert hare ontdekking door WINOGRADSKY weinig is toegenomen en ook dat de meeste onderzoekers zich met hetzelfde programma hebben beziggehouden, is volkomen juist. Dit vindt zijn verklaring ongetwijfeld in het feit, dat onderzoekers, die zich de studie van deze bacteriën tot taak hebben gesteld en die zich dus op het verkrijgen van reïncultures hebben toegelegd, direct op allerlei moeilijkheden stuitten en dus hun aandacht op de daarmee samenhangende problemen hebben geconcentreerd.

WINOGRADSKY stelt zich nu in deze recente publicatie op het standpunt, dat deze moeilijkheden en de daaruit voortvloeiende beperkte doelstelling der latere onderzoekingen een gevolg zijn van de principieele onjuistheid om vóór alles naar reïncultures te willen streven. Hij erkent, dat deze weg éénmaal moest worden bewandeld, maar vindt, dat daarna voor een verderen opbloeï van de kennis van de nitrificatie in den akkerbodem andere en in uitvoering eenvoudiger methoden behooren te worden toegepast. Karakteristiek is in dit verband zijn volgende uitlating: „Mais une fois cette caractéristique établie et confirmée, on ne voit plus raison de refaire ce chemin de pionnier si long et si laborieux. Tout ce que l'on peut dire actuellement de l'ancien procédé, jugé comme une méthode courante, c'est qu'il ne conserve qu'une valeur historique.”

Het komt mij voor, dat WINOGRADSKY hier onder den indruk van de belangwekkende door hem met zijn kiezelzuurplaat-cultures verkregen resultaten te ver gaat. Het lijdt geen twijfel, of de nieuwe door hem uitgewerkte methode leent er zich, mits zij door ervaren onderzoekers wordt gehanteerd, bij uitstek toe om een betrouwbaren indruk te krijgen van de mate van voorkomen en van activiteit van de nitrificeerende bacteriën in een gegeven grondmonster. Anderzijds moet evenwel worden geaccentueerd, dat ook aan deze methode zeker allerlei gevaren zijn verbonden en wanneer WINOGRADSKY deze in zijn onderzoek grootendeels weet te vermijden, dan is dit ongetwijfeld voor een belangrijk deel daaraan toe te schrijven, dat hij door zijn vroegere reïncultuurstudiën grondig met de bewuste bacteriëngroep vertrouwd was geraakt.

Intusschen zal in Hoofdstuk III worden toegelicht, dat ook WINOGRADSKY zelf op sommige punten het slachtoffer is geworden van het verwerpen der reïncultuurmethodiek.

Ik heb dan ook gemeend, dat het voor het verkrijgen van een

nader inzicht in de eigenschappen der nitrificerende bacteriën nog steeds onmisbaar is, aan te vangen met het aanleggen van reïncultures dezer organismen. In dit opzicht beteekent de nieuwe door WINOGRADSKY gepropageerde methode geen principieele vooruitgang. Immers bij de nieuwe methode hoopt men direct op een vasten voedingsbodem op en bij de oude eerst in een vloeistof-medium. Wil men bij toepassing der nieuwe methode reïncultures hebben, dan behoeft men volgens WINOGRADSKY maar met den micromanipulator ééncel-cultures te maken van de koloniën van zulk een plaat. In theorie is dit juist, maar in de practijk zal men daarbij minstens evenveel bezwaren ontmoeten als bij de oude methode.

Uit het voorafgaande overzicht is nu wel afdoende gebleken, dat aan de isolatie der nitrificerende bacteriën nog groote moeilijkheden zijn verbonden en ik meen dan ook, dit overzicht te mogen besluiten met de m.i. nog steeds van kracht zijnde woorden van GOWDA, welke deze onderzoeker naar aanleiding van zijn mislukte pogingen om tot een reïncultuur te komen neerschreef, namelijk: „The whole problem of the isolation of nitrifiers and the methods of such isolation therefore still remain to be solved”.

---



## HOOFDSTUK II.

### OPHOOPING EN ISOLATIE VAN NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

#### § 1. INLEIDENDE OPMERKINGEN.

Zooals reeds is vermeld, was het mijn bedoeling, nitrificeerende bacteriën te isoleeren. Aangezien niemand er ooit met behulp van media met organische verbindingen in was geslaagd, krachtig nitrificeerende bacteriën te isoleeren, lag het voor de hand, in de eerste plaats voor de ophooping van de bedoelde bacteriën anorganische media te gebruiken. Evenals vele andere onderzoekers gebruikte ik daarom het anorganische medium van WINOGRADSKY. Het duurde vrij lang, voordat ik ophooping had, welke nitrificeerden, maar ten slotte had ik toch succes. Van de vele, door mij uit deze ophooping geïsoleerde, heterotrophe micro-organismen bleek er geen enkele te zijn, welke in reïncultuur nitrificeerde. Evenmin slaagde ik er aanvankelijk in, autotrophe nitrificeerende bacteriën te isoleeren. Ook deed ik veel moeite om de door KASERER beschreven micro-organismen te isoleeren, doch eveneens zonder resultaat. Ten slotte gelukte het echter, autotrophe bacteriën in reïncultuur te brengen.

#### § 2. OPHOOPING VAN NITRITEERENDE BACTERIËN.

Voor de ophooping van nitriteerende bacteriën werd gebruik gemaakt van een cultuurvloeistof, welke de door WINOGRADSKY aangegeven samenstelling had:

ammoniumsulfaat . . . . .	1 gr.
dikaliumphosfaat . . . . .	1 „
natriumchloride . . . . .	2 „
magnesiumsulfaat . . . . .	0,5 „
ferrisulfaat . . . . .	0,01 „
basisch magnesiumcarbonaat . . .	10 „
water . . . . .	1 L.

In het begin werden Erlenmeyers van 1 L. gebruikt, waarin ongeveer 150 cc van de cultuurvloeistof werd gebracht, zoodat de

vloeistoflaag een hoogte had van 1,5 à 2 cm. Deze kolven werden met tuingrond geënt en vervolgens in een thermostaat van 30° C. geplaatst. Na verloop van eenigen tijd werd dan met NESSLER'S reagens op ammoniak gereageerd om na te gaan, of de ammoniak verdween. Tevens werd met het reagens van GRIESS-ROMIJN onderzocht, of er ook nitriet was gevormd.

Dit reagens van GRIESS-ROMIJN wordt bereid door één deel  $\alpha$ -naphthyl-amine, 10 deelen sulfanilzuur en 90 deelen wijnsteen zuur in een mortier goed te mengen. Van dit poeder werpt men een kleine hoeveelheid ( $\pm$  25 mgr) in ongeveer 1 ccm van de te onderzoeken vloeistof, waardoor deze rood wordt gekleurd, indien zij nitriet bevat. Het voordeel van dit reagens is, dat het onbepaald langen tijd goed blijft. Wat gevoeligheid betreft staat het geenszins bij de gebruikelijke reagentia op nitriet achter; 0,01 mg  $\text{NaNO}_2/\text{L}$  geeft nog een duidelijke roodkleuring.

Tot mijn teleurstelling had de nitrificatie of in het geheel niet plaats of zij had een zeer langzaam en onzeker verloop. Wel verdween de ammoniak, maar hiervoor werden niet de verwachte hoeveelheden nitriet of nitraat teruggevonden.

Oorspronkelijk meende ik, dat de entingen niet zwaar genoeg waren geweest, waarom ik er toe overging, voor de enting steeds grootere hoeveelheden grond te gebruiken, doch ook dit had weinig resultaat. Om te voorkomen, dat bij de enting met veel tuingrond de concentratie van organische stof te hoog zou worden, gebruikte ik grootere Erlenmeyers; op deze wijze kon ik meer vloeistof gebruiken, zonder dat de vloeistoflaag te hoog werd.

In enkele gevallen had wel nitritatie plaats, maar dan bleek, dat deze meestal na de eerste overenting ophield. Ook werden de voor de enting gebruikte grondsoorten gevarieerd, maar ook dit gaf geen resultaat. Ook entingen met „activated sludge” hadden geen succes.

Bij deze eerste proefnemingen was leidingwater gebruikt en ook de toegepaste chemicaliën waren lang niet zuiver. De mogelijkheid was dus niet uitgesloten, dat verontreinigende stoffen de oorzaak waren van de minder goede nitrificatie. In de eerste plaats werd hierbij gedacht aan de verontreiniging door organische stoffen. Daar van alle chemicaliën het magnesiumcarbonaat het minst zuiver was, werd hiervoor genomen het basische magnesiumcarbonaat pro-analyse van MERCK. Deze verandering had onmiddellijk het gunstige resultaat, dat in de met tuingrond geënte kolven de



ammoniak vlot tot nitriet werd geoxydeerd en dat ook de overentingen goed bleven nitriteeren. In Erlenmeyers van 300 cc met 50 cc cultuurvloeistof werd 0,05 gr ammoniumsulfaat in een week tijds geoxydeerd, wanneer deze kolfjes met 1 cc cultuurvloeistof uit een nitriteerend kolfje werden geënt. Was de eerste hoeveelheid van 0,05 gr ammoniumsulfaat verdwenen, dan duurde het drie à vier dagen om een tweede portie van 0,05 gr te laten verdwijnen.

Later bleek, dat de cultuurvloeistoffen met het onzuivere magnesiumcarbonaat een zeer hoge pH hadden. Met de glaselectrode werd in de vloeistof met het zuivere magnesiumcarbonaat na steriliseeren een pH van 9.1 gemeten en in die met het onzuivere magnesiumcarbonaat één van 10,1. De slechte werking van het onzuivere magnesiumcarbonaat moet dus wel in de eerste plaats worden geweten aan den ongunstigen invloed, welken het heeft op de pH van de cultuurvloeistof.

Aangemoedigd door het gunstige resultaat van het vervangen van het onzuivere magnesiumcarbonaat door het pro-analyse product werd besloten, ook alle andere niet zuivere chemicaliën door zuivere te vervangen. In de eerste plaats werd het leidingwater door gedestilleerd water vervangen en werden de andere chemicaliën door eenige malen omkristalliseeren zooveel mogelijk gereinigd. Met het vervangen van leidingwater door gedestilleerd water hoopte ik een tweeledig doel te bereiken, nl. vóór alles de ontwikkeling van de begeleidende heterotrophe micro-organismen te onderdrukken en in de tweede plaats een nog wat betere nitritatie te krijgen. Daar ik mij ten doel had gesteld, reincultures te krijgen, leek het mij belangrijk, te trachten den groei der heterotrophe micro-organismen zooveel mogelijk te onderdrukken. Practisch was er echter van een afname van het aantal heterotrophe organismen weinig te bespeuren. Ook trad geen merkbare verandering in de snelheid van nitritatie op.

Inmiddels had ik van alle chemicaliën de zuivere praeparaten in gebruik genomen. Bij de eerste overentingen was niet uit te maken, of deze verandering gunstig of nadeelig werkte. Na verloop van een maand, dus na ongeveer vier overentingen, ging de nitritatiesnelheid echter sterk achteruit en in sommige gevallen hield de nitritatie geheel op.

Daar vooral in het begin de nitritatie zoo onregelmatig verliep, had ik dadelijk reeds de gewoonte aangenomen om van die kolfjes, welke nitriteerden, steeds eenige over te enten om zodoende

met grootere zekerheid de nitriteerende cultures aan te houden.

De genoemde achteruitgang in nitritatiesnelheid constateerde ik niet bij een enkel kolfje, maar zij had plaats bij een serie van tien kolfjes, welke ik in dien tijd aanhield.

Hoewel de achteruitgang dus niet direct was te merken, meende ik toch, dat deze moest zijn te wijten aan het gebruik van de zuivere praeparaten en het leek mij de moeite waard, deze kwestie systematisch te onderzoeken. Hierbij bleek, dat men van alle chemicaliën zonder nadeeligen invloed de zuivere praeparaten kon gebruiken, maar dat het gebruik van zuiver keukenzout fataal was.

In hoofdstuk IV zal nader op deze kwestie worden ingegaan; hier ter plaatse zal ermede worden volstaan op te merken, dat, indien van een passend monster ruw keukenzout — niet alle monsters keukenzout bleken namelijk even bruikbaar — werd gebruik gemaakt, in de cultures steeds krachtige nitritatie optrad. Verdere proefnemingen leerden intusschen, dat men veel onafhankelijker werd van de keuze van het te gebruiken keukenzoutmonster, wanneer het gedestilleerde water nog door leidingwater werd vervangen. Nadat deze gezichtspunten waren verkregen, leverde de ruwcultuur van *Nitrosomonas* geenerlei moeilijkheden op.

### § 3. HET VERKRIJGEN VAN KOLONIËN VAN *NITROSOMONAS* OP KIEZELZUURPLATEN.

Toen eenmaal krachtige cultures waren verkregen, besloot ik over te gaan tot het aanleggen van plaatcultures van *Nitrosomonas*. Hiertoe werden, naar aanleiding van de ervaring van WINOGRADSKY, in eerste instantie kiezelzuurplaten geprobeerd. Deze kiezelzuurplaten werden als volgt bereid: 50 cc geconcentreerd waterglas uit den handel werden verdund met 220 cc water, zoodat het S.G. 1,086 werd. Het verdunde zoutzuur, dat werd gebruikt om het waterglas te neutraliseeren, werd verkregen door bij 200 cc water 36 cc geconcentreerd zoutzuur te gieten. Daarna werd het waterglas met het zoutzuur getitreerd met phenolphthaleïne als indicator om vast te stellen, in welke verhouding men deze twee oplossingen bij elkaar moest gieten. De zoo verkregen platen werden in enkele minuten vast. Aan deze platen werd, onmiddellijk nadat de beide oplossingen bij elkaar waren gegoten, nog een suspensie van magnesiumcarbonaat toegevoegd. Na het stollen werden de platen in stroomend water geplaatst om de overmaat van het bij de neutralisatie gevormde



keukenzout uit te wasschen. Na het uitwasschen werd een smal strookje kiezelzuur langs den rand van de doos weggenomen, waardoor een gootje ontstond, waarin de oplossing van de overige zouten werd gegoten, zoodat deze in de plaat konden diffundeeren. Voordat de oplossing met de voedingszouten werd toegevoegd, werd de plaat eerst 24 uur in een thermostaat van 50° C. gedroogd. Het oppervlak van deze platen werd gesteriliseerd door het even te flambeeren.

Daar ik in de meeste gevallen geen nitritatie kreeg, werd nog geprobeerd, of dit niet kon worden verbeterd door het waterglas over norit te filtreeren. Wel werd het daardoor lichter van kleur, maar de nitritatie bleef even slecht.

Op alle geënte platen, of er nitritatie optrad of niet, ontwikkelden zich koloniën van verschillende micro-organismen. In de eerste plaats werd natuurlijk gezocht op die enkele platen, waarin nitritatie had plaats gehad. Daar de platen door het toegevoegde magnesiumcarbonaat nogal ondoorzichtig waren geworden, werden stukken kiezelzuur met behulp van een gillette mesje uit de schalen gelicht. Deze mesjes kunnen, doordat zij zoo buigzaam zijn, zeer gemakkelijk onder het kiezelzuur worden geschoven, zonder dat dit scheurt. Van deze stukken kon ik weer zonder moeite de onderste laag, waarin het meeste magnesiumcarbonaat ligt, afsnijden, zoodat een laagje goed doorzichtig kiezelzuur werd verkregen. Deze stukken kiezelzuur werden in een, alleen aan de zijkanten open, glazen kamertje gelegd om ze gedurende het microscopeeren en manipuleeren voor infecties uit de lucht zooveel mogelijk te vrijwaren. Slechts zeer zelden werden echter koloniën gevonden, welke in uiterlijk eenigszins geleken op de door WINOGRADSKY verkregen koloniën, zooals die zijn afgebeeld in het handboek van LAFAR<sup>1)</sup>.

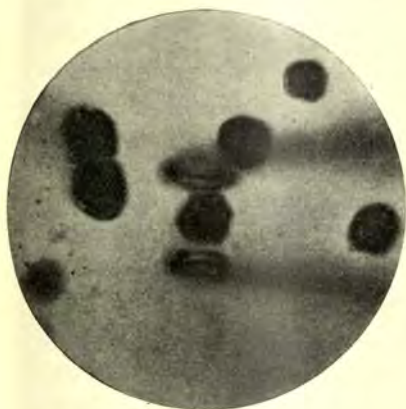
Vele van de verschillende koloniën werden met micropipetjes met behulp van den micromanipulator volgens JANSE-PÉTERFI<sup>2)</sup> in Erlenmeyers van 50 cc met 10 cc ammoniumsulfaat-oplossing geënt, maar nooit trad nitritatie op. Bij iedere enting werd de punt van het pipetje in het kolfje afgebroken. Het afgebroken pipetteneind werd even in de vlam verhit om het steriel te maken en vervolgens werd met behulp van een microvlammetje opnieuw een uiterst fijn

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY in: F. LAFAR, Handbuch der technischen Mykologie III, 312, 1906.

<sup>2)</sup> Men zie voor de beschrijving van dezen micromanipulator: T. PÉTERFI, Mikrurgische Methodik, in: E. ABDERHALDEN, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. V, Tl. 2, 1923.

puntje aan de pipet gemaakt. Op deze manier was ik dus zeker, dat voor iedere enting een steriel pipetje werd gebruikt. Evenals PÉTERFI gebruikte ik als microbrander een injectienaald.

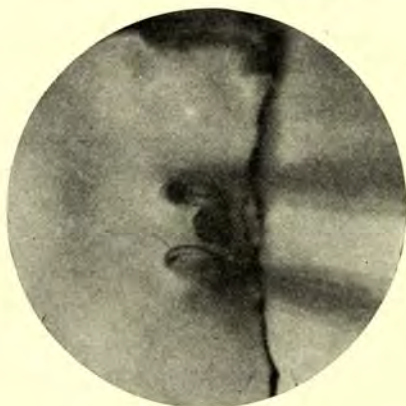
Een enkele maal had ik het geluk, dat ik eenige harde koloniën vond, zooals die in LAFAR zijn afgebeeld. Daar deze koloniën zeer hard waren en zich met een pipetje niet lieten doorsteken, werd naar een ander middel gezocht om deze over te enten. Heel geschikt



Afb. 1.

*Nitrosomonas.*

Harde koloniën op kiezelzuurplaat en oogjes micropincet (Vergr. 125 ×).



Afb. 2.

*Nitrosomonas.*

Harde kolonie in water op microlepel.  
(Vergr. 125 ×).

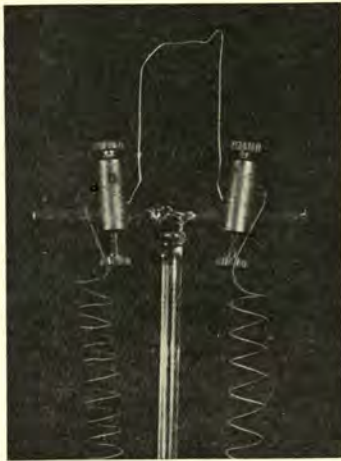
bleek dit te gaan met een micropincet. Een essentieel onderdeel van dit pincet wordt gevormd door de door Zeiss bij den PÉTERFI-micromanipulator geleverde „Doppelte Nadelhalter”. In de beide beenen van dit instrument kan iedere onderzoeker die micro-werk-tuigen plaats, welke hem het meest geschikt voorkomen. In dit geval werden in het pincet glazen staafjes gezet, welke aan het uiteinde zeer dun waren uitgetrokken en waaraan vervolgens een oogje was gemaakt van  $\pm 20 \mu$  diameter.

Oorspronkelijk gebruikte ik het pincet met één oogje en één recht been, omdat ik dan ook maar het gevaar liep één oogje te breken. Het maken van de oogjes is namelijk niet eenvoudig en vrij tijdroovend. Een pincet met twee oogjes pakt evenwel zooveel beter, dat men toch tijd wint door het gebruiken van zulk een pincet. Op Afb. 1 ziet men een deel van een plaat met harde koloniën,



waarbij men tevens kan waarnemen, hoe met de oogjes-pincet een kolonie zal worden verwijderd.

Ik meen goed te doen, hier de vervaardiging van deze oogjes even in details te beschrijven. <sup>1)</sup> Van belang is, dat het staafje plotseling zeer snel dun wordt uitgetrokken, opdat het oogje niet aan het eind van een langen dunnen glasdraad komt, waardoor de beenen van het pincet te slap zouden worden. De uiteinden moeten nogal stug zijn, omdat men anders de koloniën niet van het kiezelzuur kan losmaken. Om de staafjes dun uit te trekken, worden deze aan een statief opgehangen en wordt er vervolgens een glazen haakje aan gesmolten, waaraan een blikken schaalje hangt. In dit schaalje wordt een gewicht van 50 gr gelegd en vervolgens wordt met een microvlammetje het staafje doorgesmolten. Op het moment, dat het gewicht valt, moet het vlammetje haastig worden weggetrokken, omdat anders het dunne eind door het vlammetje wordt omgesmolten. Is het uittrekken goed gelukt, dan wordt het staafje in een van de houders van den micromanipulator geklemd en het fijne uiteinde tegenover een electricch verwarmden platinadraad (Zie: Afb. 3) geplaatst. Door met den duim krachtig op de ijzeren grondplaat



Afb. 3.

van den micromanipulator te drukken, buigt deze door en buigen de houders van den micromanipulator dus naar elkaar toe. Het gevolg is, dat het uiteinde van het glas tegen den heeten platinadraad botst, waardoor het ombuigt. Door dit eenige malen te herhalen, kan men een volledig oogje maken. Van groot belang is de juiste temperatuur van den platinadraad. Is deze te hoog, dan smelt het glas aan het platina vast en is zij te laag, dan wil het glasdraadje niet goed buigen. De temperatuur van den platinadraad kan men goed controleren met behulp van een oculairmicrometer. Scha-

<sup>1)</sup> Deze techniek is voor een deel ontleend aan: S. L. SCHOUTEN, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie 22, 10, 1905; *ibid.* 24, 258, 1907.

kelt men den stroom in, dan ziet men den draad door het gezichtsveld bewegen ten gevolge van de uitzetting door de verwarming. Heeft men nu eenmaal gezien, hoeveel schaaldeelen de draad moest uitzetten om een gunstige temperatuur te bereiken, dan kan men later diezelfde temperatuur gemakkelijk terugvinden, door denzelfden draad dan weer evenveel schaaldeelen te laten uitzetten.

Wanneer de oogjes klaar zijn, moeten de uiterste einden van het pincet nog een weinig worden omgebogen, zoodat, wanneer men het pincet horizontaal houdt, de oogjes een mm of drie onder het vlak van de horizontale beenen komen te liggen. Op deze wijze kan men met de oogjes de oppervlakte van de kiezelzuurplaat benaderen, zonder dat de rest van de glazen staafjes stoort.

Telkens na overenting van een kolonie werd het pincet gesteriliseerd door het eerst even in geconcentreerd zwavelzuur en daarna in sterke ammoniak te dompelen en het vervolgens in steriel water af te spoelen.

Omdat de koloniën door het verdampen van het water tijdens het transport dikwijls zoo vast aan de oogjes kleefden, dat zij zich er niet meer van lieten afspoelen, gebruikte ik later voor het overbrengen naar het kolfje een speciaal daartoe vervaardigd glazen lepeltje. Dit lepeltje was gemaakt door een scherfje dekglas aan een dun glasstaafje te smelten. Het werd met een druppeltje steriel water erop in den anderen houder van den micromanipulator bevestigd en dan in de buurt van de over te enten kolonie gebracht, zoodat deze met het pincet direct in het druppeltje water kon worden overgebracht. Afb. 2 geeft weer, hoe de kolonie van Afb. 1 juist is overgebracht in het dunne vloeistoflaagje, dat zich boven op het glazen lepeltje bevindt. Dit lepeltje ziet men op de linker helft van de afbeelding; de grenzen van het lepeltje worden gevormd door de twee onregelmatige, onderling rechthoekig staande, lijnen.

Ook het lepeltje werd bij iedere overenting op dezelfde wijze gesteriliseerd als het pincet.

In totaal werden met pipet en pincet een 150-tal koloniën overgeënt. Van de koloniën, welke met de pipet werden overgeënt, vertoonde verreweg het grootste gedeelte geen gelijkenis met de door WINOGRADSKY gegeven afbeeldingen. Daar echter op de meeste platen geen koloniën waren te vinden, welke daarmede wel eenige gelijkenis hadden en er toch duidelijk een oxydatie van ammoniak



had plaats gehad, wilde ik onderzoeken, of er nu werkelijk onder deze koloniën niet enkele waren, die toch konden nitriteeren. Het resultaat was evenwel voor al deze koloniën negatief.

Met het pincet had ik iets meer succes. Van de 26 koloniën, welke ik hiermede overentte, nitriteerden er 3. Het bleek evenwel, dat zij niet rein waren. Uit ieder van deze cultures kon ik met behulp van peptonagarplaten 6 verschillende bacteriën isoleeren. Natuurlijk werd geprobeerd, van deze kolfjes nog eens platen te krijgen, maar dit gelukte niet.

Inmiddels probeerde ik, of ik niet door dialyseeren van het kiezelzuur een beteren voedingsbodem kon krijgen. Het gelukte mij in het begin echter niet, op deze wijze platen te krijgen; het kiezelzuur werd of vast in de perkamenten hulzen, of wilde na het dialyseeren niet meer vast worden. Daarom zag ik hiervan voorloopig af.

Behalve dit probeerde ik ook nog andere platen, zooals uitgewasschen agar en de door OMELIANSKY <sup>1)</sup> aanbevolen papierschijven en gips-magnesiumcarbonaatplaten. Bij de eerste en tweede soort platen kreeg ik nooit nitritatie en bij de laatste slechts in enkele gevallen. Daar deze platen ondoorzichtig zijn, was het werken hiermede nogal lastig, zoodat ik ook dit opgaf. Ook probeerde ik nog, of ik uit andere grondmonsters en uit „activated sludge” betere stammen van nitriteerende bacteriën kon isoleeren, doch eveneens zonder resultaat.

Daar ik dus nooit een goede ontwikkeling op platen kreeg, probeerde ik door middel van de verdunningsmethode reïncultures te krijgen, evenwel ook zonder succes. Het bleek, dat er nog altijd veel meer heterotrophe organismen in de cultuurvloeistof waren dan nitriteerende bacteriën. Daarom nam ik, het voorbeeld van NELSON <sup>2)</sup> volgende, mijn toevlucht tot kopercarbonaat om hiermede den groei van heterotrophe organismen te onderdrukken. In de kolfjes met magnesiumcarbonaat werd door het kopercarbonaat de nitritatie evenwel volkomen geremd. Daarop probeerde ik, of het met krijt en kopercarbonaat niet beter zou gaan, wat evenmin resultaat opleverde. Vervolgens onderzocht ik, hoeveel mg kopersulfaat een kolfje met krijt zou kunnen verdragen, waarbij ik vond, dat 10 mg kopersulfaat per 50 cc cultuurvloeistof nog toelaatbaar was. Het aan-

---

<sup>1)</sup> W. OMELIANSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 8, 785, 1902.

<sup>2)</sup> D. H. NELSON, Zentralbl. f. Bakt. II, 83, 280, 1931.



tal heterotrophe micro-organismen nam echter niet voldoende af om door verdunning tot een reïncultuur te komen. Om het den heterotrophen micro-organismen nog moeilijker te maken, plaatste ik de kolfjes met krijt en kopersulfaat in een plantenkas, omdat BEIJERINCK<sup>1)</sup> vroeger had gevonden, dat de lucht daarin zoo weinig is verontreinigd, dat zelfs *Bac. oligocarboophilus* zich daar niet kon ontwikkelen. Maar ook in dit geval ontwikkelden de heterotrophe bacteriën zich in verhouding tot de nitriteerende bacteriën nog te sterk om door de verdunningsmethode tot een reïncultuur te komen. Tevens probeerde ik nog door het toevoegen van veel nitriet aan de cultuurvloeistof den groei der heterotrophe organismen te onderdrukken. Met 350 mg natriumnitriet per 50 cc cultuurvloeistof had nog nitritatie plaats, zij het dan ook langzaam, maar ook de heterotrophe bacteriën konden nog groeien. Enkele pogingen om met de negatieve-plaat-methode tot een reïncultuur te komen — door dus steriel gebleven stukjes agar uit een entstreep van een peptonagarplaat in de cultuurvloeistof te brengen — slaagden evenmin. In geen enkel geval trad nitritatie op.

Daar dus geen enkele poging succes had, besloot ik, het nog eens te probeeren met kiezelzuurplaten, gemaakt van een andere kwaliteit waterglas. Hiervoor gebruikte ik het chemisch reine waterglas van MERCK (S.G. 1.3). Op de reeds beschreven wijze maakte ik hiervan platen. Dit bleek direct een groote verbetering. Na ongeveer 14 dagen was reeds alle ammoniak verdwenen en kon ik met den microscoop hierop talrijke koloniën van *Nitrosomonas* ontdekken. Op deze plaat waren duidelijk de koloniën te zien, zooals die zijn afgebeeld op plaat IV, fig. 5 van Bd. III van LAFAR, terwijl ik ook meende, de koloniën van fig. 3 en 4 te herkennen. Inmiddels had ik ook al eens kleine veranderingen in de samenstelling van mijn cultuurvloeistof gebracht, omdat ik er langzamerhand aan was gaan twifelen, of deze wel de juiste samenstelling had.

Behalve de reeds genoemde 26 koloniën, had ik wel meer koloniën overgeënt, waarvan het uiterlijk veel geleek op dat van *Nitrosomonas* en toch hadden tot nu toe slechts 3 koloniën genitriteerd. Bovendien had ik opgemerkt, dat men, wil men de nitriteerende bacteriën aanhouden, goed doet, niet te weinig materiaal over te enten. In over-

<sup>1)</sup> M. W. BEIJERINCK und A. VAN DELDEN, Centralbl. f. Bakt. II, 9, 3, 1902.



eenstemming hiermee waren mijn ervaringen met de verdunningsmethode.

Wanneer men een door ENGEL <sup>1)</sup> gemaakte berekening als juist aanneemt, dan zou men in een cultuur, waarin per cc 0.25 mg nitrietstikstof is gevormd, doordat de oorspronkelijke 1,2 mg ammoniumsulfaat zijn geoxydeerd, per cc  $1,2 \times 10^8$  bacteriën moeten vinden. Dat men met de verdunningsmethode dit getal niet zou vinden is natuurlijk, daar dan al deze bacteriën nog levend zouden moeten zijn. Het bleek mij echter, dat zelfs grootere verdunningen dan 1 : 20 niet meer nitriteerden, wat dus een belangrijk kleinere verdunning is dan men op grond van deze berekening zou mogen verwachten.

Een niet ideale cultuurvloeistof zou de oorzaak kunnen zijn van deze zeer slechte overeenstemming tusschen de berekende en de gevonden waarde. Kleine veranderingen in de toegevoegde hoeveelheden dikaliumphosfaat, keukenzout, magnesiumsulfaat en ferri-sulfaat hadden evenwel geen gunstigen invloed. Ook bij de vervanging van magnesiumcarbonaat door krijt kon ik geen verbetering vaststellen. Bij deze proeven had ik echter steeds met 1 cc uit een goed nitriteerend kolfje geënt, dus vrij zwaar. De mogelijkheid bestond daarom nog, dat bij toepassing van zwakkere entingen een meer optimale samenstelling van het cultuurmedium wel van essentieel belang zou zijn. Dit bracht mij er o.m. toe, de koloniën van de laatste kiezelzuurplaat niet alleen in kolfjes met magnesiumcarbonaat, maar ook in kolfjes met krijt te enten. 80 Koloniën werden in kolfjes met magnesiumcarbonaat geënt en 40 in kolfjes met krijt. Van deze 120 koloniën werden er 24 met het pincet overgeënt en de overige met de pipet. Onder de 24 harde koloniën — dat waren dus degene, die veel gelijkenis vertoonden met fig. 5, plaat IV Bd. III van LAFAR — waren er 5, die nitriteerden, terwijl van de 96 zachte koloniën geen enkele nitriteerde. Wat gunstiger was, magnesiumcarbonaat of krijt, was niet uit te maken met deze proef, daar van de 5 koloniën er drie in de kolfjes met magnesiumcarbonaat en twee in die met krijt nitriteerden. Verder bleek, dat geen enkele van deze koloniën rein was. Erger nog was het feit, dat ik de verkregen cultures niet kon aanhouden; na één overenting hield het nitriteeren op.

---

<sup>1)</sup> H. ENGEL, Arch. f. Mikrobiologie 1, 445, 1930.

Daar het mij tot nu toe nog geen enkele maal was gelukt, een reine kolonie van de plaat af te enten, besloot ik, een nitriteerend kolfje, waaraan kopersulfaat was toegevoegd, op een kiezelzuurplaat af te strijken, in de hoop, dat het van deze plaat zou gelukken, een reine kolonie te krijgen. Deze plaat nitriteerde goed; na 14 dagen was alle ammoniak verdwenen en zij gaf een zeer sterke nitriet-reactie. Onder den microscoop ontdekte ik echter geen enkele typische *Nitrosomonas*-kolonie. Wel waren er talrijke, zeer kleine lensvormige koloniën, welke veel op kristallen geleken en op Afb. 4 zijn weergegeven. Doordat zij zich gemakkelijk met een pipetje lieten doorprikken en de inhoud kon worden opgezogen, was het evenwel duidelijk, dat het geen kristallen waren. Omdat de koloniën van dit type zoo talrijk waren en er een krachtige nitritatie had plaats gehad, was er alle reden om aan te nemen, dat dit nitriteerende koloniën moesten zijn.

Van deze plaat werden met een pipetje 18 koloniën in kolfjes met magnesiumcarbonaat en 19 in kolfjes met krijt geënt. Ditmaal had ik iets meer succes. Van de 18 geënte kolfjes met magnesiumcarbonaat nitriteerden er 6 en bleken er na onderzoek op de bekende wijze zelfs

3 rein te zijn. Van de andere 19 nitriteerden er 4 en waren er 3 rein. Van eenige voorkeur voor magnesiumcarbonaat of krijt was dus ook hier geen sprake. Ook nu deed ik de ervaring op, dat de overentingen van nagenoeg al deze kolfjes niet meer wilden nitriteeren. Slechts van één kolfje met magnesiumcarbonaat, dat een reïncultuur bevatte, kreeg ik nitriteerende overentingen. Dit kolfje was genummerd 95. Door uit iedere dochtercultuur van No. 95 steeds meerdere overentingen te maken, kon ik dezen stam aanhouden. Hieruit bleek dus al heel duidelijk, dat er nog onbekende factoren waren, welke een groote rol spelen. In de eerste plaats leek het



Afb. 4.

*Nitrosomonas*

Zachte koloniën op kiezelzuurplaat. Apochr. N. A. 0,40; comp. oc.20× (Vergr. 480×).



er veel op, dat de aanwezigheid van enkele heterotrophe bacteriën van belang was voor de nitritatie, omdat ik met de overenting van de ruwcultures, sinds ik geen zuiver natriumchloride meer gebruikte, niet de minste moeite meer had. Welke rol deze heterotrophe micro-organismen hier precies moesten spelen, was niet duidelijk, maar het was natuurlijk denkbaar, dat zij ervoor zorgden, dat de voor de nitritatie schadelijke organische stoffen, die of al direct in het medium aanwezig waren, of voortdurend uit de atmosfeer in de vloeistof terecht kwamen, werden opgeruimd.

Een verdere mogelijkheid zou zijn, dat door de heterotrophe bacteriën bepaalde, voor de nitritatie noodzakelijke, organische stoffen werden gevormd. In het vorige hoofdstuk is toch vermeld, dat MAKRINOV tot de conclusie kwam, dat humusstoffen een gunstigen invloed hebben op de nitritatie. Ook werd melding gemaakt van het onderzoek van MURRAY, welke onderzoeker meende, dat voor de nitritatie bepaalde organische stoffen van vitamine-achtigen aard noodzakelijk zijn, al moet hieraan dadelijk worden toegevoegd, dat hij er niet in slaagde, de nitritatie met bepaalde organische stoffen te verbeteren.

Tot nu toe had ik alle nitrificatie-proeven geplaatst in een, met een gaskacheltje op 30° C. verwarmd, kamertje. Deze kachel had weliswaar een goeden afvoer, maar het leek niet uitgesloten, dat er door de verbranding van het gas toch nog bepaalde, voor de nitrificatie schadelijke, stoffen in de atmosfeer kwamen. Bovendien werden er in dit kamertje nog talrijke andere proeven verricht. Daarom besloot ik, eerst eens den invloed van de omgeving op de nitritatie te onderzoeken. Daartoe plaatste ik series van een negental kolfjes 1<sup>o</sup>. in een electricisch verwarmde thermostaat zonder andere cultures, 2<sup>o</sup>. in een electricisch verwarmde thermostaat, waarin o.a. veel proeven over alcoholische gisting plaats vonden en 3<sup>o</sup>. in het warme kamertje.

De kolfjes, welke een negatieve ammoniak-reactie gaven, kregen telkenmale opnieuw ammoniak. Uit Tabel I zien wij, dat na 7 dagen nog niet veel is te merken van een invloed van de atmosfeer in de thermostaat. Na 13 dagen wordt die al duidelijker merkbaar en na 18 dagen zijn de kolfjes uit de schoone thermostaat de andere reeds een eind voor. De remming is evenwel niet zoo groot, dat daaruit is te verklaren, waarom de reincultures zoo moeilijk zijn aan te houden, daar deze iedere week werden overgeënt. Wel vond

TABEL I.

*Invloed van de reinheid der atmosfeer op de nitritatiesnelheid.*

aant. dagen:	1 electrisch verwarmde thermostaat zonder andere proeven			2 electrisch verwarmde thermostaat met andere proeven			3 kamertje met gasver- warming		
	7	13	18	7	13	18	7	13	18
Kolfje Nr. 1	—	—	—	—	±	—	—	—	++
" " 2	—	—	—	—	—	++	—	—	++
" " 3	—	++	++	+++	++	+++	+	++	+++
" " 4	—	—	—	—	±	++	+	±	—
" " 5	—	—	—	—	+	—	—	+	++
" " 6	+++	—	++	+++	++	++	++++	++	+++
" " 7	+++	—	—	++	—	++	++++	—	+
" " 8	—	—	—	—	—	—	—	—	++
" " 9	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Het aantal + is een benaderende maat voor de hoeveelheid nog aanwezige ammoniak;  
— beteekent, dat alle ammoniak is verdwenen.

ik den nadeeligen invloed groot genoeg om in het vervolg maar alle nitrificatie-proeven in een schoone thermostaat te verrichten.

Vervolgens probeerde ik, of cultures, waarvan het nitritatie-vermogen duidelijk achteruitging, niet waren te verbeteren door deze te infecteeren met enkele heterotrophe micro-organismen, die uit ruwcultures waren geïsoleerd. Hiervan heb ik echter nooit een gunstigen invloed kunnen constateeren. Ten slotte probeerde ik ook nog, of er met toevoeging van wat tuingrondextract, tuingrondasch, gistautolysaat of „marmite” nog een verbetering was te verkrijgen. Het bleek evenwel, dat al deze toevoegingen slecht waren. Van het „marmite” werd slechts een druppel van een 0.1% oplossing aan 50 cc cultuurvloeistof toegevoegd en toch remde dit al sterk.

Alvorens deze proefnemingen tot verbetering van de cultuurvoorwaarden voort te zetten, leek mij van belang, na te gaan, of de gebruikte kiezelzuurplaten nog niet wat konden worden verbeterd. Om zoo snel mogelijk tot een reïncultuur te komen is het natuurlijk van belang, dat het percentage reine nitriteerende koloniën op een



plaat zoo groot mogelijk is. Nu was dit tot dusver slechts klein en ik meende dit te moeten toeschrijven aan het feit, dat de gebruikte kiezelzuurplaten in de entstrepen zoo lang water uitpersen. Dien-tengevolge zijn de bacteriën in de gelegenheid, zich in dit waterhuidje te ontwikkelen. Het gevolg is, dat, wanneer de plaat eindelijk droog is, de koloniën der nitriteerende bacteriën liggen op een vliesje van heterotrophe bacteriën. Ik had al eens een paar maal geprobeerd, deze vorming van een watervliesje te verhinderen door schaaltes met gedroogd natriumsulfaat onder in de petrischaal te plaatsen. Dit hielp wel iets, maar toch niet afdoende. Daar deze wateruitpersing steeds daar plaats heeft, waar het oppervlak van het kiezelzuur in aanraking is geweest met het glazen staafje, dat voor het afstrijken is gebruikt, leken mij kiezelzuurplaten, waarin de bacteriën zijn gesuspendeerd, een groote verbetering. Daar men voor deze platen gedialyseerd kiezelzuur noodig heeft, probeerde ik dit nog eens te maken. Behalve voor platen was dit kiezelzuur ook noodig om er steriele cultuurbuizen van te maken, omdat pogingen om de cultures aan te houden op stukjes gesteriliseerd gips met magnesiumcarbonaat geen succes hadden.

Het gebruikte waterglas was afkomstig van MERCK. Ook nu dialyseerde ik het kiezelzuur eerst met leidingwater, maar met hetzelfde gevolg als vroeger, nl. dat dit of te vroegetijdig of in het geheel niet stonde. Daarop werd geprobeerd, het kiezelzuur te dialyseren met gedestilleerd water. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een z.g.n. „Schnelldialysator” van de Annawerke, waarbij de dialysehulzen door een roerwerk voortdurend in beweging worden gehouden. Het water stroomde niet continu door het apparaat, maar werd zes maal ververscht, waarna met zilvernitraat geen Cl-ionen meer waren aan te toonen. Het kiezelzuur, dat aldus werd verkregen, stonde wel na toevoeging van de andere zouten, maar de plaat bleef veel te slap. Daarna probeerde ik, het kiezelzuur in te dampen, wat inderdaad gelukte. De platen, welke met het ingedampte kiezelzuur werden verkregen, bleken voldoende vastheid te hebben. Na eenig probeeren werd het volgende recept uitgewerkt, dat nog steeds uitstekend voldoet. 25 cc geconcentreerd waterglas en 75 cc water giet men in 54 cc geconcentreerd zoutzuur, verdund met 46 cc water. Het mengsel wordt nu met gedestilleerd water gedialyseerd tot men met zilvernitraat geen troebeling meer krijgt. De hoeveelheid kiezelzuuroplossing, welke men krijgt, is afhankelijk van het niveauverschil tusschen



de kiezelzuuroplossing in de perkamenthulzen en het gedestilleerde water daarbuiten. Wil men voor *Nitrosomonas* platen maken met magnesiumcarbonaat en ammoniumsulfaat, dan moet men, wanneer men na dialyseeren meer heeft dan 250 cc kiezelzuuroplossing, deze indampen tot 250 cc en in het tegenovergestelde geval met gedestilleerd water tot dit volume verdunnen. Voor platen, voor *Nitrobacter* bestemd, moet het dialysaat tot 200 cc worden ingedampt of verdund. Behalve de gebruikelijke voedingszouten moet men voor *Nitrobacter*-platen ook magnesiumcarbonaat toevoegen, daar de plaat anders niet vast wordt. De tot dusver genoemde kiezelzuuroplossingen blijven dan zoowel in ongesteerdsteriliseerden toestand als na sterilisatie in een autoclaaf een jaar of langer bruikbaar.

Voor platen met calciumcarbonaat en ammoniumsulfaat voor *Nitrosomonas* moet men tot 160 cc indampen. Dit indampen doet men echter beter in vacuum. Deze laatste kiezelzuuroplossing moet men evenwel na het steriliseeren direct gebruiken, daar zij na 24 uur is gestold.

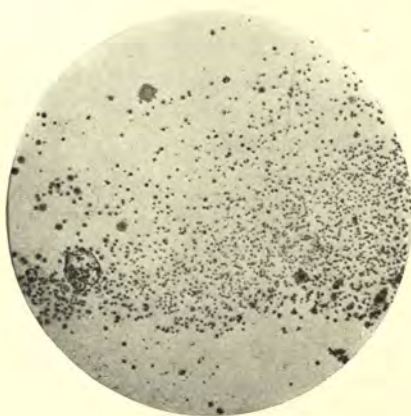
Van de toe te voegen zouten maakt men een oplossing, welke 10 maal zoo geconcentreerd is als de cultuurvloeistof, zoodat men, om een plaat te maken van 50 cc kiezelzuur, hieraan 5 cc van deze oplossing moet toevoegen. Het ammoniumsulfaat, waarvan men dus 1 cc per plaat moet toevoegen, laat men in een 5% oplossing apart steriliseeren. Deze platen voldeden zeer goed. Op de, op deze manier verkregen, kiezelzuurplaten groeiden de nitriteerende bacteriën veel beter dan op de volgens het eerste recept gemaakte. Men krijgt hierop dikwijls koloniën, welke men met het bloote oog kan onderscheiden. Afb. 5 is een met zwakke vergrooing gefotografeerd stuk kiezelzuur, waarop één der hieronder te vermelden reïncultures was afgestreken.

In een dergelijke kiezelzuurplaat werd een goed nitriteerende overenting van de reïncultuur No. 95 gesuspenderd. Na 10 dagen was alle ammoniak tot nitriet geoxydeerd. Het microscopisch beeld van deze plaat is weergegeven in Afb. 6.

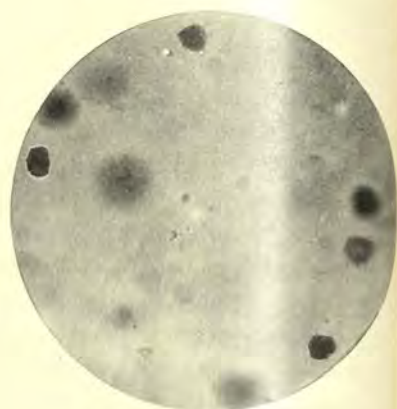
Nu kwam het er nog op aan, om ook voor de vloeistofcultures een beter medium te vinden. Gezien de ervaring, welke ik met het gebruik van ruw zout had opgedaan, leek het denkbaar, dat voor een goede ontwikkeling der nitriteerende bacteriën nog andere elementen in kleine hoeveelheden noodig zouden zijn. Daarom besloot ik het tot dusver gebruikte gedestilleerde water eens door



leidingwater te vervangen. Een 130-tal van de verkregen koloniën werd om deze reden met pipetjes geënt in kolfjes met



Afb. 5.  
*Nitrosomonas*  
Koloniën op kiezelzuurplaat.  
Zeiss Planar F. 10 (Vergr. 4 ×).



Afb. 6.  
*Nitrosomonas*  
Koloniën in kiezelzuurplaat.  
Apochr. N. A. 0.40; oc. 5 × (Vergr. 125 ×).

het gebruikelijke voedingsmedium, dat op de volgende wijze werd gevarieerd: 1<sup>o</sup>. leidingwater +  $MgCO_3$  + 0,1%  $CaCO_3$ ; 2<sup>o</sup>. leidingwater +  $MgCO_3$ ; 3<sup>o</sup>. gedestilleerd water +  $CaCO_3$  en 4<sup>o</sup>. gedestilleerd water +  $MgCO_3$ , een en ander in de hoop, eindelijk een gunstig cultuurmedium te vinden. In de kolfjes werd na 8 dagen op nitriet gereageerd. Het resultaat vindt men in Tabel II.

Hoewel de verkregen uitkomsten grillig zijn, blijkt toch wel, dat de reïncultures beter nitriteeren, wanneer men in plaats van gedestilleerd water leidingwater geeft.

In het vervolg heb ik dan ook steeds leidingwater gebruikt, hetgeen inderdaad een groote verbetering is gebleken; de verkregen reïncultures lieten zich hierin zonder bezwaar aanhouden. Op de verklaring van de gunstige werking van het leidingwater zal in de hoofdstukken IV en V nader worden ingegaan.

Hiermede was dus de laatste moeilijkheid overwonnen en moest het nu mogelijk zijn, zonder veel moeite in betrekkelijk korten tijd uit tuingrond een reïncultuur van *Nitrosomonas* te krijgen. Hiertoe werden Erlenmeyers van 300 cc met 50 cc cultuurvloeistof met

TABEL II.

*Resultaat van de overenting van 130 Nitrosomonas-koloniën in uiteenlopend samengestelde cultuurmedia.*

Voor de bereiding van het standaardmedium werd gebruikt:												
Leidingwater + MgCO <sub>3</sub> + 0,1% CaCO <sub>3</sub>					leidingwater + MgCO <sub>3</sub>				gedest. water + CaCO <sub>3</sub>		gedest. water + MgCO <sub>3</sub>	
1+++	11—	21—	31—	41—	51++	61+++	71+++	81—	91—	101—	111+++	121—
2+++	12—	22+++	32—	42+++	52—	62+++	72++	82+++	92—	102—	112—	122—
3+	13—	23+	33+++	43—	53—	63—	73+++	83+	93+	103±	113—	123—
4+	14—	24+	34—	44—	54++	64++	74+	84+++	94—	104—	114—	124—
5—	15—	25+	35—	45—	55—	65—	75+++	85+++	95+++	105—	115+	125+
6—	16—	26+	36+++	46—	56+	66+++	76+++	86+++	96—	106+	116—	126—
7—	17—	27—	37—	47—	57—	67—	77+++	87+++	97—	107+	117—	127—
8—	18—	28+++	38—	48—	58+++	68—	78+++	88+++	98—	108—	118—	128—
9—	19—	29—	39+	49—	59±	69—	79+++	89+++	99+++	109—	119—	129—
10—	20—	30—	40—	50—	60+++	70+++	80+++	90+++	100+++	110—	120—	130—

Het aantal + geeft een benaderende maat voor de hoeveelheid gevormd nitriet; — beteekent, dat er geen nitriet is gevormd.



verschillende hoeveelheden tuingrond geënt. Voor de enting werd grond uit den laboratoriumtuin en een zandigen, leemachtigen cultuurgrond uit België gebruikt. Van beide grondsoorten was 0,2 gr voldoende om na 8 dagen al een flinke nitrietreactie te verkrijgen. Dezelfde grondsoorten werden ook nog eens geënt in kolfjes met het ruwe magnesiumcarbonaat, maar ook nu trad zelfs in kolfjes, geënt met 1 gr grond, geen nitritatie op.

De nitriteerende cultures werden overgeënt en tevens afgestreaken op peptonagar. De platen van beide grondmonsters waren vrijwel hetzelfde. Naast de koloniën van *Bac. mycoïdes* bestond de hoofdmassa uit bijna kleurlooze, doorschijnende koloniën van ongeveer 3 mm doorsnede. Bij het microscopisch onderzoek bleken de bacteriën uit deze koloniën zwak gekromde staafjes met een polaire cilie te zijn. Daarnaast waren nog enkele andere kleine koloniën aanwezig. Toen de overenting na 7 dagen, nadat de ammoniak was geoxydeerd, op peptonagar werden afgestreaken, bleek, dat *Bac. mycoïdes* niet meer op de plaat voorkwam, maar dat de andere koloniën nog even talrijk waren als tevoren.

Van deze door overenting verkregen cultures werd  $\frac{1}{4}$  cc gesuspendeerd in kiezelzuurplaten. Na 8 dagen was alle ammoniak geoxydeerd en werden de koloniën overgeënt in Erlenmeyers van 50 cc met 10 cc cultuurvloeistof. Wanneer men in zulke kleine kolfjes cultiveert, dan is het wenschelijk, dat men na 7 of 10 dagen opnieuw 0,1% ammoniumsulfaat toevoegt, omdat de ammoniak hieruit tengevolge van de alkaliteit vrij snel verdwijnt. De koloniën in deze platen waren te hard om met het pipetje te worden overgeënt, dus werd hiervoor het pincet gebruikt. Na 14 dagen werd in alle kolfjes op nitriet gereageerd.

Van de plaat met de nitriteerende koloniën uit den Belgischen grond werden er 30 afgeënt; hiervan werden 20 nitriteerende cultures verkregen, waarvan er na afstrijken op peptonagar 11 rein bleken te zijn.

Van de plaat, waarin de uit den tuingrond afkomstige ophooping was gesuspendeerd, werden 10 koloniën overgeënt; hiervan nitriteerden er 9 en waren er 2 rein.

Uit beide grondsoorten had ik dus binnen een maand tijds de nitriteerende bacteriën in reincultuur.

Terloops zij nog opgemerkt, dat van de plaat met tuingrond met het pipetje ook nog 12 niet op het gebruikelijke type gelijkende

koloniën werden afgeënt. Hiervan nitriteerden er 2, maar deze bleken niet rein te zijn.

Op dezelfde manier werden uit 3 verschillende grondmonsters uit de provincie Groningen de nitriteerende bacteriën in reïncultuur gebracht. Van één van de platen van één der grondsoorten werden met het pipetje nog eens 40 koloniën afgeënt. Hiervan nitriteerden er 30, waarvan er 29 rein bleken te zijn. Van de beide andere grondsoorten werden evenveel koloniën geïsoleerd, waarvan een even groot percentage nitriteerde. Het aantal reine koloniën was echter niet zoo gunstig. In het eene geval waren het er slechts 7 en in het andere 19. Van deze laatste plaat waren 24 harde koloniën met het pincet afgeënt. Het percentage reine koloniën was even groot, of het pincet of de pipet werd gebruikt.

Uit deze proeven blijkt dus, dat, nadat de in den aanvang ondervonden moeilijkheden eenmaal waren overwonnen, het isoleren van *Nitrosomonas* uit cultuurgronden zeer bevredigend verloopt. In het algemeen krijgt men, wanneer men in het kiezelzuur suspendeert, minder harde koloniën dan wanneer men afstrijkt. Ook is het aantal koloniën, dat zich ontwikkelt, veel grooter. Het eenige nadeel van deze methode is, dat men de kans heeft, te weinig of te veel cellen te suspendeeren. Het is wenschelijk, dat men de platen vrij sterk ent, opdat er zich tamelijk veel koloniën aan de oppervlakte van de plaat ontwikkelen. De koloniën, welke wat diep in het kiezelzuur liggen, zijn toch moeilijk te isoleren;  $\frac{1}{4}$  cc van een cultuurvloeistof, waaruit juist alle ammoniak is verdwenen, is als regel een goede hoeveelheid om mee te enten.

Behalve op deze manier, werd ook nog eens geprobeerd, met de negatieve-plaat-methode reïncultures te krijgen. Indien deze methode practisch bruikbaar bleek, zou zij het voordeel hebben, dat men geen kiezelzuuroplossing hoeft te maken, terwijl zij bovendien zonder micromanipulator is te gebruiken. De nitriteerende cultures werden op een gewone peptonagarplaat afgestroken. Na een dag of 4 cultiveeren bij  $28^{\circ}$  C. werden met een platina-spateltje steriel gebleven stukjes agar voorzichtig tusschen de koloniën weggesneden en daarna gebracht in Erlenmeyers met cultuurvloeistof. In één geval werden 8 stukjes uitgesneden, waarvan er na vrij langen tijd 5 nitriteerden, maar slechts één van de kolfjes bleek rein te zijn. Een anderen keer werden 21 stukjes agar uit verschillende platen genomen. Na verloop van tijd nitriteerden 6 kolfjes, maar slechts één was rein.



Men moet er op rekenen, dat het vrij lang duurt, eer de geënte kolfjes nitriteeren; na 2 weken merkt men in den regel van nitritatie nog niets. Vóór men begint met het uitsnijden der stukjes agar, moet men even met het microscoop controleeren, of er hier of daar toch niet een heel kleine kolonie ligt. Men moet de te gebruiken pepton-agarplaat ook wel een dag of 4 bebroeden om ook langzaam groeiende heterotrophe organismen in staat te stellen, koloniën te vormen. Te lang cultiveeren van deze platen is anderzijds ook weer niet wenschelijk, omdat dan de nitriteerende bacteriën te lang worden blootgesteld aan den schadelijken invloed van de organische stof.

Alle in het voorafgaande beschreven waarnemingen pleiten nu wel zeer sterk voor de juistheid van de opvatting van WINOGRADSKY, dat nitriteerend vermogen alleen wordt aangetroffen bij autotrophe bacteriën. Tevens deden de opgedane ervaringen mij begrijpen, hoe vroegere onderzoekers ten onrechte tot het bestaan van heterotrophe nitrificerende bacteriën hadden besloten; de in Hoofdstuk I uitgeoefende critiek is dan ook mede op deze ervaringen gebaseerd.

#### § 4. OPHOOPING EN ISOLATIE VAN *NITROBACTER*.

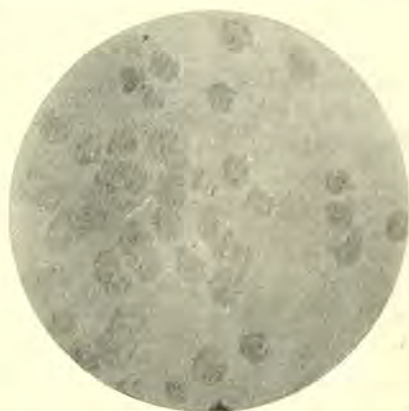
Het in reïncultuur brengen van *Nitrobacter* kostte heel wat minder moeite dan dat van *Nitrosomonas*. De voor de ophooping gebezigde cultuurvloeistof had de volgende, door WINOGRADSKY aangegeven, samenstelling:

Natriumnitriet . . . . .	1 gr.
Dikaliumposphaat . . . . .	0,5 gr.
Magnesiumsulfaat . . . . .	0,3 gr.
Natriumcarbonaat (watervrij) . . . . .	1 gr.
Natriumchloride . . . . .	0,5 gr.
Ferrosulfaat . . . . .	0,4 gr.
Water . . . . .	1 L.

Erlenmeyers van 300 cc met 50 cc van de hierboven genoemde cultuurvloeistof werden met tuingrond geënt. Na 14 dagen was alle nitriet tot nitraat geoxydeerd. De overentingen gaven ook niet de minste moeite; het nitriet bleek doorgaans reeds na 6 à 7 dagen te zijn verdwenen. Na eenige overentingen werd uit deze kolfjes op kiezelzuurplaten afgestroken. In tegenstelling met de nitritatie verliep de nitratie op deze platen al dadelijk zeer vlot. Gewoonlijk

was na 14 dagen het nitriet geoxydeerd. Onder den microscoop vond ik op deze platen tallooze kleine koloniën. Zie Afb. 7.

Deze koloniën waren uiterst klein en zeer doorschijnend, zoodat zij bij recht doorvallend licht nauwlijks zichtbaar waren. Bij scheeve belichting waren zij veel duidelijker te zien. De koloniën waren zeer zacht en konden daardoor gemakkelijk in micro-pipetjes worden opgezogen. In bijna alle kolfjes, welke met deze koloniën waren geënt, trad nitratie op. Het was echter weer teleurstellend, dat na afstrijken op pepton-agarplaten bleek, dat geen enkele van deze cultures rein was. Ook hier ziet men dus weer, dat het kiezelzuropervlak zich niet zoo goed leent voor het maken van rein-cultures. Ik trachtte hierin ver-



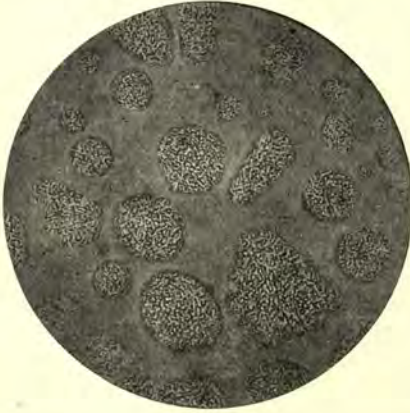
Afb. 7.  
*Nitrobacter*  
Koloniën op kiezelzuurplaat.  
Apochr. N.A. 0.40; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 480 ×).

betering te brengen door toepassing van de methode van PROUTY (l.c.). Deze onderzoeker voegde aan goed nitrateerende cultures oplossingen van verschillende kleurstoffen toe in de hoop, dat deze vergiftiger zouden zijn voor de begeleidende heterotrophe organismen dan voor *Nitrobacter*. De kleurstoffen liet PROUTY van een minuut tot een half uur op de cultures inwerken en daarna entte hij over. Met rosaniline gelukte het hem, *Nitrobacter* in rein-cultuur te brengen. Hoewel ik het rosaniline in verschillende concentraties gebruikte en de tijden varieerde van een minuut tot een half uur, kreeg ik geen betere uitkomsten dan te voren.

Ik besloot hierop, het eens met nitrietagarplaten te probeeren. Zoowel WINOGRADSKY als BEIJERINCK rapporteeren over dit medium gunstig. Inderdaad bleek, dat *Nitrobacter* op deze platen goed groeide. Na 2 à 3 weken cultiveeren was uit deze platen het nitriet verdwenen. Op de platen vond ik onder den microscoop o.a. de koloniën van Afb. 8. Zooals men ziet, zijn deze koloniën belangrijk grooter dan die van Afb. 7. Door deze koloniën over te enten in kolfjes met



nitrietoplossing, bleek, dat het inderdaad koloniën van *Nitrobacter* waren. Van de 34 overgeënte koloniën nitrateerden er 22 en hiervan



Afb. 8.  
*Nitrobacter*  
Koloniën op agarplaat.  
Apochr. N.A. 0.40; comp. oc. 12 ×  
(Vergr. 225 ×).

bleek de helft rein. Wat de onreine cultures betreft moge worden opgemerkt, dat in vele gevallen mijn aandacht werd getrokken door het daarin voorkomen van eigenaardige, draadvormig uitgegroeide bacteriën. Het was een nader onderzoek van deze cultures, dat leidde tot de isolatie van *Hyphomicrobium vulgare*, waarop in Hoofdstuk VI wordt teruggekomen.

Het bleek ook mogelijk, van kiezelzuurplaten reine koloniën van *Nitrobacter* te krijgen, indien men maar de voorzorg nam, schaaltes met watervrij natriumsulfaat in de doozen te plaatsen, waardoor de platen

snel opdrogen. Men moet met dit drogen voorzichtig zijn, daar anders de plaat te droog wordt en dan groeit *Nitrobacter* niet meer. Moeilijkheden werden bij het aanhouden van *Nitrobacter* in vloeistofcultures niet ondervonden.

Nog zij opgemerkt, dat de ophooping der nitrateerende bacteriën ook heel goed bleek te verlopen in een medium, waaraan in plaats van natriumcarbonaat wat calciumcarbonaat was toegevoegd en waarin de pH 8,0 was.

In aansluiting op deze waarneming mogen hier eenige opmerkingen worden ingelascht in verband met het feit, dat in de natuur nitriet slechts zelden als tusschentrap bij de nitrificatie wordt aangetroffen.

In overeenstemming met hetgeen LÖHNIS<sup>1)</sup>, MEYERHOF<sup>2)</sup> en GERRETSEN<sup>3)</sup> mededeelen, bleek ook mij namelijk, dat in laatstgenoemd medium de nitratatie door ammoniak veel zwakker wordt geremd dan in het meer alkalische medium met soda. Wanneer ik

<sup>1)</sup> F. LÖHNIS, Centralbl. f. Bakt. II, 13, 706, 1904.

<sup>2)</sup> O. MEYERHOF, Pflüger's Archiv, 165, 229, 1916.

<sup>3)</sup> F. C. GERRETSEN, Meded. Rijkslandb. Proefst. Groningen, p. 21, 1924.

kolfjes met het voor *Nitrosomonas* gebruikelijke medium, waarin evenwel het magnesiumcarbonaat door calciumcarbonaat was vervangen, entte met *Nitrosomonas* en *Nitrobacter*, dan had er dikwijls nitrificatie plaats, zonder dat als tusschentrap nitriet werd gevonden. In het medium met soda daarentegen moet bijna alle ammoniak geoxydeerd zijn, voordat de nitratie begint. Dat de nitrificatie in kolfjes met calciumcarbonaat plaats heeft, zonder dat er nitriet in het medium is aan te toonen, is niet alleen toe te schrijven aan het feit, dat de nitratie door ammoniak bij de lagere pH zooveel minder sterk wordt geremd. Uit het onderzoek van MEYERHOF blijkt namelijk, dat de nitratiesnelheid beneden pH 8.4 veel sterker afneemt dan de nitratiesnelheid, hetgeen ik kon bevestigen.

Dat men in het laboratorium in het algemeen als tusschentrap bij de nitrificatie het nitriet vindt en in de natuur niet, is dus te wijten aan de abnormaal hoge pH van het gebruikelijke medium met magnesiumcarbonaat. Dit standpunt wordt evenwel door WINOGRADSKY <sup>1)</sup> bestreden, zooals blijkt uit hetgeen hij naar aanleiding van wat LÖHNIS over deze kwestie heeft geschreven, opmerkt: „On connaît — on connaissait déjà à cette époque — les raisons de la nitratisation directe dans le sol, dont la principale est celle que le milieu est déjà peuplé par les microbes spécifiques, car c'est principalement le développement du microbe nitrique et non le processus d'oxydation exercé par les cellules adultes, qui est si sensible aux ions  $\text{NH}_3$ ”. Het laatste gedeelte van deze uitspraak is evenwel niet in overeenstemming met de proefnemingen van MEYERHOF, die aantoonde, dat de ademhaling van *Nitrobacter* minstens even gevoelig is voor ammoniak als de groei van dit organisme. Er bestaat dan ook mijns inziens alle aanleiding om de door LÖHNIS verdedigde zienswijze te handhaven.

---

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur, 50, 363, 1933.



## HOOFDSTUK III.

### EENIGE OPMERKINGEN OVER DE VERSCHILLENDE SOORTEN DER NITRIFICEERENDE BACTERIËN EN HARE MORPHOLOGIE.

#### § 1. DE NITRITEERENDE BACTERIËN.

In het voorafgaande hoofdstuk heb ik gemeend, de door mij geïsoleerde nitriteerende organismen eenvoudigheidshalve als *Nitrosomonas* te mogen aanduiden. Hiermede heb ik de gewoonte gevolgd van nagenoeg alle vroegere onderzoekers, die zich met de studie van den verwekker van dit deel van het nitrificatieproces hebben beziggehouden. Een rechtvaardiging van deze minder correcte handelwijze is tot op zekere hoogte gelegen in het feit, dat de verschillenkenmerken tusschen de beide, door WINOGRADSKY opgestelde soorten, *Nitrosomonas europaea* en *Nitrosomonas javanensis*, van zeer ondergeschikten aard zijn <sup>1)</sup>.

Ernstiger bedenkingen tegen het zonder nadere motiveering gebruiken van de aanduiding *Nitrosomonas* zouden echter kunnen worden gebaseerd op de uitkomsten van de in hoofdstuk I reeds vermelde recente publicatie van WINOGRADSKY <sup>2)</sup>. In deze publicatie, evenals in een daaraan voorafgaande, door ROMELL <sup>3)</sup> grootendeels in WINOGRADSKY's laboratorium bewerkte, studie, wordt toch besloten tot het bestaan van een drietal uiteenlopende groepen van autotrophe nitriteerende bacteriën. Aan deze drie groepen kent WINOGRADSKY de beteekenis toe van geslachten en hij besluit dan ook, dat alle tot nu toe bekende nitriteerende bacteriën moeten worden ondergebracht in één der drie door hem opgestelde geslachten: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis* en *Nitrosospira*.

Wat nu de door mij geïsoleerde nitriteerende stammen betreft,

---

<sup>1)</sup> Dit geldt ook ten opzichte van de derde, door BUCHANAN op grond van WINOGRADSKY's waarnemingen opgestelde, nitrificeerende soort *Nitrosococcus americanus* en van de door NELSON opgestelde twijfelachtige soort *Nitrosomonas monocella*. Vergelijk voor een en ander: D. H. NELSON, Zentralbl. f. Bakt. II 83, 280, 1931.

<sup>2)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 50, 350, 1933.

<sup>3)</sup> L. G. ROMELL, Svensk Botanisk Tidskrift 26, 303, 1932.

laat zich één punt dadelijk met zekerheid vaststellen, namelijk, dat zij niet behooren tot het geslacht *Nitrospira*. Immers, de vertegenwoordigers van dit geslacht zijn gekenmerkt door het optreden van „formes spiralées”. Verder zijn zij aangepast aan een leven in neutrale media, terwijl in de door mij gebruikte, meer alkalische media geen ontwikkeling mogelijk is.

Minder gemakkelijk te beantwoorden is de vraag, in hoeverre de door mij als *Nitrosomonas* aangeduide stammen door WINOGRADSKY niet tot het geslacht *Nitrosocystis* zouden worden gebracht.

Hiertoe is het noodzakelijk, een scherp inzicht te verkrijgen in de overwegingen, welke WINOGRADSKY en in aansluiting op dezen ook ROMELL, tot het bestaan van een afzonderlijk geslacht *Nitrosocystis* hebben doen besluiten.

Wanneer men dan in dit verband de reeds geciteerde, recente publicatie van WINOGRADSKY bestudeert, dan vindt men als kenmerk voor dit nieuwe geslacht opgegeven, dat de groeiwijze in hoofdzaak is beperkt tot cysten of zoëgloea van coccusvormige bacteriën. Slechts zeer zelden komen afzonderlijke cel-individuën voor, ten hoogste komen uit de gelatineuze kapsels somtijds diplococcen of tetraden vrij. Deze eigenschappen blijven ook bij overenting van de koloniën op nieuwe kiezelzuurplaten behouden.

WINOGRADSKY heeft nu gemeend, de door hem bestudeerde stammen, welke deze eigenschappen bezitten, scherp te moeten afscheiden van een tweede categorie, waarvoor hij den ouden geslachtsnaam *Nitrosomonas* reserveert. De kenmerken van de vertegenwoordigers van dit geslacht zijn in hoofdzaak de volgende. In de cultures komen overwegend losse cellen, coccusvormen of korte staafjes met afgeronde einden voor. Ten hoogste blijven zij tot diplococcen, of een enkele maal tot korte streptococcen vereenigd. Sporadisch treden beweeglijke vormen op met één eindstandige cilie. Soms vormen de cellen dichte massa's, maar dit zijn geen zoëgloea in den eigenlijken zin des woords, d.w.z., de cellen zijn niet door een slijmachtige substantie samengekit en ook niet door een gemeenschappelijk kapsel omgeven.

De in het hierbovenstaande gegeven onderscheiding lijkt op het eerste gezicht aannemelijk, al blijft het reeds dadelijk de vraag, of de aangegeven verschillen voldoende belangrijk zijn om daarop een differentiatie in twee geslachten te baseeren. Het zal echter duidelijk zijn, dat de gegeven onderscheiding alleen dan zin heeft,



indien vaststaat, dat voor één en denzelfden stam de aangegeven morphologische kenmerken voldoende constant zijn.

Juist in dit opzicht is er nu reeds op grond van WINOGRADSKY's vroegere waarnemingen reden tot gerechten twijfel. In dit verband moet er namelijk op worden gewezen, dat WINOGRADSKY in zijn klassieke, in 1892 verschenen, verhandeling over de morphologie der nitrietvormende bacteriën uitvoerig melding maakt van het feit, dat hij in cultures, verkregen door enting met grondmonsters, afkomstig van Zürich en van Java, nitriteerende organismen verkreeg, welke op kiezelzuurplaten harde koloniën vormden. Deze harde koloniën, z.g.n. „colonies sombres”, bleken te bestaan uit compacte zoëgloea, waarin de afzonderlijke cellen slechts met moeite waren terug te vinden. Verder nam WINOGRADSKY waar, dat deze „colonies sombres”, welke zich in verband met haar hardheid niet lieten overenten, na eenigen tijd veelal spontaan in „colonies claires” overgingen en dat in daarmede geënte vloeistofcultures na eenigen tijd de beweeglijke monadenvorm werd aangetroffen. In de geheele verhandeling van 1892 wordt dan ook het standpunt ingenomen, dat de zoëgloevorm en de monadenvorm slechts uiteenlopende stadia zijn in de groeiwijze van éénzelfde organisme. Duidelijk komt dit o.m. tot uiting in de volgende uitspraak:

„En effet, à ce temps quand je comparais les deux microbes, celui de Zürich ne donnait dans ces cultures liquides rien que des zoëglées d'une grandeur et d'une compacité extraordinaires; sur le milieu solide, il n'y avait que des colonies brunes, qui ne s'entouraient même pas de masses claires. Dans les cultures du microbe de Gennevilliers, par contre, le trouble ne cessait pas et le liquide pullulait de monades mobiles; sur la silice, il n'y avait que des colonies incolores et à faibles contours, composées de cellules non cimentées et très souvent capables de mouvement.

*Il est inutile de répéter que ces différences ne peuvent pas servir à distinguer les espèces. Elles sont inconstantes et la même espèce les présente par périodes.”*<sup>1)</sup>

Wij moeten dus hier de vraag onder de oogen zien, welke overwegingen WINOGRADSKY ertoe hebben gebracht, in zijn verhandeling van 1933 een zoo gansch ander standpunt in te nemen.

Onder meer meent WINOGRADSKY, dat de hierboven aangehaalde

<sup>1)</sup> l.c., p. 101. Cursiveering van mij (K. B.).



uitspraak het gevolg is geweest van de min of meer gebrekkige techniek, waarover hij destijds beschikte. WINOGRADSKY schrijft nl.:

„Il a été impossible avec les moyens qu'on possédait alors de séparer les formes libres des formes zoögléiques, l'identité de la fonction ne permettant pas une sélection par le milieu dans ce cas. En tentant de le faire au moyen des plaques silico-gel, on ne récoltait toujours que des monades („colonies claires", du mémoire de 1892) ou rien du tout, ceci parce que les zoöglées ou kystes („colonies sombres"), trop compactes, ne se laissaient pas repiquer." 1)

Blijkbaar moeten wij uit deze passage niet alleen besluiten, dat WINOGRADSKY's uitvoerige beschrijvingen omtrent den door hem gerapporteerden, in werkelijkheid evenwel slechts schijnbaren, overgang van den zoögløeavorm in den monadenvorm alle zijn verricht aan mengcultures van *Nitrosocystis* en *Nitrosomonas*, maar ook, dat hij in de door hem destijds verkregen reincultures nimmer meer zoögløea heeft waargenomen. Het is zeker te betreuren, dat WINOGRADSKY in 1892 heeft nagelaten, dit feit, dat toch moeilijk aan een voortreffelijk waarnemer, als deze onderzoeker is, kan zijn ontgaan, uitdrukkelijk op te merken; integendeel zal de lezer uit zijn beschrijvingen den indruk krijgen, dat de bedoelde overgang ook aan de reincultures is geconstateerd. Dit te meer, daar hij voor zijn stam uit grond van Zürich uitdrukkelijk vermeldt, dat het plotseling optreden van den monadenvorm is gekoppeld aan het verdwijnen der tevoren in de cultuur aanwezige zoögløea. In het handboek van LAFAR (Bd. III, pag. 153) beschrijft WINOGRADSKY zelfs zeer uitvoerig, hoe hij het uitzwermen en oplossen van zoögløea in hangende druppels prachtig heeft kunnen waarnemen.

In verband met het hierboven vermelde doet het verder wel zeer bevreemdend aan, dat WINOGRADSKY zijn meening, dat de enkele losse cellen van *Nitrosocystis* ook wel eens een beweeglijk stadium kunnen doormaken, op de volgende overweging grondt: „La motilité paraît probable; on l'a anciennement observée en réalité chez une forme provenant d'une terre de Java et qui était sans aucun doute un *Nitrosocystis* (voir le mémoire de 1892, photogrammes 9, 10, 11, 12; ou Lafar's Handbuch, planche V figures 1 en 2).

Immers, het is niet te begrijpen, hoe WINOGRADSKY, die, zooals wij boven zagen, zelf betoogt, dat het hem in 1892 onmogelijk was,

1) l.c., p. 392.



*Nitrosocystis* rein te cultiveeren, nu opeens voor den stam uit Java allen twijfel aan de reinheid van dien stam verwerpt.

De eigenlijke overwegingen, welke WINOGRADSKY ertoe hebben gebracht, het oude standpunt te verlaten, ontleent hij aan het resultaat van zijn jongste onderzoekingen.

Om tot een goed begrip van deze situatie te komen is het noodzakelijk, op te merken, dat WINOGRADSKY in zijn latere onderzoekingen over bodemmicrobiologie van een sterken afkeer van alle rein-cultures doet blijken. Al zijn desbetreffende waarnemingen zijn dan ook verricht aan ruwcultures, welke werden verkregen door rechtstreeks op selectieve vaste voedingsmedia, in dit geval op kiezelzuurplaten, welke naast ammoniumsulfaat en eenige andere anorganische zouten ook fijn verdeeld krijt bevatten, korreltjes grond te strooien. Hij vindt dan, dat op dergelijke platen plaatselijke ophelderingen optreden, doordat het krijt oplost ten gevolge van de zuurvorming, waarmede de nitritatie gepaard gaat. Al naar gelang van de gebruikte grondsoort ontwikkelen zich nu op de ophelderende plekken der platen hetzij zachte, min of meer doorschijnende koloniën met vrij vage omtrekken, hetzij harde, compacte koloniën met typische zoëgloea-vorming. Doordat deze koloniën zich met behoud van hare karakteristieke eigenschappen op nieuwe platen laten overenten, concludeert WINOGRADSKY tot het bestaan van onderling verschillende nitriteerende organismen, welke dan respectievelijk in de beide genoemde geslachten worden ingedeeld.

Voor de beoordeeling van deze situatie is het gewenscht, te accentueeren, dat WINOGRADSKY zijn waarnemingen dus volkomen bewust aan niet-reine cultures verricht en dat deze waarnemingen geheel beperkt blijven tot cultures onder zeer bepaalde, min of meer volledig uniforme, voorwaarden.

Men zou nu inderdaad geneigd zijn, dit als een afdoend argument voor de verscheidenheid van de twee genoemde typen van nitriteerende organismen te beschouwen, ware het niet, dat WINOGRADSKY, zooals wij hierboven zagen, zelf in 1892 zoo had geaccentueerd, dat de beschreven morphologische verschillen ook bij éénzelfden stam optreden. Het treft dan ook bijzonder, dat in de recente publicatie iedere poging achterwege blijft om na te gaan, of door het blootstellen van één bepaalden stam aan uiteenlopende cultuurvoorwaarden niet eveneens veranderingen in de morphologie van dien stam optreden.



Het schijnt mij toe, dat WINOGRADSKY zich hiervan heeft onthouden, geleid door een te ver gedreven afkeer van het gebruik van reïncultures. Hoezeer ik ook bereid ben, ten volle WINOGRADSKY's standpunt te onderschrijven, dat het eenzijdig toepassen van ophoopingsproeven in vloeibare media met het daarop aansluitend aanleggen van reïncultures niet geschikt is om tal van vitale problemen der bodemmicrobiologie tot oplossing te brengen, dit neemt niet weg, dat voor de beantwoording van vragen aangaande de al of niet-identiteit van twee microbenstammen, respectievelijk van het al of niet door specifieke eigenschappen bepaald zijn van twee uiteenlopende verschijningsvormen van nauw verwante organismen, de reïncultuur-methode nog altijd een onmisbaar hulpmiddel blijft. Deze toch stelt ons in staat, de cellen der betreffende stammen onder uiteenlopende voorwaarden te brengen en biedt daarbij dan de noodzakelijke zekerheid, dat de eventueel waargenomen morphologische veranderingen inderdaad op de cellen van het ééne, uitsluitend aanwezige organisme betrekking hebben.

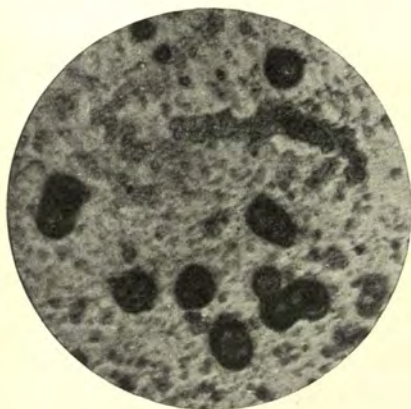
In hoofdstuk II is er reeds meermalen op gewezen, dat de koloniën, welke zich bij afstrijken op, respectievelijk suspendeeren in, de kiezelzuurplaten ontwikkelden, van zeer uiteenlopenden aard waren. De ophooping en uit de eene grondsoort gaven meer harde koloniën en die uit een andere grondsoort meer zachte. Zoo gaven ophooping en uit Belgischen, Delftschen en Groningschen grond overwegend harde koloniën. Ophooping en uit twee andere Groningsche grondmonsters gaven echter bijna uitsluitend zachte koloniën.

Zooals reeds in het vorige hoofdstuk is opgemerkt, waren de harde koloniën te hard om met het pipetje te worden overgeënt. Met glazen naalden worden zij eerder in de plaat weggedrukt dan doorgeprikt. Naast de onregelmatige halve bollen van Afb. 9 kwamen ook nog zeer harde, schijfvormige koloniën voor, welke in het midden komvormig waren uitgehold (Afb. 10).

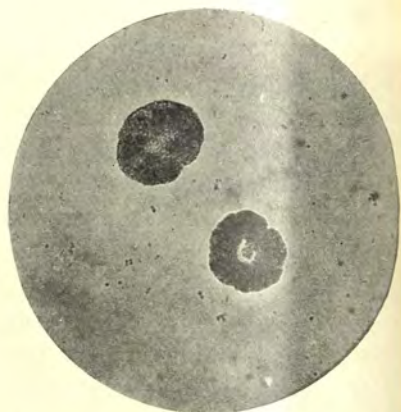
Niet alleen onder de harde, maar ook onder de zachte koloniën komen verschillende typen voor. Zoo gaven cultures, verkregen uit de lensvormige koloniën van Afb. 4, bij afstrijken op nieuwe platen ook de onregelmatige koloniën van Afb. 11.

De cultuur, welke op de eene kiezelzuurplaat de eigenaardige vlinderachtige koloniën van Afb. 13 gaf, deed op een andere kiezelzuurplaat koloniën ontstaan van het, op Afb. 16 voorkomende, groote type.

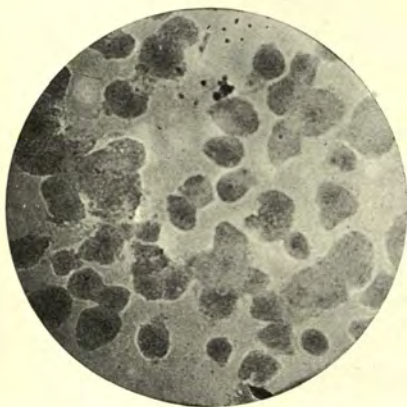




Afb. 9.  
*Nitrosomonas.*  
Harde koloniën op kiezelzuurplaat.  
Apochr. N.A. 0.65; oc. 5 ×  
(Vergr. 225 ×).



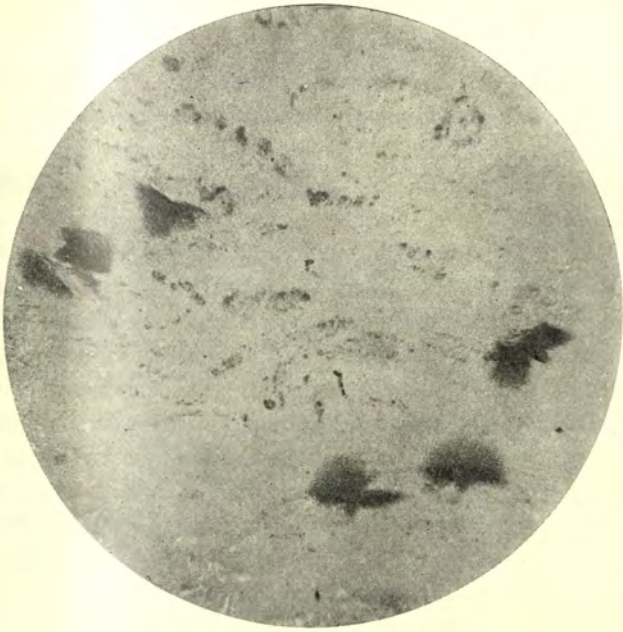
Afb. 10.  
*Nitrosomonas.*  
Harde koloniën op kiezelzuurplaat.  
Apochr. N.A. 0.65; oc. 5 ×  
(Vergr. 225 ×).



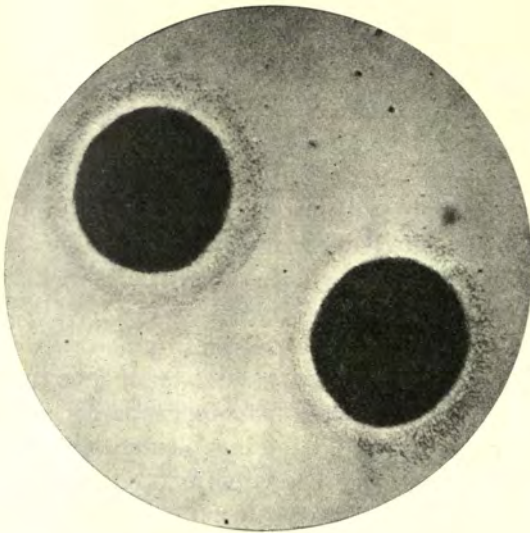
Afb. 11.  
*Nitrosomonas.*  
Zachte koloniën op kiezelzuurplaat.  
Apochr. N.A. 0.40; oc. 5 ×  
(Vergr. 65 ×).



Afb. 12.  
*Nitrosomonas.*  
Koloniën op kiezelzuurplaat.  
Obj. A.; oc. 20 ×  
(Vergr. 110 ×).



Afb. 13.  
*Nitrosomonas*.  
Koloniën op kiezelzuurplaat.  
Apochr. N.A. 0.30; comp. oc. 8 ×  
(Vergr. 110 ×).



Afb. 14.  
*Nitrosomonas*.  
Koloniën op kiezelzuurplaat.  
Obj. A.; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 110 ×).



De oorzaak van deze verscheidenheid in kolonievorm moet waarschijnlijk worden gezocht in den aard van het oppervlak en het vochtgehalte van de plaat. Het is bijv. alleszins denkbaar, dat heel fijne barstjes in de plaat de oorzaak zijn van de lensjes en de vlinderachtige koloniën.

Afb. 12 en 14 geven nog andere typen van koloniën te zien.

De consistentie van de koloniën van Afb. 14 was aanmerkelijk taaier dan die van de overige hier beschreven koloniën. Vooral de donkere kern liet zich met een micropipet bijna niet doorprikken.

Dit optreden van het harde en zachte type kan nu a priori heel goed het gevolg zijn van de aanwezigheid van de twee door WINOGRADSKY aangenomen soorten van nitriteerende bacteriën in de afgestreken ruwcultures. De kolonievorm van Afb. 14 zou dan bijv. een mengkolonie van deze twee soorten kunnen zijn. De hieronder weergegeven ervaringen, welke ik met deze beide typen van koloniën opdeed, pleiten intusschen niet voor deze zienswijze.

Het micropincet stelde mij toch in staat, met groote zekerheid de koloniën van deze platen af te nemen en ik was dus niet, zooals vroeger WINOGRADSKY, voor de overentingen alleen op zachte koloniën aangewezen. Het bleek nu, dat zoowel uit de vloeistofcultures, welke waren verkregen door enting met harde, als uit de cultures, welke waren verkregen door enting met zachte koloniën, na afstrijken op versche kiezelzuurplaten weer harde en zachte koloniën ontstonden. Hiermede had ik dus al bijna reeds volledige zekerheid, dat de opvatting van WINOGRADSKY niet juist was.

Geheel zeker was ik niet, daar het nog mogelijk was, dat de overgeënte koloniën mengkoloniën zouden zijn geweest. Dat dit een niet denkbeeldig gevaar is, zagen wij reeds in hoofdstuk II. Een zeer groot percentage van de koloniën van kiezelzuurplaten bleek immers steeds met heterotrophe organismen te zijn verontreinigd.

Uiteraard was in bedoeld opzicht slechts volledige zekerheid te verkrijgen door deze proefnemingen te herhalen met cultures, welke gegarandeerd uit één enkele cel afkomstig waren. Op zichzelf zijn heden ten dage dergelijke ééncel-cultures, indien men althans over een micromanipulator beschikt, zonder al te groote bezwaren te verkrijgen. In dit geval was deze taak veel zwaarder in verband met de zeer kleine afmetingen en de geringe lichtbreking van de nitrificerende bacteriën. Dat deze bezwaren niet gering te schatten zijn, volgt wel afdoende uit het feit, dat men ongekleurde levende cellen

van *Nitrosomonas* met de beste oplossende droge systemen, bijv. met het objectief F van Zeiss, slechts met groote inspanning kan waarnemen. De eenige oplossing leek mij daarom, gebruik te maken van „Dunkelfeld”-verlichting, waarin deze bacteriën scherp afsteken. Ik gebruikte een z.g.n. praepareercondensor van Zeiss (num. ap. 0,7—0,8), waarmede men zoowel „Hellfeld”- als „Dunkelfeld”-verlichting kan krijgen, in combinatie met objectief B en compensatie-oculair 30 ×. In een micropipetje werd een suspensie van *Nitrosomonas* opgenomen. Uit dit pipetje werden kleine druppeltjes uitgeblazen. Wanneer nu bleek, dat in een dergelijk druppeltje slechts één bacterie aanwezig was, dan werd dit snel opgenomen door een tweede pipetje, dat in den anderen houder van den micromanipulator was vastgeklemd en dat reeds van te voren in de buurt van de plaats der uitgeblazen druppeltjes was gebracht. In dit laatste pipetje was wat steriel water om het druppeltje, waarin de bacterie lag, aan te vullen, wanneer het te klein mocht zijn om de daarin liggende bacterie



Afb. 15.

*Nitrosomonas*.

Eén cel.

Zeiss praep.  
cond. N.A. 0,7  
—0,8; obj. B;  
comp. oc. 30 ×  
(Vergr. 290 ×).

op te kunnen zuigen. Dit pipetje werd in de te enten kolfjes leeggeblazen, waarna de punt in het kolfje werd afgebroken. Het afbreken moet onder water geschieden, omdat anders de punt dikwijls uit het kolfje wegspat. Voor iedere overenting werd dus een nieuw pipetje gemaakt. Dat de bacterie heel scherp in den uitgeblazen druppel was waar te nemen, blijkt uit Afb. 15.

De bacterie ligt in het centrum van de photo, in het midden van de zwarte vlek. De talrijke ronde, lichte vlekjes, welke men verder ziet, zijn druppeltjes condenswater. In het kamertje liggen nl. strookjes vochtig filtreerpapier om de ruimte zoveel mogelijk met waterdamp verzadigd te houden, daar anders de druppeltjes met de bacteriën te snel indrogen. Deze condensdruppeltjes zijn om verschillende redenen zeer prettig:

1<sup>o</sup>. men kan er goed aan zien, waar het oppervlak van het dekglas is.

2<sup>o</sup>. men kan een druppeltje, waarin 2 bacteriën aanwezig zijn, ermede verdunnen, waardoor men één van beide uit het grootere druppeltje weer op kan zuigen.

3<sup>o</sup>. zij vergemakkelijken het uitblazen van druppeltjes uit de pipet. Het is nl. niet mogelijk om uit de pipetjes, waarvan de opening



ongeveer 5—10  $\mu$  bedraagt, een druppeltje uit te blazen, daar de oppervlaktespanning daarvoor te groot is. Dit gaat evenwel heel goed, wanneer men de opening van de pipet in zoo'n druppeltje condenswater brengt. Het gaat ook wel zonder deze druppeltjes, maar dan moet de opening van het pipetje mooi vlak zijn, zoodat men een goed contact met het dekglas krijgt.

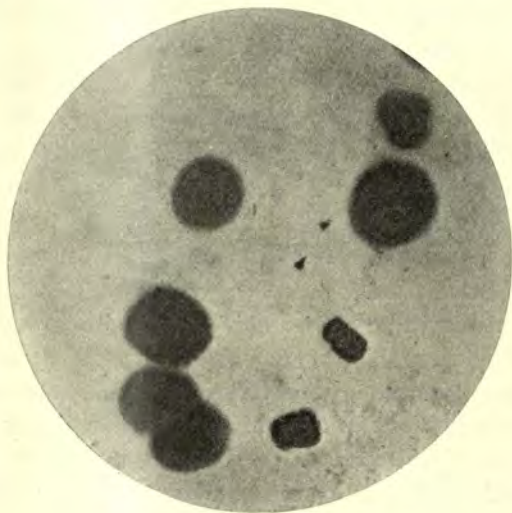
Een heel belangrijk punt is, dat het dekglas juist vettig genoeg is. Wanneer het te vet is, worden de uitgeblazen druppeltjes te rond. Men kan dan in het „Dunkelfeld”, vooral door de lichtbreking aan den rand van het druppeltje, moeilijk zien, of er één of meer bacteriën in liggen. Wanneer het dekglas te weinig vet is, loopen de uitgeblazen druppeltjes te veel uit, zoodat het heele oppervlak egaal nat wordt. Het is natuurlijk niet gewenscht, dat deze condenswaterdruppeltjes te groot worden. Van grooten invloed is hierop de temperatuur van de kamer, waarin men werkt.

Als verlichting werd gebruikt een 5 Amp. wisselstroombooglamp.

In het geheel werden 50 cellen geïsoleerd, welke werden geënt in het eerder genoemde minerale milieu van WINOGRADSKY. Na veertien dagen werd voor de eerste maal op nitriet gereageerd, maar toen was er van nitritatie nog niets te bemerken; elf dagen later echter was in drie kolfjes nitritatie opgetreden. Zeventien dagen later werd nogmaals op nitriet gereageerd, er bleken echter niet meer nitriteerende cultures op gang te zijn gekomen. Daar in kleine Erlenmeyers van 50 cc met 10 cc cultuurvloeistof werd gecultiveerd, werd eenige malen opnieuw ammoniumsulfaat toegevoegd en ook eenmaal wat steriel water om het verdampste water weer aan te vullen. Ondanks al deze voorzorgen kwam toch slechts 6% van de ééncelcultures op gang.

De gedachte kwam nu bij mij op, dat dit slechte resultaat hoofdzakelijk moest zijn te wijten aan den schadelijken invloed van het intensieve licht van de booglamp. Ik besloot daarom, de isolatie nog eens te herhalen, maar nu onder zoodanige voorwaarden, dat de cellen zooveel mogelijk tegen het licht werden beschermd. Ten eerste maakte ik het voorraadspipetje aan de buitenzijde met piceïne zwart, door het, met water gevuld, in gesmolten piceïne te doopen. Door tijdens deze bewerking met een injectiespuit het water uit te persen, werd verhinderd, dat de opening van het pipetje dichtraakte. Ten tweede plaatste ik, behalve een cuvette met kopersulfaat, ook nog één, gevuld met aurantiageel, voor de booglamp. Door dit

laatste cuvetje werden de ultraviolette en de blauwe stralen volledig geabsorbeerd en tevens een groot deel van de groene. Het gele licht, dat overbleef, was nog ruim voldoende om de bacteriën in de druppeltjes scherp te kunnen waarnemen. Ditmaal werden 30 cellen geënt in kolfjes met de cultuurvloeistof van WINOGRADSKY. Na 16 dagen werden nu 7 nitriteerende cultures gevonden en 12



Afb. 16.

*Nitrosomonas.*

Koloniën op kiezelzuurplaat,  
afkomstig van ééncel-cultuur.

Obj. A; oc. 20 ×  
(Vergr. 110 ×).

dagen later waren er nog 8 bijgekomen. Nog een maand lang werden de kolfjes aangehouden en op de eerder beschreven wijze verzorgd, maar er kwamen niet meer cultures op gang. Uit deze proef blijkt overtuigend, dat het zooveel mogelijk beschermen van de cellen tegen het licht een belangrijke factor is; dank zij deze voorzorgen toch was nu 50 % der geïsoleerde cellen tot ontwikkeling gekomen.

Ten einde een indruk te krijgen van de kans, welke men heeft om bij de gevolgde werkwijze de te enten kolfjes te infecteeren, werden alle kolfjes na een maand afgestreaken op pepton-agarplaten. Hierbij bleek, dat alle kolfjes rein waren en dat de bedoelde kans dus zeer klein is.



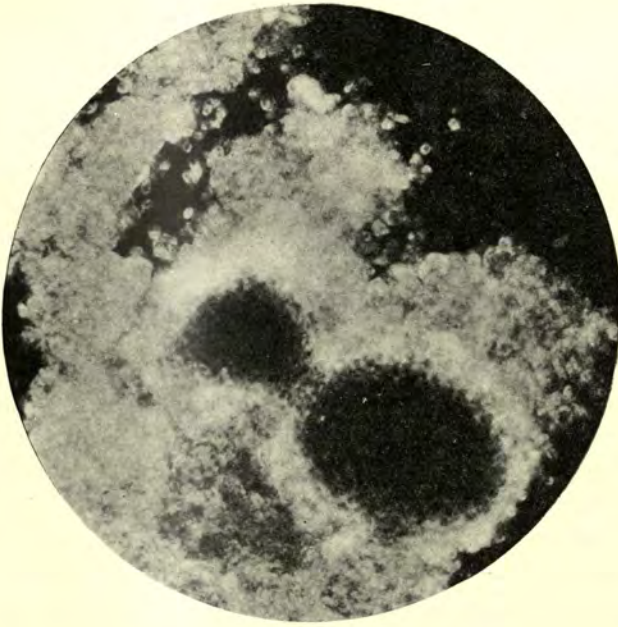
Van de aldus verkregen ééncel-cultures werden er eenige op kiezelzuurplaten afgestreken. Op deze platen kwamen wederom zoowel zachte als harde koloniën tot ontwikkeling, zooals op Afb. 16 duidelijk is waar te nemen.

Hiermede is dus afdoende bewezen, dat door één en denzelfden stam zoowel harde als zachte koloniën kunnen worden gevormd.

Het leek mij nu nog wenschelijk, aan te toonen, dat de door mij verkregen en overgeënte harde koloniën inderdaad mochten worden geïdentificeerd met het door WINOGRADSKY als *Nitrosocystis* beschreven organisme. Weliswaar maakte de zeer harde consistentie dier koloniën, welke, evenals WINOGRADSKY dit voor *Nitrosocystis* beschrijft, met naalden niet waren te verdeelen en daarmede slechts in de kiezelzuurplaten werden gedrukt, dit reeds uitermate waarschijnlijk.

Een nadere bestudeering van de met de ééncel-cultuurmethode verkregen vloeistofcultures deed echter allen twijfel verdwijnen. In de kolfjes, waarin nitritatie had plaats gehad, was gewoonlijk uiterlijk niets te zien. Het eenige was, dat soms de kleur van het op den bodem liggende magnesiumcarbonaat, vergeleken met die van niet geënte kolfjes, iets crème was. Een ander kenmerk was, dat het magnesiumcarbonaat in de kolfjes met *Nitrosomonas* dikwijls meer weerstand bood tegen opwarrelen dan dat in niet geënte kolfjes. Wanneer een beetje van dit magnesiumcarbonaat in verdund zoutzuur werd opgelost, kreeg ik een iets troebele vloeistof, waarin kleine vlokjes dreven. Bekeek ik deze vlokjes onder den microscoop, dan zag ik heel duidelijk, dat zij uit bacteriën waren opgebouwd. In vele vlokjes lagen de bacteriën in een dichte massa opeengepakt, zoodat ik de afzonderlijke cellen niet kon waarnemen. Dikwijls waren deze dichte massa's omgeven door een gemeenschappelijk kapsel. In Afb. 17 vindt men een „Dunkelfeld” photographie en in Afb. 18 een gewone microphotographie van dezelfde vlokjes. Wanneer men Afb. 18 vergelijkt met de photo's van WINOGRADSKY in Lafar, plaat III, fig. 5 en 6, dan kan er geen twijfel bestaan, of de vlokjes uit mijn cultures zijn identiek met de daarop afgebeelde zoögloea, welke door WINOGRADSKY ook in zijn verhandeling van 1933 nog als voorbeelden van echte, voor *Nitrosocystis* kenmerkende, cysten worden vermeld.

Het in Afb. 19 weergegeven, volgens de methode van ZETTNOW gekleurde praeparaat van een jong vlokje geeft duidelijk te zien,



Afb. 17.  
*Nitrosomonas*.  
Zoogloeastadium.  
Zeiss cardioïd cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).



Afb. 18.  
*Nitrosomonas*.  
Zoogloeastadium.  
Apochr. 1.3; comp. oc. 8 ×  
(Vergr. 1000 ×).



hoe deze vlokjes ontstaan. Wij zien hierop, hoe de bacteriën zijn omgeven door een verwarde draadvormige massa, welke de cellen tezamen houdt. Achteraf is mij gebleken, dat deze draadvorming ook door WINOGRADSKY <sup>1)</sup> reeds in 1892 is waargenomen, zooals blijkt uit een uitvoerige noot in de in dat jaar verschenen verhandeling. Hoewel WINOGRADSKY in deze noot op het merkwaardige van de waargenomen formatie wijst en mededeelt, dat hij binnenkort daarop hoopt terug te komen en dat hij er dan tevens een photographie van zal publiceeren, is dit nooit geschied.

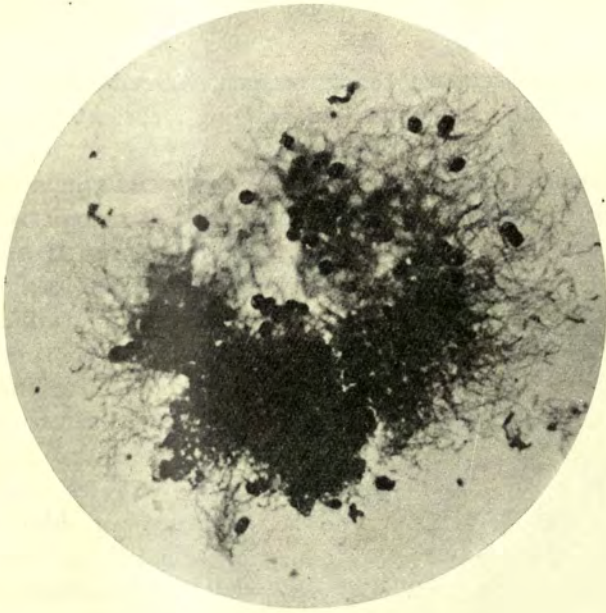
Het is merkwaardig, dat men in „Dunkelfeld”-praeparaten de bewuste draadvorming zeer slecht kan waarnemen. Toch ziet men in een dergelijk praeparaat, zooals uit Afb. 20 blijkt, duidelijk, dat de cellen in een gelatineuze massa zijn ingebed.

De beteekenis van deze afscheiding zal wel zijn, dat de massa zich onder voor de bacteriën ongunstige omstandigheden verhardt en zodoende de bacteriën beschermt. Ook WINOGRADSKY staat blijkbaar op dit standpunt, zooals blijkt uit het feit, dat hij in zijn recente verhandeling de zoëgloea als cysten karakteriseert. Het is nu zeer goed mogelijk, dat steeds dan het zoëgloeastadium overheerscht, wanneer men bacteriën isoleert uit gronden, waarin zij bij voortduring onder slechte omstandigheden verkeerden (bijv. in boschgronden). In andere gronden (cultuurgronden), waarin de voorwaarden voor deze bacteriën gunstig zijn, zal daarentegen het monadenstadium overheerschen.

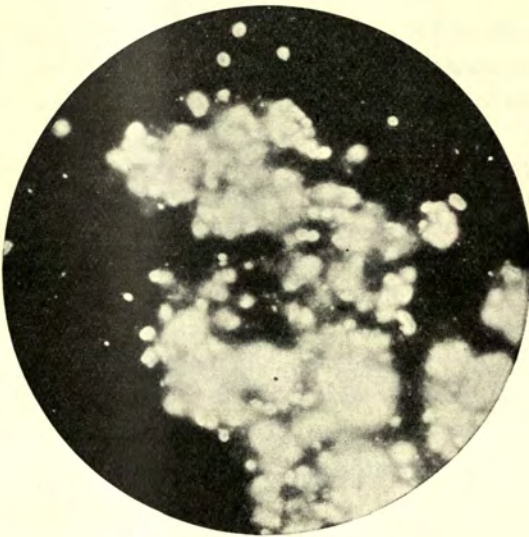
Het is nu van veel belang, dat het mij gelukte in dezelfde cultuur, waarin ik de zoëgloea had waargenomen, het monadenstadium te zien optreden. Hiervoor werden kolven van 1 L inhoud voor drievierde gedeelte gevuld met cultuurvloeistof en vervolgens geënt. Op deze wijze kreeg ik een hooge, volmaakt heldere vloeistoflaag, waarin de geringste troebeling duidelijk waarneembaar moest zijn. Vooral hoopte ik, dat deze hooge vloeistoflaag ertoe zou leiden, onder in de kolf een lagere zuurstofspanning te krijgen, wat dan misschien het gevolg zou kunnen hebben, dat *Nitrosomonas* zou gaan uitzwermen naar gebieden met hoogere zuurstofspanning. Deze proef had inderdaad het gewenschte resultaat. Na ongeveer 14 dagen werd de vloeistof in de kolf plotseling troebel en in een microscopisch praeparaat zag ik vele kleine ovale bacteriën

---

<sup>1)</sup> Zie l.c. p. 107.



Afb. 19.  
*Nitrosomonas*.  
Zettnow-kleuring.  
Zoögloeavorming.  
Zeiss aplan. cond.; apochr. N.A. 1.4; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1600 ×).



Afb. 20.  
*Nitrosomonas*.  
Cardioid-cond.; Apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).



(zie: Afb. 21), welke statig rondzwommen. Na een dag of vier werd de troebeling minder, hetgeen gepaard ging met het verdwijnen van de ammoniak.

In zijn laatste verhandeling schrijft WINOGRADSKY, naar aanleiding van het feit, dat hij bij zijn harde koloniën op platen nooit beweeglijke



Afb. 21.

*Nitrosomonas*.

Erythrosine-kleuring. „Lifa” groen filter 373.  
Apochr. N.A. 1,4; proj. oc.  
(Vergr. 1000 ×).

vormen zag: „Il est à croire, du reste, que la motilité est plus rare sur un milieu solide, où les microbes sont exposés à l'air, que dans un milieu liquide, où l'aérotropisme excite les cellules au mouvement vers les couches supérieures”<sup>1)</sup>). Met deze opmerking voor oogen doet het verwonderlijk aan, dat WINOGRADSKY zijn *Nitrosocystis*-stammen ook niet eens aan een proef onderwierp, zooals door mij hierboven werd beschreven.

Uit het voorafgaande volgt voldoende, dat het zoögløeostadium en het monaden-

stadium bij elkaar behooren en dat er dus niet de minste reden is om, zooals WINOGRADSKY doet, naast *Nitrosospira* nog twee verschillende geslachten van nitriteerende bacteriën te onderscheiden.

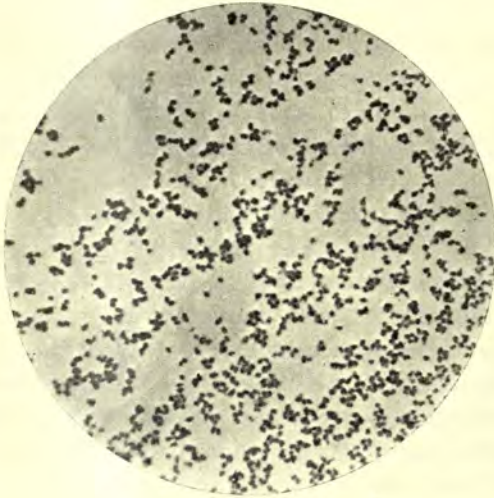
## § 2. DE NITRATEERENDE BACTERIËN.

De bacteriën van het geslacht *Nitrobacter* worden door WINOGRADSKY als korte, onbeweeglijke staafjes beschreven. Het komt mij voor, dat het juister zou zijn, den vorm als ellipsjes aan te duiden. Van den vorm is moeilijk te zeggen, of het een coccus is of niet. Hetzelfde zegt PROUTY van den door hem geïsoleerden *Nitrobacter*-stam. De vorm van *Nitrobacter* gelijkt zoozeer op dien van *Nitrosomonas*, dat het niet is te zien, dat er twee verschillende organismen

<sup>1)</sup> l.c. p. 401.

aanwezig zijn, wanneer men deze twee naast elkaar in één microscopisch praeparaat heeft. In Afb. 22 vindt men een photographie van de bacteriën van een door mij geïsoleerden stam.

In Hoofdstuk II werden in Afb. 7 en 8 reeds photographieën van koloniën van *Nitrobacter* gegeven. De koloniën zijn vlak en meestal onregelmatig van vorm. Harde koloniën of andere afwijkende typen werden door mij niet waargenomen.



Afb. 22.  
*Nitrobacter*.  
 Erythrosine-kleuring, „Lifa” groenfilter 373.  
 Apochr. N.A. 1,4; proj. oc.  
 (Vergr. 1000 ×).

Behalve aan het geslacht *Nitrobacter* meent WINOGRADSKY in zijn laatste verhandeling ook nog aan andere bacteriën nitrateerend vermogen te moeten toeschrijven. Daar deze laatste bacteriën alle gemeen hebben, dat zij zich als een dunne sluier over de door WINOGRADSKY uitsluitend gebruikte kiezelzuurplaten verbreiden, vat hij hen samen onder den naam „voiles”. Uit de beschrijving, welke van deze „voiles” wordt gegeven, blijkt nu, dat WINOGRADSKY heel waarschijnlijk hier het slachtoffer is geworden van zijn nieuwe methodiek.

Van deze „voiles” kent WINOGRADSKY vier soorten. Van één soort zegt hij zeker te zijn, dat zij kan nitrateeren, zij het dan ook zwak, maar



van de andere drie acht hij het zelf hoogst twijfelachtig. Gaat men hierdoor al twijfelen aan het nitraterend vermogen van de eerste soort, nog meer doet men dit, wanneer men leest: „On constate notamment que ces voiles s'étendent non seulement sur des milieux à nitrite, mais tout aussi bien sur un milieu à nitrate, ne contenant donc aucune trace d'azote oxydable. Leur énergétique reste donc actuellement une énigme, qui est encore à élucider”<sup>1)</sup>. Afgaande op deze uitspraak krijgt men den indruk, dat WINOGRADSKY niet bekend is met het bestaan van organismen als de door BEIJERINCK en VAN DELDEN geïsoleerde en door BEIJERINCK veelvuldig in nitrificatie-ophoopingingen aangetroffen *Bacillus oligocarophilus*. Voor dit organisme toch stelden genoemde onderzoekers reeds in 1903 het vermogen vast om onder huidvorming op de bewuste nitraathoudende minerale oplossingen te groeien. Maar tevens wisten zij, dank zij de toepassing der reïncultuurmethode, het „énigme” van de stofwisseling tot oplossing te brengen door het bewijs te leveren, dat het organisme groeit ten koste van de geringe hoeveelheid vluchtige organische verbindingen, welke normalerwijze in de verontreinigde atmosfeer van bewoonde ruimten voorkomt. Dat wij bij WINOGRADSKY's organismen met *Bacillus oligocarophilus* en naverwante soorten te doen hebben, wordt door de photo's, welke WINOGRADSKY van deze organismen geeft, in hooge mate aannemelijk gemaakt.

Wij hebben hier andermaal een voorbeeld, hoe in bepaalde gevallen de reïncultuurmethode een onmisbaar element vormt bij de nadere bestudeering van micro-organismen.

---

<sup>1)</sup> l.c. p. 416.

<sup>2)</sup> M. W. BEIJERINCK und A. VAN DELDEN, Centralbl. f. Bakt. II, 9, 3, 1902; M. W. BEIJERINCK, Folia Microbiologica 3, 91, 1914.

## HOOFDSTUK IV.

### OVER DE ONMISBAARHEID VAN CALCIUM VOOR DE OPTIMALE ONTWIKKELING DER NITRITEERENDE BACTERIËN.

#### § 1. OVER EEN ONBEKENDEN FACTOR, WELKE DE VERMEERDERING VAN *NITROSOMONAS* IN HET MEDIUM VAN WINOGRADSKY BEVORDERT.

In Hoofdstuk II werd melding gemaakt van het opmerkelijke feit, dat de nitriteerende bacteriën in het gebruikelijke voedingsmedium volgens WINOGRADSKY, voor de bereiding waarvan gedestilleerd water en natriumchloride pro-analyse was gebruikt, op den duur niet of slechts zeer langzaam tot ontwikkeling kwamen. Tevens werd daar ter plaatse vermeld, dat geen moeilijkheden meer werden ondervonden, zoodra ik het zuivere zout door ruw zout verving.

Zoals wij in hoofdstuk I zagen, hebben een aantal der vroegere onderzoekers eveneens gerapporteerd, dat bij afenting van op kiezelzuurplaten verkregen koloniën van *Nitrosomonas* in het gebruikelijke voedingsmedium de nitritatie daarin niet of slechts langzaam plaats vond, terwijl anderen vermeldden, dat in rein-cultures de nitritatie na verloop van tijd sterk achteruitging. Het leek mij niet onwaarschijnlijk, dat de door mij geconstateerde nadeelige invloed van het gebruik van het zuivere zout een van de oorzaken hiervan zou zijn. Daarom meende ik, dat het van belang was, deze kwestie aan een nader onderzoek te onderwerpen.

De schadelijke invloed van het gebruik van zout pro-analyse kon nu het gevolg zijn, hetzij van zich in dit zout bevindende spoortjes van een voor de ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën schadelijke stof, hetzij van het ontbreken in dit zout van een voor een optimale ontwikkeling dezer organismen noodzakelijke stof.

In het hieronder volgende zullen wij dezen onbekenden factor voorloopig met „X” aanduiden. Alle proeven, welke betrekking



hebben op dezen „factor X”, zijn gedaan in Erlenmeyers van Jenaer Geräteglas van 300 cc. Bij de aanvankelijk genomen proeven werden deze kolfjes met 50 cc van de door WINOGRADSKY aangegeven cultuurvloeistof, welke dus 0,05 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bevatten, geënt met 1 cc van een nitriteerende cultuur in een medium van gedistilleerd water en zuiver keuzenzout. Dit leek beter dan overenten uit cultures, afkomstig uit een medium met ruw keuzenzout, daar men mocht verwachten, dat het effect van een gunstige of ongunstige samenstelling van het onderzochte medium veel beter zou uitkomen. Inderdaad bleek, dat de nitritatie bij overenting uit een medium met ruw zout naar een met zuiver zout niet altijd direct sterk achteruitging.

De eerste proef was er voornamelijk op gericht na te gaan, of de eerste der beide bovengenoemde veronderstellingen juist was.

Bij deze proefneming werd namelijk het keuzenzout pro-analyse door natriumchloride van andere herkomst, resp. door andere zouten of zoutmengsels, vervangen.

TABEL III.

*Proefnemingen betreffende de snelheid van nitritatie in het standaard-medium, waarin het keuzenzout pro-analyse door verschillende andere zouten is vervangen.*

Toegevoegde zouten	Ammoniakreactie	
	1	2
NaCl pro-analyse . . . . .	+++	+++
ruw NaCl . . . . .	—	—
1 deel NaCl (p. a.) + 1 deel NaCl ruw . . . . .	+	+
NaCl uit $\text{BaCl}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ bereid . . . . .	+++	—
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ . . . . .	+++	+++
KCl . . . . .	+++	+++
$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{KCl}$ . . . . .	+++	+++

Van de verschillende zouten werden evenveel grammoleculen toegevoegd als van het keuzenzout. De proef werd in duplo gedaan. Na elf dagen werd met Nessler's reagens op ammoniak gereageerd. Het aantal in Tabel III opgenomen kruisjes geeft een benaderende maat voor de hoeveelheid nog aanwezige ammoniak.

Het trage verloop van de nitritatie in alle gevallen, waarin geen ruw keukenzout aan het medium was toegevoegd, pleit nu wel zeer sterk tegen de eerste veronderstelling.

Om de tweede veronderstelling meer rechtstreeks te toetsen werd de volgende proefneming verricht. Bij deze proefneming werd het ruwe keukenzout opgelost en de verkregen oplossing daarna ingedampt. Gedurende het indampen werd het uitgekristalliseerde zout eenige malen afgefilterd, zoodat verschillende zoutfracties werden verkregen. Met elk dezer fracties werden wederom media bereid en hiermede opnieuw nitritatieproefnemingen ingezet. Hierbij werden de in Tabel IV weergegeven resultaten verkregen.

TABEL IV.

*Invloed van het omkristalliseeren van ruw keukenzout op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Toegevoegde zoutfracties	Ammoniakreactie	
	1	2
1e fractie (nogmaals omgekrist.). . . . .	+++	+++
1e fractie. . . . .	+++	+++
2e fractie. . . . .	+++	+++
3e fractie. . . . .	++	++
4e fractie. . . . .	—	—
rest op het filter . . . . .	+++	+++

Het aantal kruisjes in Tabel IV is een maat voor de hoeveelheid ammoniak, welke na 6 dagen nog aanwezig was.

Een tweede proevenreeks, ook in duplo gedaan, gaf precies hetzelfde resultaat. Deze uitkomsten laten geen twijfel, of de gunstige werking van het ruwe keukenzout moet worden toegeschreven aan het daarin voorkomen van een de ontwikkeling der bacteriën bevorderende stof. Tevens blijkt, dat deze stof oplosbaar is in water.

De volgende proef werd gedaan om na te gaan, of de „factor X” ook in alcohol oplost. De gebruikte alcohol was 96%.



TABEL V.

*Invloed van de voorbehandeling van ruw keuzenzout met alcohol op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Toegevoegde zoutfractie	Ammoniakreactie	
	1	2
2 × omgekrist. zout . . . . .	+++	+++
4e fractie uit Tabel IV . . . . .	—	—
ruw zout met alcohol geëxtraheerd . . . . .	±	±
2 × omgekrist. zout + een kleine hoeveelheid alcohol. extr.	+	+
ruw zout met alcohol uit verz. waterige opl. neergeslagen .	—	—
zout, dat bij indampen uit de alcohol. opl. uitkristalliseerde	—	—
2 × omgekrist. zout + iets zout, dat bij geheel indampen van bovengenoemde alcohol. opl. overbleef. . . . .	—	—

Het aantal kruisjes in Tabel V is een maat voor de hoeveelheid ammoniak, welke na 8 dagen nog aanwezig was. Hieruit volgt dus, dat de „factor X” wel eenigszins oplosbaar is in 96% alcohol.

Vervolgens werd een proef gedaan met uitgegloeid zout en met een zoutoplossing, welke gedurende een vijftal uren met waterstofsperoxyde was gekookt en vervolgens ingedampt. Hierbij bleek, dat de „factor X” door uitgloeien was vernietigd, maar dat de behandeling met  $H_2O_2$  niet den minsten invloed had. Dit laatste maakt het meer waarschijnlijk, dat de „factor X” van anorganischen dan van organischen aard is.

Behalve dat de „factor X” een, de stofwisseling der nitriteerende bacteriën bevorderend, element kan zijn, zooals bijv. Mo voor de stikstofbinding door *Azotobacter*, kan het ook zijn, dat door verwijdering van den „factor X” een verstoring van het ionenevenwicht in de cultuurvloestof optreedt. Eenige kleine wijzigingen in de verhouding van de, voor de bereiding van het milieu gebruikte, zouten bleken evenwel weinig invloed te hebben, zoodat de laatstgenoemde veronderstelling op het eerste gezicht niet zoo waarschijnlijk leek. Om deze reden werd allereerst de invloed van de toevoeging van verschillende elementen nagegaan. Daar ik reeds had ondervonden, dat verschillende keuzenzoutmonsters uit den handel niet alle even gunstig waren, leek het mij aangewezen, in de

eerste plaats aandacht te schenken aan jodium, dat dikwijls als verontreinigend element in ruwe zoutmonsters is aangetroffen. Toevoegingen van 0,002, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, 0,00001, 0,000005 mg KJ hadden evenwel niet den minsten invloed.

Hierop werd de invloed nagegaan van de toevoeging van eenige andere elementen, waarvan uit de litteratuur bekend is, dat zij somtijds de ontwikkeling van micro-organismen bevorderen.

TABEL VI.

*Invloed van de toevoeging van verschillende elementen op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen	Ammoniakreactie	
	1	2
ruw zout . . . . .	—	—
omgekristalliseerd zout met:		
5 mg MnSO <sub>4</sub> . . . . .	+++	+++
0,5 mg MnSO <sub>4</sub> . . . . .	+++	+++
0,1 mg ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	+++	+++
0,075 mg „ . . . . .	+++	+++
0,050 mg „ . . . . .	+++	+++
0,025 mg „ . . . . .	+++	+++
0,01 mg „ . . . . .	+++	+++
0,01 mg CuCl <sub>2</sub> . . . . .	+++	+++
0,005 mg CuCl <sub>2</sub> . . . . .	+++	+++
0,01 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . . . . .	+++	+++
0,01 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,01 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	+++	+++
0,1 mg „ + 0,1 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . . . . .	+++	+++
0,01 mg „ + 0,1 mg „ . . . . .	+++	+++
0,1 mg „ + 0,01 mg „ . . . . .	+++	+++
0,01 mg „ + 0,01 mg „ . . . . .	+++	+++

De in Tabel VI weergegeven uitkomsten van deze proevenreeks berusten op een beoordeeling van het ammoniakgehalte der media na 7 dagen.

In al deze gevallen was van een gunstigen invloed dus niets te bemerken. Geheel zonder invloed zijn de bewuste toevoegingen evenwel soms niet. Dit bemerkt men echter pas, wanneer men langer cultiveert en dan de media met toevoegingen niet vergelijkt



met de cultures met ruw keuzenzout, doch met die, waarin alleen zuiver keuzenzout is gebruikt.

TABEL VII.

*Proefnemingen betreffende de snelheid van nitritatie in het standaardmedium met omgekristalliseerd keuzenzout, al dan niet onder toevoeging van Cu, Zn en Mo.*

mg CuSO <sub>4</sub>	mg ZnSO <sub>4</sub>	mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	aantal dagen, noodig om alle ammoniak te oxydeeren	
			1	2
			18	18
0,01			15	15
0,001			15	15
	0,01		15	15
	0,001		15	15
		0,01	16	16
		0,001	16	16
0,001	0,01		11	11
0,001	0,001		16	16
0,001	0,01	0,01	11	11
0,001	0,001	0,001	16	16
0,001	0,01	0,001	16	16
0,001	0,001	0,01	10	10
0,01	0,01	0,01	16	16
0,01	0,001	0,001	16	16
0,001	0,01	0,001	16	16

Dit komt bijv. tot uiting in de in Tabel VII weergegeven, in duplo verrichte proefnemingen, waarbij duidelijk blijkt, dat de daarin genoemde toevoegingen een gunstigen invloed hebben. Toch duurt het in het gunstigste geval nog altijd 10 dagen, voordat de ammoniak is verbruikt, terwijl in een medium met ruw zout de ammoniak reeds na 5 dagen was verdwenen. Wanneer men er rekening mede houdt, dat ik hier had geënt met een naar verhouding zeer actieve cultuur, waardoor de tijd, noodig om alle ammoniak te oxydeeren, korter was dan bij de meeste voorafgaande proefnemingen het geval was, dan wordt het duidelijk, dat het ideale medium nog lang niet was bereikt. De activiteit der gebruikte cultuur blijkt in het bijzonder ook uit het feit, dat er slechts 18 dagen noodig waren

om alle ammoniak te oxydeeren in een cultuurvloeistof met zuiver keukenzout.

Wanneer men de proeven uit verschillende onderzoekingsreeksen onderling wil vergelijken, dan moet men bedenken, dat de vitaliteit van de enting grooten invloed heeft op het resultaat, zoodat men bij de eene proef een gunstiger effect krijgt door de toevoeging van bepaalde stoffen dan bij een andere.

Vervolgens werd onderzocht, of deze voor de nitritatie zoo gunstige stoffen ook in leidingwater aanwezig zijn. Bovendien werd nagegaan, of *Nährstoff-Heyden* deze stoffen soms bevatte. In Hoofdstuk V zal namelijk blijken, dat deze *Nährstoff-Heyden* onder bepaalde omstandigheden een zeer gunstigen invloed heeft op den groei der nitriteerende organismen.

Voor deze proeven zijn reïncultures gebruikt, want in ruwcul-tures wordt deze organische stof door de aanwezige heterotrophe bacteriën aangetast, hetgeen een zeer vertragenden invloed heeft op de ontwikkeling van de nitriteerende organismen. In Tabel VIII zijn de resultaten van deze proef meedeeld. De hoeveelheid

TABEL VIII.

*Invloed van het gebruik van leidingwater, resp. van toevoeging van Nährstoff-Heyden, al of niet gecombineerd met verschillende elementen, op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen	mg NaNO <sub>2</sub> per 50 cc	
	1	2
gedest. water . . . . .	2,5	5
gedest. water + NaCl (p.a.) . . . . .	5	5
leidingwater + NaCl (p.a.) . . . . .	35	35
gedest. water + NaCl (p.a.) + 0,001 mg CuSO <sub>4</sub> + + 0,001 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,01 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . . . . .	5,5	5,5
gedest. water + 0,1% Nährstoff-Heyden. . . . .	4	5
gedest. water + NaCl (p.a.) + 0,1% Nährstoff-Heyden	5	5
gedest. water + NaCl (p.a.) + 0,001 mg CuSO <sub>4</sub> + + 0,001 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,01 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> + 0,1% Nährstoff-Heyden . . . . .	7,5	5
leidingwater + ruw zout . . . . .	35	35
leidingwater + ruw zout + 0,1% Nährstoff-Heyden .	35	35



nitriet, welke na een week cultiveeren in elk kolfje is gevormd, is hier uitgedrukt in mg  $\text{NaNO}_2$  per 50 cc, waardoor men dus een scherperen indruk krijgt van het werkelijke verschil tusschen een gunstig en een ongunstig medium.

Het feit, dat de nitritatie in leidingwater met zout pro-analyse even goed gaat als in gedestilleerd water met ruw zout, wijst erop, dat de „factor X” ook in leidingwater aanwezig is. Dat *Nährstoff-Heyden* onder de gegeven voorwaarden geen gunstigen invloed uitoefent, leert, dat de, in het volgende hoofdstuk besproken, groei-bevorderende eigenschap van deze substantie op andere factoren dan op den „factor X” moet berusten.

## § 2. SPECTROGRAPHISCH ONDERZOEK VAN HET RUWE ZOUT.

Het aanwezig zijn van den „factor X” in leidingwater en het ontbreken daarvan in *Nährstoff-Heyden* maakt het ook weer waarschijnlijk, dat deze factor van anorganischen aard is en daarom werd besloten, het ruwe zout aan een spectrographische analyse te onderwerpen.

Voor het spectrographisch onderzoek <sup>1)</sup> werd gebruik gemaakt van een kwartsspectrograaf van ZEISS voor het onzichtbare gedeelte van het spectrum en van een HILGER-spectrograaf voor het zichtbare gedeelte. De te onderzoeken geconcentreerde zoutoplossing werd gebracht in den verstuiver van LEONARD en POLLOK <sup>2)</sup>. Deze verstuiver bestaat uit een U-vormig buisje, dat aan weerszijden een trechtertje draagt. In één van de trechtertjes staat een staafje goud, met daaromheen een nauw passend glazen buisje, dat juist tot den bovenkant van het goudstaafje reikt. De geconcentreerde zoutoplossing wordt in het andere trechtertje gegoten tot het trechtertje met het goudstaafje bijna vol is. Door de capillaire werking van de nauwe ruimte tusschen het goudstaafje en het erom geschoven glazen buisje wordt de oplossing naar het bovenoppervlak van het goud gevoerd. Dit instrumentje werd in één

<sup>1)</sup> De hiervoor benoedigde, in het Laboratorium voor Chemische Technologie aanwezige, apparatuur werd door Prof. WATERMAN welwillend ter beschikking gesteld, terwijl de Heer Ir. L. J. N. VAN DER HULST zoo vriendelijk was, mij bij de uitvoering der proefnemingen behulpzaam te zijn. Beiden heeren zij daarvoor ook hier ter plaatse nogmaals mijn zeer oprechte dank betuigd.

<sup>2)</sup> F. LÖWE, *Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners*, Leipzig, 1925, p. 50.

van de klemmen van het vonkenstatief van GRAMMONT geplaatst. In de andere klem werd een tweede goudstaafje geplaatst vlak boven het eerste. Tusschen deze beide electroden werd nu de zoutoplossing met een gecondenseerde vonk van 10000 Volt verstoven. De spectra van de verschillende zouten werden vlak onder elkaar opgenomen. Hierdoor kan men gemakkelijk zien, welke lijnen in het eene spectrum wel voorkomen en in het andere niet. In het onzichtbare gedeelte werd een golflengtenschaal meegephotografeerd, zoodat daarin de plaats der lijnen gemakkelijk, zij het dan ook niet zeer nauwkeurig, kon worden bepaald. Om met grootere nauwkeurigheid de golflengte der lijnen te kunnen bepalen, werd een  $2 \times$  vergrootte afdruk van de negatieven gemaakt. De golflengte der lijnen in het zichtbare gedeelte van het spectrum werd bepaald door gebruik te maken van een dispersienet van HARTMANN <sup>1)</sup>. Op den abscis van een dergelijk net is de golflengte uitgezet en wel zoo, dat de eenheid van golflengte, volgens dezelfde wet als de dispersie, met afnemende golflengte toeneemt. Op de ordinat wordt het opgenomen spectrum uitgezet. In een dergelijk net wordt de ijkromme nagenoeg een rechte lijn, waardoor de bepaling van de golflengte voor de onbekende lijnen gemakkelijker en nauwkeuriger wordt dan met een kromme lijn. Om deze rechte lijn in het dispersienet te kunnen trekken, is het noodzakelijk, dat men op dezelfde plaat als waarop de spectra van de te onderzoeken zoutmonsters zijn opgenomen, ook eenige bekende spectra met karakteristieke lijnen, bijv. dat van een kwikbooglamp, opneemt.

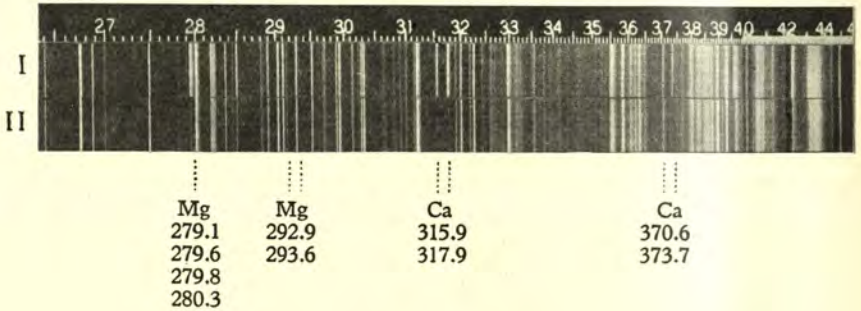
Op deze wijze kon de ligging der door mij opgenomen lijnen evenwel niet nauwkeuriger dan tot op  $5 \text{ \AA}$  worden bepaald. Om nu uit te maken, van welke elementen de gevonden lijnen afkomstig waren, werd gebruik gemaakt van de bekende spectroscopische tabellen van KAYSER. In deze tabellen is de golflengte in  $0,1 \text{ \AA}$  nauwkeurig opgegeven. Daar mijn metingen slechts op  $5 \text{ \AA}$  nauwkeurig waren, was natuurlijk van een absolute bepaling geen sprake. Door deze onnauwkeurigheid kwam zeer vaak meer dan één element in aanmerking. Door evenwel rekening te houden met de helderheid der lijnen, welke in de tabel van KAYSER zijn opgenomen, was het mogelijk, te beslissen, van welk element het voorkomen het meest

---

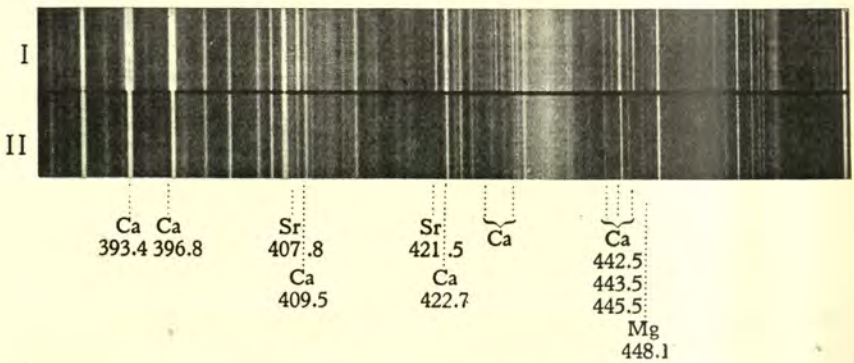
<sup>1)</sup> Deze dispersienetten worden door SCHLEICHER en SCHÜLL in den handel gebracht.



waarschijnlijk was. Alle elementen geven toch meer dan één lijn, zoodat, wanneer men enkele karakteristieke lijnen heeft gevonden, men verder kan vaststellen, of de andere te verwachten lijnen aanwezig zijn. Op deze wijze heeft men een contrôle, of de keuze uit een zeker aantal, primair mogelijk aanwezige, elementen juist is geweest.



Afb. 23.



Afb. 24.

Behalve de spectra van het gunstig werkende monster ruw zout en dat van het zout pro-analyse, werden ook nog de spectra van verschillende andere zoutmonsters, alsmede ook dat van ingedampt leidingwater opgenomen. Bij de reproductie heb ik mij echter tot de beide eerstgenoemde monsters beperkt; in Afb. 23 vindt men het ultraviolette spectrum, in Afb. 24 het zichtbare spectrum van deze zoutmonsters weergegeven.

Uit de gereproduceerde spectrogrammen blijkt nu reeds dadelijk, dat in het spectrum van het ruwe zout (I) de lijnen van Mg, Ca en Sr aanwezig zijn en dat deze lijnen in het spectrum van het zuivere keukenzout (II) ontbreken of veel zwakker zijn. Ook in ingedampd leidingwater waren deze 3 elementen spectrographisch terug te vinden.

Op mijn verzoek was de firma ZEISS te Jena zoo vriendelijk, eveneens een spectrographische analyse te maken. Zooals genoemde firma mij later berichtte, was zij tot dezelfde gevolgtrekkingen gekomen als ik. Behalve het zout pro-analysi en het ruwe zout had ik de firma ZEISS ook een monster z.g.n. vacuumzout toegezonden, dat mij welwillend door Ir. J. G. HOOGLAND van de N.V. Koninklijke Nederlandsche Zoutindustrie te Boekelo ter beschikking was gesteld. In dit zout, waarvan ik reeds had vastgesteld, dat het voor de nitratie ongunstig was, ontbraken eveneens Mg, Ca en Sr.

§ 3. PROEFNEMINGEN, WELKE DE ONONTBEERLIJKHEID VAN HET CALCIUM VOOR DE OPTIMALE ONTWIKKELING VAN DE NITRITERENDE BACTERIËN AANTOONEN.

De vraag rees nu, in hoeverre de groeibevorderende werking van het ruwe zout zich inderdaad zou laten terugbrengen tot de aanwezigheid van één of meer der drie genoemde elementen in dit zout.

Voor het magnesium was dit reeds dadelijk uitgesloten, daar het bij alle voorafgaande proefnemingen gebruikte medium van WINOGRADSKY niet minder dan 1% magnesiumcarbonaat bevat. Het was dus nu aangewezen, nader te onderzoeken, in hoeverre calcium en strontium, hetzij alleen, dan wel tezamen, in staat zouden zijn, het voor het zuivere zout geconstateerde tekort op te heffen.

Daar het intusschen nog niet uitgesloten leek, dat hiernaast ook sporen van andere elementen nog invloed zouden uitoefenen, is in de eerstvolgende proefreeks ook daaraan nog eenige aandacht geschonken. Het resultaat van deze reeks is weergegeven in Tabel IX, waarnaar ook voor de gebruikte toevoegingen wordt verwezen.

Overziet men de in Tabel IX weergegeven uitkomsten, dan treft in de eerste plaats de niet-bevredigende overeenstemming tusschen de beide reeksen van duplo-proefnemingen. Toch zijn er in het bijzonder in de 1ste kolom onmiskenbare aanwijzingen te



TABEL IX.

*Invloed van de toevoeging van verschillende zouten, in het bijzonder van strontium- en calciumzouten, op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen	Ammoniakreactie (na 11 dagen)		Nitrietreactie (na 11 dagen)		Ammoniak- reactie (na 15 dagen)	
	1	2	1	2	1	2
INaCl pro analysi . . . . .	+++	+++	+	+	++	++
II " " " + 0,03 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	+++	±	+	+++	±	—
III " " " + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	+++	±	+	+++	±	—
IV " " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	++	—	++	++++	—	—
V " " " + 1 mg CaSiO <sub>3</sub> + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	—	±	++++	++++	—	—
VI " " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0,001 mg CuSO <sub>4</sub> + 0,001 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,001 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . . . . .	+	—	+++	++++	—	—
VII " " " + 1 mg CaSiO <sub>3</sub> + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0,001 mg CuSO <sub>4</sub> + 0,001 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,001 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . . . . .	+	±	+++	++++	—	—
VIII " " " + 0,001 mg Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .	+++	±	+	++++	±	—
IX " " " + 0,001 mg La (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .	+++	±	+	++++	±	—
X " " " + 1 mg CaSiO <sub>3</sub> + 0,3 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0,001 mg CuSO <sub>4</sub> + 0,001 mg ZnSO <sub>4</sub> + 0,001 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> + 0,001 mg Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> + 0,001 mg La (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .	++	±	+++	++++	—	—
XI " " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Sr (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	++	—	+++	++++	—	—
XII ruw NaCl . . . . .	—	—	++++	++++	—	—

vinden, dat de gemeenschappelijke toevoeging van Ca en Sr de nitritatiesnelheid verhoogt, terwijl anderzijds weer overtuigend blijkt, dat geen der andere toegevoegde elementen een bevorderende werking heeft.

Ook uit andere proefreeksen, welke hier niet in bijzonderheden zullen worden weergegeven, kon van een bevorderende werking van elementen als Ba, Mn, Cu, Zn, Mo, Ti en La niets worden geconstateerd. Om deze reden is bij de verdere proefnemingen de toevoeging van deze elementen achterwege gelaten en alle aandacht op het calcium en strontium geconcentreerd.

Met de eerstvolgende proeven had ik weinig succes, omdat de nitritatie nu in alle kolfjes te snel ging om behoorlijke verschillen op te leveren. Waarom de cultures nu in de kolfjes met zouten pro analysi bijna even snel nitriteerden als in die met ruw zout, is niet met zekerheid te zeggen. Mogelijk moet dit worden toegeschreven aan het feit, dat de kolfjes voor deze proeven steeds werden geënt uit de kolfjes met zout pro analysi uit de voorafgaande proef. Het is dus niet onmogelijk, dat door deze voortgezette cultuur in dit medium de bacteriën zich langzamerhand aan het zout pro analysi hebben aangepast. Daarentegen bleken cultures, welke nog geen zout p.a. hadden gehad, daarin steeds slecht te nitriteeren. Om deze reden werden bij de verdere proeven voor de enting steeds cultures in media, welke ruw zout bevatten, gebruikt. Daarbij was het dan noodzakelijk, speciale maatregelen te nemen om de enting zwak te houden, teneinde niet teveel van de verontreinigende elementen van het ruwe zout over te brengen. Maar anderzijds is het vanzelfsprekend van het grootste belang, dat de enting in alle kolfjes zoo gelijkmatig mogelijk geschiedt. Om deze redenen werden steeds 10 cc van een cultuur uit leidingwater met ruw zout gemengd met 90 cc van het steriele cultuurmedium, waarvoor gedestilleerd water en zuiver natriumchloride was gebruikt. Met 1 cc uit dit kolfje werden dan de kolfjes van de eigenlijke proevenreeks geënt.

In de volgende proevenreeks, waarvan de uitkomsten in Tabel X zijn weergegeven, werd in het bijzonder de invloed van toenemende toevoegingen van strontiumchloride, al dan niet tezamen met calciumchloride, nagegaan.





Daarom leek het mij beter, het strontium als carbonaat neer te slaan en dit met water goed uit te wasschen. Aan een oplossing van strontiumchloride werd soda toegevoegd, totdat de oplossing zwak alkalisch reageerde. Na affiltreeren werd het neerslag uitgewasschen en het filtraat ingedampt, zoodat het gevormde keukenzout uitkristalliseerde. Ook dit keukenzout werd in de volgende proefreeks opgenomen.

Uit deze proef, waarvan de uitkomsten in Tabel XI zijn weerge-

TABEL XI.

*Invloed van de toevoeging van ruw strontiumchloride, resp. zuiver strontiumcarbonaat, op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen.	Nitrietreactie (na 7 dagen)		Ammoniakreactie (na 10 dagen)	
	1	2	1	2
I zout pro analysi . . . . .	+	++	++	—
II ged. H <sub>2</sub> O + ruw zout . . . . .	++	++	—	—
III leidingwater + ruw zout . . . . .	++	++	—	—
IV ged. H <sub>2</sub> O + zout pro analysi + 10 mg SrCO <sub>3</sub> . .	+±	+±	+	++
V " " + " " " + 100 mg SrCO <sub>3</sub> . .	+	+	++	+++
VI " " + " " " + 10 mg NaCl uit SrCl <sub>2</sub> . . . . .	+	+	++	+++
VII " " + 100 mg NaCl uit SrCl <sub>2</sub> . . . . .	++	++	—	++
VIII " " + zout pro analysi + 1 cc waschwater v. SrCO <sub>3</sub> . . . . .	+++	+++	—	—
IX " " + " " " + 100 mg ruw SrCl <sub>2</sub>	++++	++++	—	—
X " " + " " " + 100 mg ruw SrCl <sub>2</sub>	++++	++++	—	—
XI " " + " " " + 100 mg ruw SrCl <sub>2</sub> (niet geënt). . . .	—	—	++++	++++

geven, blijkt ook weer overtuigend, dat van een groote hoeveelheid van het ruwe strontiumchloride een zeer gunstige werking uitgaat. Daarentegen moeten wij constateeren, dat toevoeging van het zuivere strontiumcarbonaat niet het minste effect heeft. Wat het uit het strontiumchloride bereide keukenzout betreft, is het resultaat onzeker, omdat een der duplo's uitvalt; het waschwater van het bereide strontiumcarbonaat werkt evenwel onmiskenbaar versnellend.

De niet geënte proef met 100 mg strontiumchloride werd er aan toegevoegd om te laten zien, dat de gunstige werking niet het gevolg



is van een zuiver chemische katalytische versnelling van de ammoniakoxydatie door dit zout.

Dezelfde proef werd nog eens herhaald.

TABEL XII.

*Invloed van de toevoeging van ruw strontiumchloride, resp. zuiver strontiumcarbonaat, op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen	Nitriet-reactie (na 14 dagen)		Ammoniak-reactie (na 17 dagen)		Nitriet-reactie (na 17 dagen)	
	1	2	1	2	1	2
zout pro analysi . . . . .	+	+	+++	+++	+	+
" " " + 100 mg SrCO <sub>3</sub> (uitgewaschen) . . . . .	+	+	+++	+++	+	+
" " " + 100 mg NaCl uit SrCl <sub>2</sub> . . . . .	+	+	+++	+++	+	+
" " " + 100 mg NaCl (uit SrCl <sub>2</sub> ) + 0,1 mg SrCl <sub>2</sub> . . . . .	+	+	+	+++	+++	+
" " " + 100 mg ruw SrCl <sub>2</sub> . . . . .	++	++	—	—	++++	++++
" " " + 0,1 mg SrCl <sub>2</sub> + 1 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	++	+++	±	—	++++	++++
leidingwater + ruw zout. . . . .	+++	+++	±	±	++++	++++

Ook uit Tabel XII blijkt duidelijk, dat van een zuiver strontiumzout geenerlei gunstige werking uitgaat, doch dat de toevoeging van 1 mg calciumchloride wel een gunstig effect heeft. Dit maakt het nu wel zeer waarschijnlijk, dat de gunstige werking van een groote hoeveelheid van het niet gezuiverde strontiumchloride te danken is aan het feit, dat hierin calcium aanwezig is.

Nu zagen wij reeds eerder, dat een toevoeging van 0,01 mg calciumchloride geen invloed had op de nitritatiesnelheid. Aangezien eerst een wat grootere hoeveelheid calciumchloride de nitritatie versnelt, wordt het waarschijnlijk, dat het bij het calcium gaat om een ionenevenwicht in het medium. Om dit na te gaan was het dus gewenscht, nog eens proeven te doen met verschillende hoeveelheden calciumchloride ook zonder toevoeging van strontiumchloride.

Uit Tabel XIII blijkt heel duidelijk, dat alleen calciumchloride in een hoeveelheid van minstens 1 mg per Liter een gunstigen in-

vloed heeft op de nitritatiesnelheid en dat het strontiumchloride geheel overbodig is. In Tabel XIII werd in twee gevallen in plaats van calciumchloride calciumcarbonaat toegevoegd, omdat mij hiervan een zeer zuiver praeparaat ter beschikking stond, zoodat dus

TABEL XIII.

*Invloed van de toevoeging van strontiumchloride en toenemende hoeveelheden calciumchloride op de snelheid van nitritatie in het standaardmedium.*

Aard der toevoegingen	Nitrietreactie (na 14 dagen)	
	1	2
zout pro analysi . . . . .	±	±
” ” ” + 0,1 mg SrCl <sub>2</sub> . . . . .	±	±
” ” ” + 0,1 mg SrCl <sub>2</sub> + 1 mg CaCl <sub>2</sub> .	+ + + +	+ + + +
” ” ” + 0,1 mg SrCl <sub>2</sub> + 1 mg CaCO <sub>3</sub>	+ + + +	+ + + +
” ” ” + 0,001 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	±	±
” ” ” + 0,01 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	±	±
” ” ” + 0,1 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	±	±
” ” ” + 1 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	+ + + +	+ + + +
” ” ” + 1 mg CaCO <sub>3</sub> . . . . .	+ + + +	+ + + +
leidingwater + ruw zout . . . . .	+ + + +	+ + + +

kon worden uitgemaakt, of de gunstige invloed werkelijk van het calcium uitging of dat eventueel nog in het calciumchloride aanwezige verontreinigingen hiervoor verantwoordelijk waren. Daar ook het carbonaat gunstig werkte, mogen wij dus besluiten, dat inderdaad calcium de gunstige factor is.

Het blijft uiteraard de vraag, waarop de bevorderende werking van het calcium is terug te voeren. Eenerzijds is het denkbaar, dat men hier heeft te maken met een absolute behoefte van de cellen van *Nitrosomonas* aan dit element. Tegen deze voorstelling pleit nu evenwel dadelijk de omstandigheid, dat het bij alle in het voorafgaande medegedeelde proefnemingen nagenoeg steeds gaat om snelheidsverschillen in de nitritatie. In de proefnemingen, waarin het calcium was weggelaten, treedt meestal — zij het dan ook doorgaans met aanmerkelijke vertraging — op den duur toch een volledige nitritatie van het toegevoegde ammoniumsulfaat in. Slechts in die gevallen, waarin zeer zwak wordt geënt, zooals bijv. bij afenting van een afzonderlijke kolonie of van één enkele cel,



leiden de niet-optimale voorwaarden in het cultuurmedium tot een volledige remming van de ontwikkeling der nitriteerende bacteriën.

Wanneer men deze situatie in aanmerking neemt, dan wordt een tweede verklaring van den gunstigen invloed van een toevoeging van calcium aan het door WINOGRADSKY voorgeschreven medium veel waarschijnlijker, namelijk, dat dit element van belang is voor de in dit medium optredende ionenevenwichten. In het bijzonder denkt men dan aan het, juist ook in de laatste jaren bij verschillende celsoorten aan het licht getreden, antagonisme tusschen de elementen calcium en magnesium <sup>1)</sup>. In het bijzonder, omdat in alle gebruikte cultuurmedia magnesiumcarbonaat steeds in groote hoeveelheid (1%) — zij het dan ook grootendeels in onopgelosten toestand — voorkomt, bestaat er alle aanleiding om ook hier aan een mogelijke antagonistische werking der magnesium- en calciumionen te denken.

Over de beteekenis van het bedoelde antagonisme voor de ontwikkeling van micro-organismen is nog vrij kort geleden een overzicht gegeven door RIPPEL en STOESS <sup>2)</sup>, waarnaar hier moge worden verwezen. Uit verschillende van de aldaar genoemde vroegere onderzoekingen, alsmede uit eenige der door beide Duitsche onderzoekers zelf verrichte proefnemingen blijkt nu onmiskenbaar, dat calcium den groei van diverse bacteriën en schimmels zeer bevordert, wanneer de concentratie van magnesium in het medium een bepaalde waarde te boven gaat. RIPPEL en STOESS meenen dit antagonisme te moeten terugvoeren op de „entquellende” werking van het calcium tegenover de „aufquellende” werking van het magnesium op het bacteriënprotoplasma.

Om nu het antagonistische karakter van de bevorderlijke werking van calcium op de ontwikkeling der nitriteerende bacteriën aan te toonen, zou het aangewezen zijn geweest, zoodanige maatregelen te nemen, dat de concentratie van de magnesiumionen in het cultuurmedium werd gewijzigd en na te gaan, of dan in dit geval ook andere concentraties van calcium voor een optimale ontwikkelingsnelheid der bacteriën werden vereischt. Ik heb dan ook eenige

---

<sup>1)</sup> Behalve naar het hieronder genoemde geval van Ca-Mg-antagonisme bij micro-organismen, zij hier nog verwezen naar het door BAAS BECKING bestudeerde geval van *Artemia salina* (Journ. of Gen. Physiology 14, 753, 1931; *ibid.* 14, 765, 1931) en naar den door SJOLLEMA en SEEKLES onderzochten invloed van Ca en Mg op de hartwerking van het rund (Zie bijv.: Acta Brevia Neerlandica I, 1, 1931).

<sup>2)</sup> A. RIPPEL und U. STOESS, Archiv f. Mikrobiol. 3, 492, 1932.



uitgebreide proefnemingsreeksen ingesteld teneinde na te gaan, of het calcium voor optimale ontwikkeling evenzeer onmisbaar is, wanneer ik bij de samenstelling van het gebruikelijke cultuurmedium daaruit het magnesiumsulfaat weglief.

Deze proefnemingen hadden evenwel een wisselend resultaat; somtijds scheen het, of in het nieuwe medium het calcium inderdaad kon worden gemist, in andere gevallen daarentegen werd het bekende gunstige effect van calcium weer teruggevonden. Achteraf beschouwd kan dit resultaat nauwelijks verwonderen. Men moet nl. bij dit alles in het oog houden, dat bij deze proefnemingen toch steeds magnesiumcarbonaat in overmaat in de media aanwezig was. Nu is het onmogelijk om voor het gebruikte, relatief zeer samengestelde medium nauwkeurige berekeningen omtrent de grootte der magnesiumionenconcentratie te geven. In dit opzicht hebben de aanwezige ammonium-, fosphaat- en hydroxylionen e.a. ongetwijfeld teveel invloed. Intusschen is het in dit verband goed, er op te wijzen, dat de magnesiumionenconcentratie, welke zou resulteren uit de toevoeging van de door WINOGRADSKY aanbevolen 0,05% magnesiumsulfaat van dezelfde orde van grootte is als die, welke in het medium zonder magnesiumsulfaattoevoeging aanwezig is op grond van het oplosbaarheidsproduct van het magnesiumcarbonaat.

Alhoewel zich niet laat overzien, wat precies de invloed zal zijn van de magnesiumsulfaattoevoeging op de uiteindelijke magnesiumionenconcentratie in het medium, kan men wel met groote zekerheid zeggen, dat deze invloed gering zal zijn. Daarbij blijkt het dan alleszins denkbaar, dat kleine verschuivingen in de hydroxylionen-, resp. in de fosphaationenconcentratie in bedoeld opzicht van meer beteekenis zullen zijn en ik meen dan ook, hieraan de ongelijkmatigheid in de verkregen uitkomsten te mogen toeschrijven.

De eenige mogelijkheid om het bestaan van een calcium-magnesium-antagonisme bij de nitriteerende bacteriën nader te toetsen, leek mij dan ook gelegen in het weglaten van het magnesiumcarbonaat uit het medium. Dit is echter alleen dan mogelijk, wanneer men, met het oog op de onmisbaar neutraliseerende werking, dit carbonaat door een ander onoplosbaar carbonaat vervangt. In verband met het geleidelijk in oplossing gaan der kationen gedurende het nitritatieproces kwam hiervoor eigenlijk alleen calciumcarbonaat in aanmerking.



Met het medium met calciumcarbonaat had ik inmiddels al eenige ervaring opgedaan. Om uit min of meer zure gronden nitrificerende bacteriën op te hoopen is het aangewezen, een cultuurvloei-stof te gebruiken, welke niet te alkalisch is. Daarom is in dit geval een medium met calciumcarbonaat beter dan een met magnesiumcarbonaat. Daar volgens WINOGRADSKY de nitritatie met calciumcarbonaat maar weinig langzamer gaat dan met magnesiumcarbonaat, meende ik dat het voldoende zou zijn, in het steeds door mij gebruikte medium het magnesiumcarbonaat door calciumcarbonaat te vervangen. Dit bleek niet het geval te zijn. In het begin ging de nitritatie in dit medium zeer langzaam of in het geheel niet. Een kleine verbetering kreeg ik door niet 0,1%, maar 0,05% ammoniumsulfaat toe te voegen. Ten slotte bleek, dat de nitritatie zeer veel sneller ging, wanneer uit het medium met 0,05% ammoniumsulfaat ook nog de gebruikelijke toevoeging van 0,05% magnesiumsulfaat achterwege werd gelaten. Bovendien verving ik later het gebruikelijke  $K_2HPO_4$  door  $KH_2PO_4$ . De nitritatie ging in dit aldus samengestelde medium nog wel langzamer dan in de oplossingen met magnesiumcarbonaat, maar de overentingen gelukten toch steeds, zoodat ook hierin de nitriteerende bacteriën goed kunnen worden aangehouden. Maakt men nu aan de hand van de oplosbaarheidsproducten een berekening, dan blijkt, dat in een oplossing met calciumcarbonaat en 0,05% magnesiumsulfaat de Mg-ionenconcentratie hooger is dan in een oplossing van magnesiumcarbonaat met 0,05% magnesiumsulfaat. Deze berekening is weliswaar niet nauwkeurig, maar men kan er toch wel aan ontleenen, in welk geval de magnesiumionenconcentratie het grootst zal zijn.

Wanneer het magnesiumion dus een remmende werking zou hebben op de nitritatiesnelheid, is het dus verklaarbaar, dat de toevoeging van 0,05% magnesiumsulfaat aan een oplossing met calciumcarbonaat een grooten invloed heeft en dat de invloed van een dergelijke toevoeging aan een oplossing met magnesiumcarbonaat nauwelijks merkbaar is.

Uit een soortgelijke berekening voor de calciumionenconcentratie volgt, dat ook deze concentratie in het medium met calciumcarbonaat grooter zou zijn dan in dat met magnesiumcarbonaat. Zelfs zou de calciumionenconcentratie meer toenemen dan die van de magnesiumionen.

Dit behoeft echter nog niet te pleiten tegen de opvatting, dat de



gunstige invloed van het calciumion bij aanwezigheid van magnesiumcarbonaat is toe te schrijven aan zijn antagonistische eigenschappen. Men moet toch in het oog houden, dat de pH in beide media niet hetzelfde is en het is denkbaar, dat de remmende invloed van het magnesiumion bij dalende pH zoo sterk toeneemt, of dat de gunstige werking van het calciumion zoo sterk achteruitgaat, dat het magnesiumion in de media met lage pH alleen in zeer kleine concentratie aanwezig mag zijn. Ten slotte moet er nog op worden gewezen, dat aan het medium met calciumcarbonaat de helft minder kalium was toegevoegd dan aan dat met magnesiumcarbonaat. Het is nu lang niet onwaarschijnlijk, dat ook dit invloed heeft op de werking van het calcium- en het magnesiumion. De litteratuur over het ionen-antagonisme vermeldt toch talrijke gegevens, waaruit de groote invloed van andere ionen op het antagonisme van een tweetal beschouwde ionensoorten onmiskenbaar blijkt <sup>1)</sup>.

Hoe dit alles ook zijn moge, in ieder geval is afdoende gebleken, dat van het calciumion bij aanwezigheid van magnesiumcarbonaat een gunstige werking uitgaat. Verder hebben de voorafgaande proefnemingen duidelijk laten zien, dat het tenslotte van kleinigheden afhangt, of de nitrificatie in synthetische media een vlot verloop zal hebben of niet. Vooral bij zwakke entingen is de juiste samenstelling van het medium van zeer veel belang. Wanneer men *Nitrosomonas* in reïncultuur wil brengen, is het noodzakelijk, dat het medium, waarin men de koloniën van de kiezelzuurplaten wil enten, de optimale samenstelling heeft. Uit dit alles volgt wel, dat het niet is te verwonderen, dat zoovele onderzoekers er niet in zijn geslaagd, reïncultures van *Nitrosomonas* te verkrijgen. Aan deze kwestie heeft, voor zoover mij bekend, alleen MURRAY speciaal aandacht geschonken. In Hoofdstuk I zagen wij, dat deze onderzoeker meende, dat de nitrificerende bacteriën vitamines behoeften, maar dat zijn, ter toetsing van deze veronderstelling verrichte, proeven niet het minste succes hadden. In de verhandeling van 1933 van WINOGRADSKY kan men merken, dat ook deze onderzoeker niet geheel tevreden is met de media volgens het vroeger door hem gegeven recept. Aan het oude recept heeft WINOGRADSKY nl. toegevoegd zouten van mangaan, zink, molybdeen, titaan en aluminium. Zijn ontevreden-

---

<sup>1)</sup> Vergel. bijv.: E. GELLHORN, Lehrbuch der Allgemeinen Physiologie, Leipzig, 1931, p. 52 e.v.



heid blijkt ook nog uit de volgende zinsnede op pag. 398: „Au lieu d'eau distillée, on prend de l'eau du robinet, une eau de source, non seulement à cause de son pH plus élevé que celui de l'eau distillée de laboratoire, mais à cause de traces de substances minérales diverses qu'elle contient et qui pourraient favoriser en doses infinitésimales le processus microbien.”

Dat de gunstige invloed van het leidingwater niet aan de aanwezigheid van elementen als mangaan enz. is te danken, is wel duidelijk uit mijn proeven gebleken. Het eenige element, dat een goed merkbaar versnellende werking op de nitritatiesnelheid heeft, bleek calcium te zijn.

Intusschen mag niet worden nagelaten, er op te wijzen, dat bij vele proeven duidelijk bleek, dat het medium met calcium nog altijd iets achterbleef bij dat, waarin leidingwater met ruw zout was gebruikt. Aangezien geen enkele der toegevoegde elementen een verbetering teweegbracht en het verder niet waarschijnlijk leek, dat het gebruik van leidingwater en ruw zout veel aan de ionenevenwichten zou veranderen, omdat deze toch hoofdzakelijk door de OH-ionen en de  $\text{CO}_3$ -ionen worden bepaald, lijkt mij de eenige mogelijkheid, dat de gunstige werking van het leidingwater voor een deel moet zijn toe te schrijven aan de geringe hoeveelheid organische stof, welke dit water bevat. Voor deze opvatting pleiten in het bijzonder ook mijn in hoofdstuk V weergegeven waarnemingen, waaruit de gunstige invloed van verschillende organische stoffen op de ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën duidelijk blijkt.

---

## HOOFDSTUK V.

### DE INVLOED VAN DE ORGANISCHE STOF OP DE ADEMHALING EN OP DE VERMEERDERING VAN DE NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

#### § 1. INLEIDENDE OPMERKINGEN.

Zoals ook in Hoofdstuk I reeds ter sprake is gekomen, zijn de betrekkingen van de nitrificeerende bacteriën tot de organische stof van zeer bijzonderen aard. Want niet alleen dat deze bacteriën, in tegenstelling met de overgrootte meerderheid van alle levende cellen, ook voor den opbouw van hare celsubstantie geen organische stof behoeven, zelfs heerscht sinds de klassieke onderzoekingen van WINOGRADSKY het algemeene inzicht, dat zeer uiteenloopende organische stoffen het nitrificatieproces hoogst ongunstig beïnvloeden en zelfs veelal volledig remmen. Dit inzicht vindt zijn voornaamsten steun in uitspraken als de volgende, welke aan WINOGRADSKY'S in 1906 verschenen samenvattende verhandeling is ontleend: „ . . . dass organische Substanzen gar keine günstige Wirkung auf die Nitritation in Reinzucht ausüben. Und nicht nur das, sondern es wird durch die Anwesenheit gerade der besten der „organischen Nährstoffe“ die Entwicklung des Nitritbildners schon bei geringen Konzentrationen gehemmt, bzw. gänzlich aufgehoben”.<sup>1)</sup>

Dat deze meening ook in latere jaren geen wijziging heeft ondergaan, blijkt bijv. uit de recente uitspraak van RIPPEL: „Gegen organische Stoffe sind sie z.T. ausserordentlich empfindlich; das war auch der Grund, weshalb ihre Züchtung erst verhältnismässig spät gelang, obwohl der Vorgang schon erheblich länger bekannt war.”<sup>2)</sup> En dat ook WINOGRADSKY tot op heden zijn inzicht aangaande dit punt niet heeft gewijzigd, blijkt uit zijn laatste verhandeling, waarin hij zijn eerder ingenomen standpunt nog volledig handhaaft.

Tegenover het door LÖHNIS<sup>3)</sup> — en, zoals hier moge worden

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY: In F. LAFAR, Handb. d. Techn. Mykol. III, 166, 1906.

<sup>2)</sup> A. RIPPEL, Vorlesungen über Bodenmikrobiologie, Berlin, 1933, p. 81.

<sup>3)</sup> F. LÖHNIS, Centralbl. f. Bakt. II, 13, 706, 1906.



opgemerkt, reeds eerder ook door VAN ITERSON <sup>1)</sup> — ingenomen standpunt, dat de onderlinge verhouding van nitrificatie en denitrificatie in den bodem wordt beheerscht door de mate van aëratie, stelt WINOGRADSKY namelijk de volgende uitspraak: „... c'est l'intolérance des deux microbes spécifiques envers les substances organiques qui retarde leur activité jusqu'à la dégradation de ces substances, quand le milieu devient inapte à la pullulation des dénitrificateurs; à cette intolérance commune s'ajoute la sensibilité du microbe de la nitrata-tion envers les ions  $\text{NH}_4$ , ce qui retarde encore son ingérence en la reléguant au tout dernier tour dans la série des phénomènes qui composent l'épuration <sup>2)</sup>”.

Ook volgt zijn ongewijzigd standpunt nog uit het feit, dat hij aan zijn, reeds op pag. 112 vermelde, aanbeveling van het gebruik van leidingwater, de opmerking toevoegt, dat de daarin aanwezige organische stoffen geen bezwaren opleveren, daar het hierbij slechts om sporen gaat.

Anderzijds merkt men bij de bestudeering van de litteratuur op, dat vele onderzoekers het feitelijk onverklaarbaar achten, dat de voor organische stoffen zoo gevoelige nitrificeerende bacteriën toch nog zulk een groote activiteit kunnen ontwikkelen in gronden, welke relatief rijk zijn aan dergelijke verbindingen.

Hiertegenover wijst WINOGRADSKY er echter op, dat deze gevoeligheid voor organische stof juist een gunstige eigenschap is van de nitrificeerende bacteriën. De organische stof toch maakt de ontwikkeling der denitrificeerende bacteriën mogelijk en wanneer nu de organische stof de nitrificatie niet remde, dan zouden de stikstofverliezen ten gevolge van de denitrificatie veel grooter zijn dan nu het geval is.

Wij zagen verder reeds in hoofdstuk I, dat OMELIANSKY <sup>3)</sup> heeft laten zien, dat ook in media, waarin organische stof aanwezig is, toch nitrificatie plaats had, wanneer men reïncultures der nitrifi-ceerende bacteriën mengt met reïncultures van passende heterotrophe bacteriën.

Het belangrijkste argument, dat door WINOGRADSKY in het beschouwde verband steeds naar voren is gebracht, is evenwel, dat de

<sup>1)</sup> G. VAN ITERSON JR. Versl. Kon. Akad. v. Wet. 11, 807, 1902.

<sup>2)</sup> S. WINOGRADSKY, Ann. de l'Inst. Pasteur 50, 364, 1933.

<sup>3)</sup> W. OMELIANSKY, Centralbl. f. Bakt. II, 5, 473, 1899.

organische verbindingen wel de *vermeerdering* der nitrificerende bacteriën remmen, maar dat hierdoor de *oxydeerende werking* van een éénmaal aanwezige populatie weinig wordt beïnvloed.

Dit alles neemt echter niet weg, dat er vooral in de kringen der landbouw-microbiologen steeds verzet tegen de leer der algemeene schadelijkheid van organische stoffen voor de nitrificerende bacteriën is blijven bestaan.

Daarbij komt dan nog, dat men ook op grond van algemeen physiologische overwegingen vele malen bezwaren heeft geopperd. Zoo schrijft bijv. BARRITT in zijn recente publicatie: „It is unlikely, that substances like peptone, asparagine and dextrose, which are products of organic metabolism, would be toxic to any type of bacteria. Their action in depressing nitrification is more easily explicable being due to the growth of heterotrophic bacteria, present in the cultures”<sup>1)</sup>. Hoe BARRITT evenwel het tweede deel van deze uitspraak kan handhaven tegenover de ondubbelzinnige uitkomsten, welke door WINOGRADSKY en OMELIANSKY bij hunne met reïncultures verrichte proefnemingen zijn verkregen, wordt door genoemden onderzoeker niet nader toegelicht.

Het behoeft dan ook niet te verwonderen, dat er in den loop der tijden wel eenige onderzoekers zijn geweest, die rapporteerden, dat organische stoffen in sommige gevallen de nitrificatie kunnen begunstigen. In hoofdstuk I werd er reeds melding van gemaakt, dat MAKRINOV had gevonden, dat humusstoffen zulk een gunstigen invloed hebben op de nitrificatie. Tevens kan er op worden gewezen, dat dit een betrouwbaar onderzoek moet zijn geweest, daar de photo's van de cultures van MAKRINOV door OMELIANSKY zijn gemaakt. Door WINOGRADSKY is echter nooit melding gemaakt van deze publicatie. De meeste onderzoekingen, waarbij een gunstige werking van organische stoffen werd vastgesteld, hadden betrekking op het verloop van de nitrificatie in den bodem, hetgeen uiteraard niets leert over het gedrag van organische stof ten opzichte van de nitrificerende bacteriën zelf.

Oorspronkelijk lag het geenszins in mijn bedoeling, zelf nog proefnemingen aangaande deze kwestie, waarvan de grondslagen voldoende door de genoemde onderzoekingen van WINOGRADSKY en OMELIANSKY en verder door die van MEYERHOF schenen gelegd, te

<sup>1)</sup> N. W. BARRITT, The Annals of Applied Biology 20, 165, 1933.



verrichten. Geleidelijk heb ik echter toch tot een nader onderzoek moeten besluiten. De directe aanleiding hiertoe was evenwel van toevalligen aard: de door FRED en DAVENPORT <sup>1)</sup> vermelde waarneming, dat *Nitrobacter* zich voorspoedig op Nährstoff-Heyden-agar ontwikkelde, kwam mij dermate onwaarschijnlijk voor, dat ik besloot, deze proeven te herhalen. Ofschoon nu inderdaad bleek, dat ik deze uitkomst niet kon bevestigen, kwam bij deze proefnemingen aan het licht, dat Nährstoff-Heyden toch een onmiskenbaar gunstigen invloed uitoefende op de ontwikkeling van *Nitrobacter*, indien dit organische praeparaat aan het gebruikelijke medium, waarin dus nitriet aanwezig is, werd toegevoegd. Het feit, dat ik hier dus een organische stof met voor *Nitrobacter* gunstige eigenschappen had gevonden, leidde er nu vanzelf toe, te trachten, deze eigenschappen te contrasteeren met die van andere organische stoffen, welker nadeelige werking op grond van de in de litteratuur aanwezige gegevens buiten twijfel scheen te staan.

Een en ander noopte mij, aan het onderzoek een aanvankelijk ongedachte uitbreiding te geven; de daarbij verkregen uitkomsten werpen op sommige punten een nieuw licht op de beschouwde kwestie.

#### § 2. OVER DEN INVLOED VAN NÄHRSTOFF-HEYDEN OP DE VERMEERDERING DER NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

In Hoofdstuk II werd reeds medegedeeld, dat van een gunstigen invloed van tuingrondextract, gistautolysaat enz. op de ontwikkeling der door mij geïsoleerde reïncultures niets was te bemerken. Ook was het mij vroeger nooit gelukt, nitritatie op met uitgewasschen agar bereide platen te krijgen, wanneer daar ruwcultures op werden afgestroken. Ik stond om deze redenen dan ook in het algemeen zeer sceptisch tegenover die publicaties, waarin een gunstige invloed van organische stof op de nitrificatie werd gerapporteerd. Onder deze publicaties had die van FRED en DAVENPORT mijn aandacht getrokken. Deze onderzoekers hadden een gunstigen invloed van Nährstoff-Heyden <sup>2)</sup> op de nitratatie geconstateerd; zij gingen zelfs

<sup>1)</sup> E. B. FRED and A. DAVENPORT, Soil Science 11, 389, 1921.

<sup>2)</sup> Nährstoff-Heyden is een oorspronkelijk voor de menschelijke voeding aanbevolen praeparaat, dat in de bacteriologie veelal toepassing vindt voor de bereiding van voedingsmedia, waarin het dan in de plaats van pepton komt. Volgens: J. KLEEBERG und H. BEHRENDT, Die Nachrpraeparate und Sauermilcharten, Stuttgart, 1930, p. 45 wordt het door afbraak van ei-albumine met zoutzuur verkregen. In het vervolg zal Nährstoff-Heyden hier met Nst.-H. worden aangeduid.



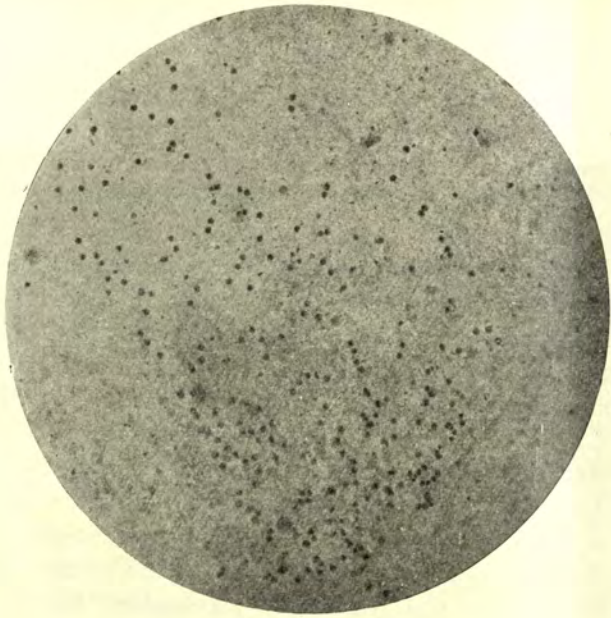
zoo ver, dat zij beweerden, dat *Nitrobacter* op Nährstoff-Heyden-agarplaten ook zonder toevoeging van nitriet kon groeien. Dit laatste kwam mij zeer onwaarschijnlijk voor. Vooral, omdat op de door hen gepubliceerde photo's zeer duidelijk was te zien, dat hun *Nitrobacter*-cultuur nog met *Hyphomicrobium* was verontreinigd, scheen twijfel aangaande deze uitspraak alleszins gewettigd. Toch leek het mij de moeite waard, deze proefnemingen te herhalen, daar wij hier dan toch blijkbaar met organische verbindingen te doen hebben, welke in vrij hooge concentratie de nitratatie nog niet merkbaar remmen.

Daarom bereidde ik 1,5% agarplaten met 0,75% Nährstoff-Heyden<sup>1)</sup>. Tevens liet ik twee oplossingen van WINOGRADSKY steriliseeren, met en zonder nitriet, welke evenwel 10 maal zoo geconcentreerd waren als de gebruikelijke. Van deze oplossingen werd 5 cc bij 50 cc gesmolten Nst.-H.-agar gevoegd. Op deze platen, waarvan dus de eene helft nitriet bevatte en de andere niet, werden reïncultures van *Nitrobacter* afgestreken. Na ongeveer 8 dagen was in de eerstgenoemde platen alle nitriet tot nitraat geoxydeerd en men kon er met het bloote oog duidelijk koloniën op zien. Op de platen zonder nitriet had evenwel niet de minste groei plaats gehad, wat dus mijn vermoeden bevestigde, dat de door FRED en DAVENPORT waargenomen groei op platen zonder nitriet was te wijten aan de aanwezigheid van *Hyphomicrobium* in de door hen gebruikte cultuur. Bij gelijktijdige aanwezigheid van nitriet daarentegen heeft Nst.-H. een onmiskenbaar gunstigen invloed op de ontwikkeling van *Nitrobacter*; de koloniën worden aanmerkelijk grooter. Vergelijk Afb. 25 met de eerder gegeven Afb. 7 en 8. Op de plaat met Nst.-H. worden de koloniën wel 200—500 $\mu$  in diameter tegenover 50 $\mu$  op een leidingwateragarplaat en 10—20 $\mu$  op een kiezelzuurplaat.

Aangemoedigd door dit succes besloot ik, nu ook den invloed van Nst.-H. op de ontwikkeling van *Nitrosomonas* te onderzoeken. Ook hiermede werden op Nst.-H.-agarplaten met ammoniumsulfaat, waaraan tevens 1% magnesiumcarbonaat was toegevoegd, veel grootere koloniën verkregen dan bij afwezigheid van Nst.-H.. Hier groeiden de koloniën onder gunstige voorwaarden zelfs uit tot een

<sup>1)</sup> Het door mij in deze en de verdere proefnemingen gebruikte Nst.-H.-praeparaat was van tamelijk ouden datum. Ik wil hier niet onvermeld laten, dat een later ontvangen zending de verderop in deze paragraaf medegedeelde gunstige werking niet in dezelfde mate bezat als het oude praeparaat.

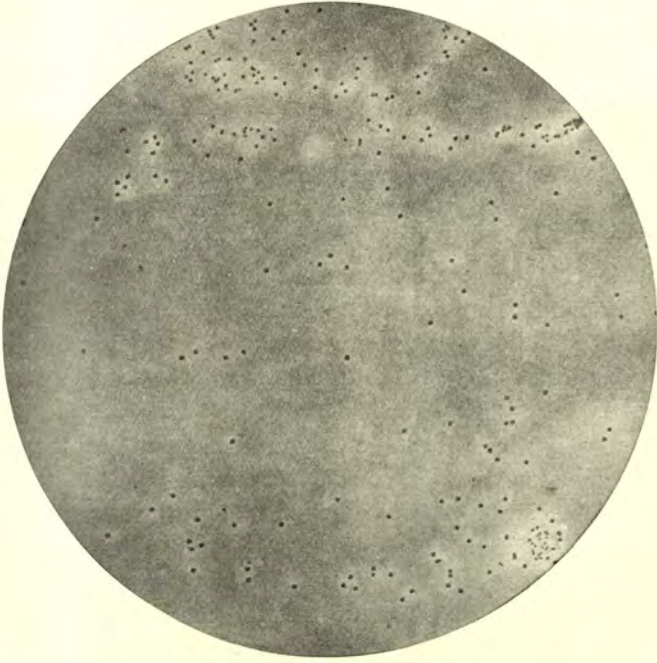




Afb. 25.  
*Nitrobacter*.  
Koloniën op Nst.-H.-nitriet-agar.  
Planar F. 10.  
(Vergr. 3 ×).



Afb. 27.  
*Nitrosomonas*  
Koloniën op Nst.-H.-Amm.-sulfaat-Mg-carbonaat-agar.  
Planar F. 10.  
(Vergr. 3 ×).



Afb. 26.  
*Nitrosomonas*.  
Koloniën op Nst.-H.-Amm.-sulfaat-Mg-carbonaat-agar.  
Protar F. 41.  
(Ware grootte).



Afb. 28.  
*Nitrosomonas*.  
Erythrosine kleuring; „Lifa” groenfilter 373.  
Apochr. N. A. 1.4; proj. oc. (Vergr. 1000 ×).



diameter van 1 mm of meer. De koloniën van *Nitrosomonas* op de Nst.-H.-agarplaten hebben een typische licht roodbruine kleur en zijn vrij stevig samenhangend, zoodat zij zich niet zoo gemakkelijk in een druppel water laten suspendeeren. De koloniën van *Nitrobacter* zijn kleurloos en veel zachter dan die van *Nitrosomonas*. Om de koloniën van *Nitrosomonas* zien wij bovendien een helderen hof, ontstaan doordat het magnesiumcarbonaat in de omgeving der koloniën is opgelost (zie Afb. 26 en 27).

Wanneer men de koloniën suspendeert en afstrijkt, krijgt men precies hetzelfde beeld als dat van de vorige plaat; men houdt één type koloniën, een nader bewijs dus, dat de cultures inderdaad rein zijn. Bovendien kreeg ik nooit eenigen groei, wanneer deze koloniën in peptonwater werden geënt. Ook bleek, dat alle koloniën bij enting in een mineraal milieu nitritatie of nitratatie bewerkten. Op Afb. 28 ziet men het beeld van de bacteriën, afkomstig van een *Nitrosomonas*-plaat met Nst.-H.. Zooals men ziet, hebben deze volkomen dezelfde gedaante als die van Afb. 21, welke afkomstig zijn van een kolonie van deze bacteriesoort op een kiezelzuurplaat.

Toen nu eenmaal was komen vast te staan, dat *Nitrosomonas* wel op leidingwater-agar met alle zouten uit het gebruikelijke cultuurmedium en met Nst.-H. groeide, werd ook nog geprobeerd, of deze bacterie ook op deze platen zonder Nst.-H. wilde groeien. Weliswaar had ik op platen met uitgewasschen agar geen nitritatie gekregen, maar hierop had ik ruwcultures afgestrekten. Inderdaad groeide *Nitrosomonas* op een plaat met leidingwater-agar met de gebruikelijke zouten, maar de groei was veel minder dan op een plaat, waaraan ook Nst.-H. was toegevoegd. Op de eerste plaat bereiken de koloniën gemiddeld een diameter van 50—100 $\mu$ , terwijl op de tweede de gemiddelde afmetingen der koloniën variëren tusschen 200 en 400 $\mu$ . Nst.-H. heeft echter niet alleen grooten invloed op de grootte, maar ook op den levensduur der koloniën. Terwijl de koloniën van een, één maand oude, leidingwater-agarplaat na overenting in het gewone minerale milieu niet weer gaan nitriteeren, doen degene, welke van een plaat met Nst.-H. afkomstig zijn, dit bijna allemaal nog wel.

De zooveel krachtiger ontwikkeling op de Nst.-H.-platen is ook van groote practische beteekenis voor het hanteeren van de rein-cultures. De koloniën kunnen immers, doordat zij zoo groot worden, op de normale wijze met den platinadraad worden afgenomen en

na al of niet suspenderen in steriel water voor verdere entingen worden gebruikt.

Ook voor het aanhouden van de nitrificerende bacteriën is het medium van WINOGRADSKY met 0,5% Nst.-H. en 1,5% agar zeer geschikt. Een belangrijk punt hierbij is, dat men moet overenten op vochtige buizen en dat men er voor moet zorgen, dat de geënte buizen niet te veel uitdrogen. Om het uitdrogen te voorkomen, bleek het mij zeer gunstig te zijn, de buizen niet af te sluiten met wattenproppen, maar met aluminiumdoppen volgens Kapsenberg. In Afb. 29 vindt men een photo van een nog slechts veertien dagen oude buiscultuur van *Nitrosomonas*, waarop duidelijk is te zien, hoe het magnesiumcarbonaat ten gevolge van het bij de oxydatie van ammoniak vrijgekomen zwavelzuur en het ontstane salpeterig zuur is opgelost.

Van een groei van *Nitrosomonas* op Nst.-H. agarplaten, wanneer daaraan geen ammoniumsulfaat is toegevoegd, is ook bij microscopisch onderzoek der platen niets te bespeuren. Wordt *Nitrosomonas* in het normale medium van WINOGRADSKY, waarin het ammoniumsulfaat door Nst.-H. is vervangen, geënt, dan wordt er weliswaar toch wat nitriet gevormd.

Dit bleek een gevolg te zijn van het feit, dat in dit medium met Nst.-H. een kleine hoeveelheid ammoniak aanwezig was. Gevonden werd door destillatie met soda (0,3 g soda op 500 cc vloeistof): 39 mg  $\text{NH}_3/\text{L}$ . Werd het gehalte van het onder den invloed van *Nitrosomonas* gevormde nitriet bepaald en dit omgerekend op  $\text{NH}_3$ , dan werd gevonden, dat er 25 mg  $\text{NH}_3/\text{L}$  moest zijn geoxydeerd. Hieruit blijkt dus, dat de aanvankelijk in het medium aanwezige hoeveelheid vrije ammoniak alleszins voldoende is, om de productie van de gevormde hoeveelheid nitriet te verklaren.



Afb. 29.

*Nitrosomonas*.

Buiscultuur Nst.-H.-Amm.-sulfaat-Mg-carbonaat-agar. (Ware grootte).



De tot nu toe voor deze proeven gebruikte cultures had ik gekregen van koloniën van kiezelzuurplaten. Hoewel er na de verrichte contrôle-proefnemingen feitelijk geen enkele reden was om aan de reinheid van deze cultures te twifelen, kwam het mij toch gewenscht voor, alles nog eens met ééncel-cultures te controleren.

In hoofdstuk III werd reeds beschreven, hoe ik deze ééncel-cultures maakte. In werkelijkheid waren het de proeven met Nst.-H., welke de rechtstreeksche aanleiding waren tot het maken van de ééncel-cultures. De eerder gegeven beschrijving van het aanleggen van ééncel-cultures moet in dit verband nog met het volgende worden aangevuld. Ten eerste werd daar ter plaatse niet vermeld, dat de gebruikte bacteriënsuspensie bestond uit bacteriën van een kolonie van een Nst.-H.-agarplaat. Ten tweede werd niet vermeld, dat de helft van het aantal geënte kolfjes behalve de gebruikelijke cultuurvloeistof ook nog 0,2% Nst.-H. bevatte. Daar Nst.-H. zulk een gunstigen invloed had op de ontwikkeling van *Nitrosomonas*, was het lang niet uitgesloten, dat de enkele cel in de kolfjes met Nst.-H. een grootere kans had om tot ontwikkeling te komen dan in de kolfjes zonder Nst.-H. Om zoo goed mogelijk een indruk te krijgen van den gunstigen invloed van Nst.-H., werden de kolfjes met en zonder Nst.-H. steeds om beurten geënt. Tot mijn verwondering was er evenwel van een gunstigen invloed niets te merken. In de eerste groep, welke werd geïsoleerd, trad in 2 kolfjes met en in 1 kolfje zonder Nst.-H. nitritatie op. In de tweede groep geschiedde dit in 8 kolfjes met, tegen 7 zonder Nst.-H.

Deze ééncel-cultures, afgestreken op Nst.-H.-agarplaten met ammoniumsulfaat, gaven weer precies dezelfde koloniën als die, waarvan ik was uitgegaan, zoodat ik nu zekerheid had gekregen, dat ook de vroegere cultures op Nst.-H.-platen rein waren.

Merkwaardig is dus, dat, terwijl het zeer duidelijk is, dat Nst.-H. op platen een zeer gunstigen invloed heeft — de koloniën worden hiermede immers zooveel grooter — er in vloeistofcultures van een gunstige werking niets te bemerken was geweest.

Later bleek mij echter, dat, indien men aan verzwakte cultures van *Nitrosomonas* Nst.-H. geeft, men ook in vloeistofcultures duidelijk een gunstig effect kan constateeren. Wanneer men reïncultures, vooral wanneer deze afkomstig zijn van één cel, een paar maal heeft overgeënt, dan gaat soms langzaam het nitritatievermogen achteruit, totdat tenslotte de overentingen in het geheel niet meer



op gang komen. Eigenaardig is, dat dit bij een ruwcultuur niet voorkomt. Op deze verzwakte cultures nu heeft Nst.-H. een gunstigen invloed, zooals uit Tabel XIV blijkt.

De proef, waarvan de uitkomsten in Tabel XIV zijn weergegeven, werd gedaan in kolfjes van 300 cc met 50 cc cultuurvloeistof. Alle kolfjes werden geënt uit cultures in een medium zonder Nst.-H., welke uiteindelijk van ééncel-cultures afkomstig waren. Na 20 dagen werden zij overgeënt. Aan de kolfjes, waaruit voor dien tijd de ammoniak was verdwenen, werd tusschentijds niet opnieuw ammoniak toegevoegd. Na 20 dagen werd gedeeltelijk uit kolfjes zonder Nst.-H., gedeeltelijk uit kolfjes met Nst.-H., overgeënt.

Wanneer men nu eerst de bovenste helft van de tabel beschouwt, dan blijkt, dat in alle gevallen, behalve bij 16 NHA, de cultures met Nst.-H. hetzij even snel, hetzij sneller nitriteeren dan die zonder Nst.-H. In 11 A en 1 heeft men een voorbeeld van slechts weinig verzwakte cultures, daar er hier maar 10 dagen voor noodig waren om de ammoniak volledig te oxydeeren, terwijl hiervoor normaal 7 dagen noodig zijn. Van een gunstigen invloed van Nst.-H. blijkt hier niets.

Na het overenten (zie: onderste helft Tabel XIV) gaat de nitritatie slechter; na 12 dagen is de ammoniak nog niet verdwenen, maar nu ziet men ook beter de gunstige werking van Nst.-H. 7NH en 3NHB blijken reeds in den aanvang sterk verzwakt en hierbij is de gunstige werking heel duidelijk, in het bijzonder ook na de overenting, daar dan de cultures zonder Nst.-H. in het geheel niet meer op gang komen. Bij 10 NH is de cultuur na de overenting zoo verzwakt, dat ook met Nst.-H. de nitritatie niet meer op gang komt. 6 B komt na de overenting ook niet meer op gang, maar hiervan bleek, dat de cultuur met Nst.-H. was geïnfecteerd met een heterotrophe bacterie en de ervaring leert, dat dan de nitriteerende bacteriën niet zelden worden onderdrukt.

Bij de onder de horizontale lijn opgenomen cultures, welke zijn overgeënt uit de kolfjes met Nst.-H., ziet men, dat na de overenting de gunstige werking van de Nst.-H. zich nog accentueert, zooals duidelijk blijkt, wanneer men ze vergelijkt met de cultures, welke boven de horizontale lijn zijn opgenomen.

Ter voorkoming van misverstand zij er nadrukkelijk op gewezen, dat de in het voorafgaande beschreven proefnemingen alle geschieden met media, voor de bereiding waarvan ruw keukenzout en



TABEL XIV.

*Invloed van Nährstoff-Heyden op de ontwikkeling van verzwakte cultures van Nitrosomonas.*

Gerea- geerd na:	8 dagen				14 dagen				20 dagen			
	Ammoniak		Nitriet		Ammoniak		Nitriet		Ammoniak		Nitriet	
	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.
11 A	—	—	+++	+++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++
1	—	—	+++	+++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++
7 NH	+++	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	+	++	+++
3 NHB	+++	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	+	++	+++
10 NH	+++	++	+	+	+++	+	++	+++	+++	—	++	++++
6 B	+++	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	—	++	++++
4 NHA	++++	++++	—	—	++++	+++	+	++	+++	—	++	++++
7 A	+++	—	+	+	++	—	+++	++++	++	—	+++	++++
14 NHB	++++	++++	±	±	++++	++++	+	+	+++	++	+	++
16 NHB	+++	—	+	+	++	—	++	++++	++	—	+++	++++
13 NH	+++	++	+	+	+++	—	++	++++	+++	—	++	++++
11 B	+++	++	+	+	+++	—	++	++++	+++	—	++	++++
4 NHC	+++	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	—	++	++++
14	+++	++	+	+	+++	—	++	++++	+++	—	++	++++
16 NHA	—	+++	+	+	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++

TABEL XIV (Vervolg).

Gerea-geerd na:		8 dagen				12 dagen				26 dagen			
Nummer van de cultuur		Ammoniak		Nitriet		Ammoniak		Nitriet		Ammoniak		Nitriet	
		—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.	—Nst.-H.	+Nst.-H.
11 A	over-geënt uit cultures —Nst.-H.	+++	+++	++	++	++	+	+++	++++	+	—	+++	++++
1		+++	++	++	+++	+++	++	++	+++	—	—	++	++++
7 NH		++++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++	—	—	+++
3 NHB		++++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++	—	—	+++
10 NH		++++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++	+	—	—
6 B		++++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++	++	—	—
4 NHA	over-geënt uit cultures +Nst.-H.	+	—	++++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++
7 A		++++	++++	+	+	+++	+++	+	+	++	—	+	+++
14 NHB		++++	++	+	+++	+	—	+++	++++	—	—	++++	++++
16 NHB		++	+	+++	++++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++
13 NH		+++	+	++	++++	+	—	++++	++++	—	—	++++	++++
11 B		+++	++	++	+++	+	—	++++	++++	—	—	++++	++++
4 NHC		+++	+++	++	++	+	—	++++	++++	—	—	++++	++++
14		++	++	+++	+++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++
16 NHB		++	++	+++	+++	—	—	++++	++++	—	—	++++	++++



leidingwater waren gebruikt. De gunstige werking van Nst.-H. op de verzwakte reïncultures hield dus geen verband met een eventueel tekort aan calcium in die media. Overigens is in hoofdstuk IV § 1 ook reeds aangetoond, dat Nst.-H. niet in staat is, het daar ter plaatse aangetoonde minerale tekort in het uit zuivere chemicaliën bereide synthetische medium aan te vullen.

Terwijl nu aan het slot van hoofdstuk IV is opgemerkt, dat ook het onder toevoeging van calcium bereide zuiver synthetische medium nog dikwijls iets achterstond bij het met ruw keukenzout en leidingwater bereide medium, moeten wij op grond van de hierboven beschreven proefneming besluiten, dat ook dit laatste medium, althans voor verzwakte cultures, door toevoeging van Nst.-H. nog een verbetering ondergaat.

Voor een juist inzicht in deze kwestie moge er aan worden herinnerd, dat wij in hoofdstuk IV meenden te moeten concludeeren, dat de gunstige werking van leidingwater op de daarin aanwezige kleine hoeveelheid organische stof zou berusten. Wanneer men nu bedenkt, dat de organische stof in het Delftsche leidingwater ongetwijfeld aan niet onbelangrijke schommelingen, zoowel van qualitatieven als van quantitatieven aard, onderhevig is, dan kan het niet verwonderen, dat de gunstig werkende organische stof niet altijd in optimale hoeveelheid aanwezig is. Met dit gezichtspunt voor oogen wordt het begrijpelijk, dat voor gevoelige cultures onder bepaalde omstandigheden een toevoeging van Nst.-H. zeer bevorderlijk is.

Onder deze omstandigheden werd het zeer verleidelijk, na te gaan, in hoeverre nu ook niet een zuiver synthetisch medium, bij de bereiding waarvan met de behoefte aan calcium ook reeds rekening is gehouden, door een toevoeging van Nst.-H. zoodanig optimaal wordt, dat het tenvolle de vergelijking kan doorstaan met een medium, voor de bereiding waarvan ruw keukenzout en leidingwater zijn gebruikt.

Om deze reden werd nog een proevenreeks ingezet, waarbij aan het gebruikelijke medium nog eens calciumchloride en Nst.-H., al dan niet tezamen, in de in Tabel XV aangegeven hoeveelheden werden toegevoegd. Daar uiteraard de in leidingwater aanwezige organische stof sterk zal afwijken van Nst.-H., leek het mij — mede op grond van inmiddels opgedane andere ervaringen — van belang, tevens den invloed van een toevoeging van kleine hoeveelheden van een eenvoudige organische verbinding als natriumacetaat na te gaan.

De uitkomsten van deze proevenreeks zijn in Tabel XV weer-gegeven.

TABEL XV.

*Invloed van de toevoeging van calciumchloride, Nährstoff-Heyden en natriumacetaat op de snelheid van nitritatie.*

Aard der toevoegingen aan het standaard-medium	Nitrietreactie na 12 dagen	
NaCl pro analysi . . . . .	+	+
leidingwater + ruw NaCl . . . . .	+ + + +	+ + +
NaCl pro analysi + 0,1 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	+	+ +
" " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	+ +	+ + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> . . . . .	+ +	+ +
" " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 0,1 mg Nst.-H. . . . .	+ + +	+ + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> + 0,1 mg Nst.-H. . . . .	+ + + +	+ + + +
" " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Nst.-H. . . . .	+ + +	+ + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Nst.-H. . . . .	+ + +	+ + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Nst.-H. . . . .	+ + + +	+ + + +
" " " + 1 mg Nst.-H. . . . .	+ +	+ +
" " " + 1 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Na-acetaat . . . . .	+ + + +	+ + + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> + 1 mg Na-acetaat . . . . .	+ + ±	+ + +
" " " + 10 mg CaCl <sub>2</sub> + 0,1 mg Na-acetaat . . . . .	+ + + +	+ + + +
" " " + 1 mg Na-acetaat . . . . .	+ ±	+ ±

Wanneer wij Tabel XV overzien, dan vinden wij in de eerste plaats de gunstige werking van calcium andermaal bevestigd. Maar verder mogen wij inderdaad besluiten, dat van de gecombineerde toevoeging van calciumchloride en Nst.-H. een nog gunstiger effect op de ontwikkeling der nitriteerende bacteriën uitgaat. En wel worden deze media bij passende verhouding dier stoffen gelijkwaardig aan het met leidingwater en ruw zout bereide medium. Maar ook natriumacetaat blijkt als organisch complement alleszins in aanmerking te komen.

Hieraan mag nog worden toegevoegd, dat resultaten van deze proevenreeks nog eens in een nieuwe reeks geheel bevestigd werden gevonden.

Door het voorafgaande is in ieder geval komen vast te staan, dat organische stof niet alleen niet steeds een schadelijken, maar somtijds zelfs een gunstigen invloed heeft op de ontwikkeling der nitrificerende bacteriën, dit in tegenstelling met de uitspraken van



WINOGRADSKY, welke onderzoeker steeds weer accentueert, dat organische stoffen de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën remmen.

§ 3. OVER DE OORZAKEN VAN DE GUNSTIGE WERKING VAN NÄHRSTOFF-HEYDEN OP DE VERMEERDERING DER NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

Nadat door alle voorafgaande proefnemingen de gunstige werking van Nst.-H. op de ontwikkeling der nitrificeerende organismen voldoende was komen vast te staan, leek het van belang, te trachten een nader inzicht te verkrijgen in de vraag, waarop deze gunstige werking nu eigenlijk berust. Wij zagen reeds, dat de nitrificeerende bacteriën op voedingsbodems zonder ammoniak of nitriet niet kunnen groeien. Al zijn nu ammoniak, respectievelijk nitriet, blijkbaar de eenige stoffen, welke zij voor haar ademhaling kunnen gebruiken, dan zou het toch nog mogelijk kunnen zijn, dat zij niet alleen uit het door hen geassimileerde koolzuur hun celbestanddeelen opbouwen, maar dat bepaalde bestanddeelen van de Nst.-H. hiervoor ook geschikt zijn. Vooral omdat de koloniën op platen met Nst.-H. zoo groot worden, leek deze mogelijkheid niet uitgesloten. In dit verband was het aangewezen, na te gaan, of de nitrificeerende bacteriën zich ook bij afwezigheid van koolzuur op de Nst.-H. bevattende platen ontwikkelden.

Bij de eerste proeven bracht ik hiertoe een groot aantal platen in een goed gesloten exsiccator met onderin wat verdunde loog. In geen enkel geval bleef groei uit, maar ook in geen enkel geval waren de platen vrij van luchtinfectie gebleven. Altijd was er wel een plaat, waarop een schimmel groeide, terwijl op den duur ook de etiketten op de dozen sterk beschimmelden. Het bleef dus heel goed mogelijk, dat de waargenomen groei had plaats gehad ten koste van het door de schimmels geproduceerde koolzuur. Bij de tweede proef sloot ik iedere doos afzonderlijk goed dicht af, omdat ik anders te veel exsiccatoren noodig zou hebben gehad. Gebruikt werden 5 cm hooge Petrischalen. Nadat de dozen waren omgekeerd, werd in den rand tusschen deksel en doos eerst gesmolten paraffine en nadat dit was gestold, daarop kwik gegoten, zoodat zij hermetisch waren gesloten. In de eene helft der dozen was in den deksel een schaalte met wat 0,1 N loog geplaatst, terwijl in de andere helft een schaalte met krijt en een klein fleschje met verdund

zwavelzuur (1 cc 0,4 N) stonden. Nadat de doos was gesloten, kon dit zuur, door de doos even scheef te houden, bij het krijt lopen. Zoo konden dus doozen met en zonder koolzuur met elkaar worden vergeleken. Van *Nitrosomonas* werden 3 cultures met en 3 zonder koolzuur ingezet en van *Nitrobacter* evenzoo. In alle gevallen, waarin koolzuur aanwezig was, trad groei op en werd de ammoniak of het nitriet volledig tot nitriet, respectievelijk tot nitraat, geoxydeerd. In alle doozen zonder koolzuur trad niet de minste groei op en was van een oxydatie van ammoniak of nitriet niets te merken. Hieruit volgt dus, dat er in Nst.-H. geen organische verbindingen aanwezig zijn, welke het koolzuur volledig kunnen vervangen.

Hoewel het bovenstaande geenszins uitsluit, dat de nitrificerende bacteriën sommige bestanddeelen van de Nst.-H. voor den opbouw van nieuw celmateriaal zullen kunnen gebruiken, zijn daarvoor uit de tot nu toe gedane proeven geen aanwijzingen te vinden.

Bij nadere overweging was het dan ook verleidelijk, voor de verklaring van de gunstige werking van de Nst.-H. aanknoopingspunten te zoeken bij hetgeen andere onderzoekingen hebben geleerd aangaande het verband tusschen de ontwikkelingsmogelijkheid van een bepaalde bacteriesoort en de reductie-intensiteit van het medium.

Zoo stelde bijv. DUBOS<sup>1)</sup> vast, dat *Pneumococcus*-stammen op bepaalde voedingsbodems somtijds wel groeiden en in andere gevallen weer niet, waarbij bleek, dat de meerdere of mindere groei der bacteriën werd bepaald door de meerdere of mindere mate van gereduceerd-zijn van het medium. Op dit onderzoek zal in de volgende paragraaf nog worden teruggekomen. ALLYN en BALDWIN<sup>2)</sup> hebben voor meer aërobe bacteriën, namelijk voor *Rhizobium*-stammen, laten zien, dat deze zich op vaste voedingsmedia alleen dan ontwikkelen, indien het reductieniveau daarin binnen zekere grenzen was gelegen. Hier werd dus buiten twijfel gesteld, dat voor dergelijke aërobe bacteriën ook een sterker gereduceerd medium ontwikkelingsremmend kan werken. In een tweede verhandeling<sup>3)</sup> van deze onderzoekers werden deze gezichtspunten nader bevestigd en gesteund door rechtstreeksche bepalingen van de in de onderzochte media optredende oxydatie-reductiepotentialen. Ook de

<sup>1)</sup> R. DUBOS, Journ. of Exp. Med. 49, 559, 1929; ibid. 49, 575, 1929; ibid. 52, 331, 1930.

<sup>2)</sup> W. P. ALLYN and I. L. BALDWIN, Journ. of Bact. 20, 417, 1930.

<sup>3)</sup> W. P. ALLYN and I. L. BALDWIN, Journ. of Bact. 23, 369, 1932.



onderzoekingen van INGRAHAM <sup>1)</sup> over de bacteriostatische werking van gentiaanviolet bewijzen den beslissenden invloed, welke van de oxydatie-reductiepotentiaal der media op het al of niet intreden van den groei van bepaalde bacteriesoorten uitgaat <sup>2)</sup>).

Onder deze omstandigheden leek het gewenscht, na te gaan, in hoeverre ook in cultures van nitrificeerende bacteriën bepaalde oxydatie-reductiepotentialen konden worden vastgesteld en zoo ja, welken invloed deze potentialen van een toevoeging van Nst.-H. ondervonden.

Nu moet er evenwel in de eerste plaats op worden gewezen, dat aan de vaststelling van oxydatie-reductiepotentialen in cultures van aërobe bacteriën verschillende bezwaren van principiëelen aard zijn verbonden. In het algemeen zal er toch in verschillende lagen van een vloeistofmedium een uiteenlopende zuurstofspanning heerschen en dientengevolge zal ook de potentiaal in verschillende diepten van het medium verschillende waarden hebben. De zuurstofspanning zal in tweeërlei opzicht deze potentiaal beïnvloeden. Eenerzijds zal zij op de intensiteit van het ademhalingsproces en dus op één van de factoren, welke potentiaalbepalend werken, invloed uitoefenen. Anderzijds zal men rekening moeten houden met de mogelijkheid, dat de zuurstof rechtstreeks inwerkt op de instelling van het oxydoreductiesysteem, dat uiteindelijk aan de edelmetaal-elektrode het potentiaalverschil bepaalt. Tenslotte moet men wellicht nog aandacht schenken aan een rechtstreekschen invloed, welke van de zuurstof op de elektrode uitgaat.

Het liet zich nu dadelijk aanzien, dat bij cultures der nitrificeerende bacteriën de storende invloed van de zuurstof zich in het bijzonder zou doen gevoelen. Immers in deze cultures zijn relatief maar zeer weinig bacteriën aanwezig, zoodat de capaciteit van het, mede de potentiaal bepalende, stofwisselingsproces slechts gering is.

Desondanks heb ik gemeend, mij hierdoor niet van het verrichten van eenige waarnemingen te mogen laten terughouden, ofschoon tenvolle wordt beseft, dat aan de waargenomen potentialen geen absolute waarde kan worden toegekend.

Voor deze metingen werd gebruik gemaakt van de door ELEMA

<sup>1)</sup> M. A. INGRAHAM, Journ. of Bact. 26, 573, 1933.

<sup>2)</sup> Voor eerdere litteratuur op dit gebied vergel. men: B. ELEMA, De bepaling van de oxydatie-reductiepotentiaal in bacteriëncultures en hare beteekenis voor de stofwisseling. Diss. Delft, 1932.

(l.c.) vervaardigde opstelling met een Philips electrometerlamp 4060, waarmee kan worden gemeten, zonder dat er gevaar voor polarisatie optreedt.

Met de eerste proeven werd beoogd, na te gaan, of er in de nitrificerende cultures geleidelijk potentiaalveranderingen optraden en welken invloed de hoogte van de vloeistoflaag boven de electrode op de waargenomen potentiaal zou hebben. Om deze reden werd de vloeistoflaag ongeveer 4,5 cm hoog genomen, dat is dus aanzienlijk hoger dan gewoonlijk door mij werd gebruikt.

Een Erlenmeyer van 500 cc met 250 cc van de gebruikelijke cultuurvloeistof werd zwaar geënt met *Nitrobacter* en vervolgens werden er twee goudelectroden in geplaatst: één onder in de vloeistof en één dichtbij het oppervlak.

Uit Tabel XVI volgt zeer duidelijk, dat de gemeten potentiaal inderdaad afhankelijk is van de plaats, waar de electrode zich in de vloeistof bevindt. Tevens blijkt, dat de waargenomen potentiaal het gevolg is van de stofwisseling van *Nitrobacter*; zoodra namelijk het nitriet is geoxydeerd, stijgt de potentiaal om onmiddellijk na toevoeging van nitriet weer te dalen.

Met dezelfde cultuur als de voor de proef van Tabel XVI gebruikte, werden nog enkele proefnemingen gedaan, waarvan het resultaat hier alleen maar kort zal worden weergegeven. Om na te gaan, of aan de gemeten potentialen inderdaad beteekenis kon worden toegekend, werd op een gegeven moment phenolindophenol toegevoegd. De gemeten potentialen waren op dat oogenblik zoo hoog, dat aangenomen moest worden, dat de kleurstof bij de pH van 9,5 niet zou ontkleuren. Dit gebeurde dan ook inderdaad niet. Vervolgens werd, nadat alle nitriet weer was verdwenen, opnieuw 30 mg nitriet en tegelijk daarmede 300 mg glycocoll toegevoegd. De potentiaal daalde nu na eenige dagen verder en het phenolindophenol begon het eerst onderin de kolf en later ook bovenin te ontkleuren. Deze sterke potentiaaldaling bleek echter achteraf niet het gevolg van de werkzaamheid van *Nitrobacter*, maar van de aanwezigheid van een heterotrophe bacterie. Bij deze proef waren namelijk geen voorzorgen genomen om infecties te vermijden. De laagst waargenomen potentiaal was thans  $-0,070$  Volt, dat is dus ruim 170 millivolt lager dan de laagste potentiaal, welke *Nitrobacter* bereikte.



TABEL XVI.

Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in een cultuur van *Nitrobacter* onder vrije toetreding van de lucht.

Tijd in dagen + uren		Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Nitriet-reactie	Tijd in dagen + uren		Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Nitriet-reactie
0	0	.250	.304	+			20 mg natriumnitriet toegevoegd		
„	0,5	.283	.328	+					
„	1,5	.240	.315	+	16		.258	.310	+
„	2,5	.233	.294	+	„	1,5	.229	.284	+
„	5	.208	.268	+	„	4,5	.136	.250	+
„	21	.171	.230	+	„	8,5	.104	.245	+
1	4	.162	.220	+	„	21,5	.245	.298	—
							10 mg natriumnitriet toegevoegd		
2		.152	.217	+					
3		.146	.229	+					
4		.146	.229	+	17		.245	.305	+
5		.137	.201	+	„	2,5	.194	.305	+
6		.137	.313	+	„	4,5	.129	.286	+
7		.107	.281	+	„	6,5	.125	.282	±
8		.254	.340	—	„	8,5	.151	.279	—
					„	9,5	.157	.285	—
		250 mg natriumnitriet toegevoegd			„	10,5	.167	.286	—
					„	11,5	.173	.287	—
8	0	.250	.340	+					
„	2	.114	.216	+	„	12,5	.202	.282	—
„	18	.095	.215	+	„	13,5	.215	.289	—
9		.070	.192	+					
10		.073	.179	+					
11		.072	.166	+					
12		.102	.199	+					
13		.118	.211	+					
14		.120	.173	+					
15		.262	.308	—					

Een zelfde proefneming als hierboven beschreven werd ook met *Nitrosomonas* gedaan; er werd weer met een betrekkelijk hoge vloeistoflaag gewerkt.

Het bleek, dat ook in een cultuur van *Nitrosomonas* de potentiaal

op den duur merkbaar daalt. In Tabel XVII zijn de waargenomen potentialen weergegeven, van het oogenblik af, dat deze daling zich duidelijk had gemanifesteerd. Het meest opmerkelijk is hier, dat ook de potentiaal aan de bovenste electrode zoo sterk daalde, zelfs verder dan die aan de onderste electrode. Deze sterke potentiaal-daling ging gepaard met het uitzwermen van *Nitrosomonas*. Evenals in de in hoofdstuk III beschreven proef werd ook hier de vloeistof iets troebel en in een microscopisch praeparaat kon ik *Nitrosomonas* zien rondzwemmen. Het groote verschil tusschen *Nitrosomonas*: beweeglijk en *Nitrobacter*: onbeweeglijk openbaart zich dus ook in de waargenomen potentiaaldaling aan de bovenste electrode. Verder bleek ook hier, dat de potentiaal weer steeg, toen het ademhalings-substraat, in dit geval dus de ammoniak, nagenoeg was verbruikt.

TABEL XVII.

*Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in een cultuur van Nitrosomonas onder toetreding van de lucht.*

Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Ammoniak-reactie	Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Ammoniak-reactie
0	.135	.190	+	14	.125	.130	+
1	.120	.186	+	15	.125	.132	+
2	.120	.153	+	16	.128	.138	+
3	.120	.173	+	17	.130	.155	+
4	.123	.155	+	18	.127	.186	+
5	.109	.118	+	19	.123	.195	+
6	.116	.115	+	20	.123	.195	+
7	.115	.110	+	21	.140	.194	+
8	.100	.115	+	22	.135	.304	+
9	.120	.074	+	23	.131	.304	±
10	.120	.072	+	24	.120	.341	±
11	.121	.094	+	25	.128	.340	±
12	.121	.081	+	26	.167	.320	—
13	.122	.085	+	27	.174	.320	—

Vervolgens werd nagegaan, in hoeverre de waargenomen potentiaal afhankelijk was van den aard van de electrode. Verschillende



electroden hebben toch dikwijls een geheel verschillenden insteltijd. Daar het hier evenwel ging om metingen over een zeer lang tijdsverloop, was het niet waarschijnlijk, dat deze factor hier een groote rol zou spelen. Het bleek dan ook, dat goud- en platina-electroden een zelfde potentiaalverloop te zien gaven, alleen was de potentiaal van de platina-electrode meestal iets hooger, soms tot 10 millivolt. Daar een dergelijk potentiaalverschil voor deze proeven niet van belang is, werd in het vervolg alleen met goud-electroden gemeten.

De volgende proef was er op gericht, na te kunnen gaan, hoe de potentiaal zou veranderen, wanneer gedurende de proefneming de zuurstofspanning vermindert. Voor deze proef werden zeer platte kolfjes gebruikt, waarin 100 cc cultuurvloeistof een laagdikte van 1 cm had en waarboven toch slechts 75 cc lucht overbleef. In de kolfjes was zooveel ammoniak of nitriet aanwezig, dat de aanwezige hoeveelheid zuurstof lang niet voldoende was om alle ammoniak of nitriet te oxydeeren. Het was voor *Nitrosomonas* of *Nitrobacter* dus mogelijk, alle zuurstof weg te nemen. In de vloeistof waren twee goud-electroden gedompeld. In de kapillair met verzadigde KCl-agar was een kraantje aangebracht, dat gesloten bleef, wanneer er niet werd gemeten. Het bleek, dat dit noodzakelijk was, daar anders de agar op den duur door de drukvermindering naar binnen werd gezogen. In het vaatje met *Nitrobacter* was bovendien een buisje met krijt opgenomen. Bij dit krijt liet ik gedurende de proef af en toe een paar druppeltjes verdund zuur loopen om te zorgen, dat de noodige CO<sub>2</sub> voor den groei van *Nitrobacter* aanwezig was. Voor *Nitrosomonas* was dit niet noodig, daar ten gevolge van het ontstane zuur meer dan voldoende CO<sub>2</sub> vrijkomt. Tenslotte was er nog een manometerbuis aangebracht om de vermindering van de zuurstofspanning te kunnen volgen. Het resultaat van deze proefnemingen vindt men weergegeven in Tabel XVIII en XIX.

Uit Tabel XVIII en XIX is duidelijk te zien, dat zoowel in een cultuur van *Nitrosomonas* als van *Nitrobacter* de oxydatie-reductie-potentiaal bij afsluiting van de lucht veel lager wordt, dan wanneer deze vrij kan toetreden. Indien in een niet geënte cultuurvloeistof de lucht door zuurstofvrije stikstof werd verdreven, daalde de potentiaal maar weinig; in geen geval beneden de 0,200 Volt. De in de cultures waargenomen potentiaaldaling was dus niet het directe gevolg van de daling der zuurstofspanning. Zoodra tot de

TABEL XVIII.

Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in een cultuur van *Nitrosomonas* onder afsluiting van de lucht

Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Onderdruk in mm kwik	Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Onderdruk in mm kwik
0	.230	.250	0		luchttoevoer afgesloten		
1	.140	.162	19	16	.114	.149	0
2	.157	.140	50	17	.156	.101	32
3	.099	.106	108	18	.082	.125	69
4	.090	.073	121	19	.073	.116	89
5	.016	.016	123	20	.089	.120	101
6	— .019	— .033	123	21	.066	.095	103
7	— .034	— .040	124	22	.043	.049	104
8	— .034	— .040	124	23	.031	.031	105
9	— .027	— .037	124	24	.027	.022	105
				25	.025	.025	105
				26	.020	.007	105
				28	.034	.014	105
9+1 uur	— .027	— .040	0	30	.030	.010	105
9+3 uur	— .210	.205	0	42	.025	.007	106
9+5 uur	.220	.215	0	56	.020	.001	106
10	.216	.225	0		lucht toegelaten		
11	.225	.234	0	56+1 uur	.178	.161	0
13	.188	.216	0	56+1,5 uur	.233	.207	0
14	.156	.182	0	56+2 uur	.250	.229	0
15	.130	.159	0	56+2,5 uur	.256	.249	0

cultures weer lucht werd toegelaten, steeg de potentiaal altijd onmiddellijk weer, om weer te dalen, zoodra de luchttoevoer werd afgesloten. In hoeverre de waargenomen potentiaalstijging na zuurstoftoetreding mede een gevolg is van de hervatting van de ademhaling door de bacteriën dan wel uitsluitend van de directe inwerking van de zuurstof op het potentiaalbepalende oxydoreductiesysteem, moet hier in het midden worden gelaten. Uit het feit, dat *Nitrosomonas* na de tweede periode van afsluiting van den luchttoevoer, na herstel daarvan niet weer op gang kwam, volgt wel, dat de



TABEL XIX.

Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in een cultuur van *Nitrobacter* onder afsluiting van de lucht.

Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Onderdruk in mm kwik	Tijd in dagen	Goud-electrode beneden	Goud-electrode boven	Onderdruk in mm kwik
0	.203	.204	0	19	.086	— .015	51
1	.250	.256	6	24	— .086	— .160	51
2	.243	.259	15	56	— .143	— .161	51
3	.228	.265	23				
4	.260	.255	25				
5	.250	.244	38				
6	.241	.225	45	56+1 uur	.110	.096	0
7	.238	.213	51	56+1,5 uur	.158	.116	0
9	.225	.186	51	56+2 uur	.188	.146	0
11	.210	.156	51	56+2,5 uur	.204	.162	0
14	.183	.105	51	56+3 uur	.214	.181	0
				56+4 uur	.231	.200	0
				56+6,5 uur	.240	.226	0

rechtstreeksche inwerking van de zuurstof voldoende is om de waargenomen potentiaalstijging te bewerken. Intusschen leert deze proef ook, dat *Nitrosomonas* geruimen tijd onder verminderde zuurstofspanning kan blijven leven, daar de zuurstofspanning na het eerste openen en wederom sluiten van de kraan opnieuw daalt. Voor *Nitrobacter* werd in een tweede, hier niet vermelde proefneming hetzelfde vastgesteld. *Nitrobacter* is niet in staat, de zuurstofspanning zoo ver te laten dalen als *Nitrosomonas*. Deze proef werd drie maal herhaald, maar steeds bleek, dat *Nitrobacter* slechts een matige drukvermindering kon veroorzaken. Deze waarneming is in overeenstemming met een eerdere waarneming van MEYERHOF <sup>1)</sup>). Volgens dezen onderzoeker wordt de ademhaling van *Nitrosomonas* bij de halve zuurstofspanning van de lucht nog niet merkbaar minder, terwijl die van *Nitrobacter* dan reeds voor 21% wordt geremd.

In de volgende proefneming werd de invloed van een toe-

<sup>1)</sup> O. MEYERHOF, Pflüger's Arch. 166, 426, 1917; ibid. 167, 250, 1917.

TABEL XX.

Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in cultures van *Nitrosomonas*, waaraan al dan niet Nährstoff-Heyden wordt toegevoegd.

Tijd in dagen	1	2	Tijd in dagen	1	2
1	.243	.267	39	.215	.170
2	.175	.235	40	.260	.280
4	.172	.245		ammoniak	+ ammoniak
6	.202	.226		+ Nst.-H.	
7	.148	.137	40 + 6 uur	.190	.232
8	.150	.129	40 + 12 uur	.143	.197
9	.085	.029	41	.127	.183
10	.111	.147	41 + 7 uur	.123	.180
11	.056	.033	42	.119	.180
12	.070	.016	43	.150	.170
13	.065	.032	44	.118	.161
15	.058	.029	45	.105	.170
16	.044	.153	46	.132	.179
17	.078	.270	47	.097	.157
20	.201	.272	48	.120	.155
21	.275	.265	49	.115	.146
			50	.105	.138
	+ ammoniak		51	.105	.135
21 + 6 uur	.245	.213	52	.163	.163
22	.213	.177	53	.125	.143
23	.204	.172	55	.147	.190
24	.195	.168	56	.150	.129
25	.192	.166	57	.150	.127
26	.183	.155	58	.150	.190
27	.178	.154	60	.215	.150
28	.170	.138	61	.215	.204
29	.166	.118	62	.252	.172
30	.182	.072	63	.246	.172
31	.162	.097	64	.315	.186
32	.162	.086	65	.355	.204
34	.158	.087	66	.380	.179
36	.172	.109	67	.393	.242
37	.168	.172	68	.400	.287

voeging van Nst.-H. aan cultures van *Nitrosomonas* en *Nitrobacter* op het potentiaalverloop in deze media nagegaan. Deze proefneming werd gedaan in kleine rondkolfjes met wijden hals. De kolfjes waren afgesloten met rubber stoppen, waarin een tamelijk wijd buisje



(diam. 4 mm) was gebracht. Door dit buisje werd geënt, terwijl daardoor ook het ammoniumsulfaat, resp. het nitriet en later ook de Nst.-H. werden toegevoegd. Tevens konden door dit buisje op ieder oogenblik monsters worden genomen. Bovendien gingen door de stoppen het glazen buisje met de goud-electrode en het heveltje met verzadigde KCl-agar. Deze apparaatjes werden in hun geheel met 40 cc voedingsvloeistof gesteriliseerd. Na het steriliseeren werd in het heveltje wat KCl-agar opgezogen. Met het oog op den langen duur der proefneming waren de gaten voor de heveltjes zoo ruim geboord, dat deze zonder veel moeite uit de vloeistof konden worden

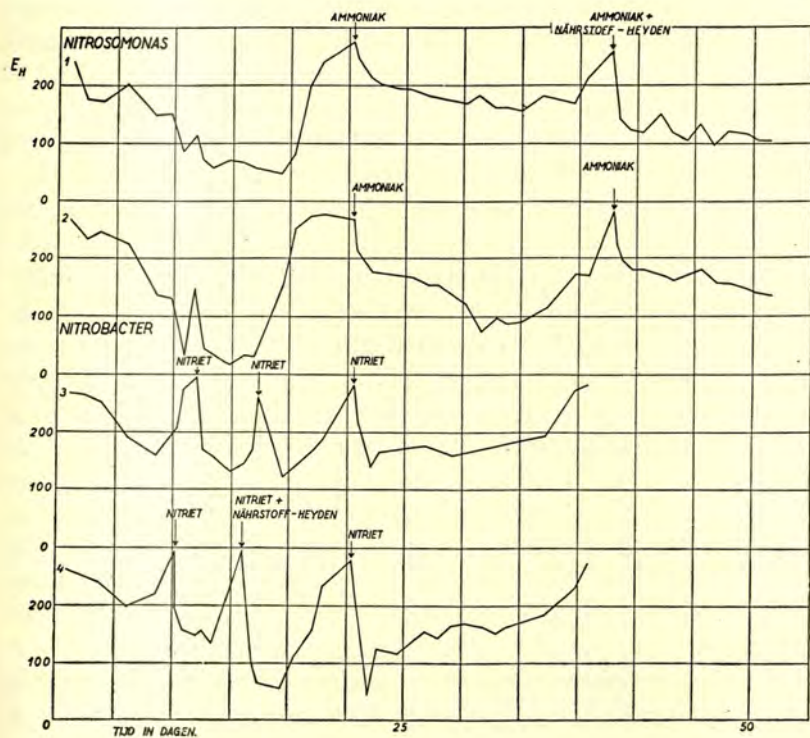
TABEL XXI.

*Verloop van de oxydatie-reductiepotentiaal (in Volts t.o.v. de normaal-waterstofelectrode) in cultures van Nitrobacter, waaraan al dan niet Nährstoff-Heyden wordt toegevoegd.*

Tijd in dagen	3	4	Tijd in dagen	3	4
1	.268	.264	19	.190	.235
2	.265	.254	21	.280	.280
3	.252	.241			
5	.194	.199			
7	.162	.219	21 + 6 uur	.220	.188
8	.180	.295	22	.140	.055
		+ nitriet	23	.165	.125
8 + 7 uur	.180	.196			
9	.275	.158	24	.158	.118
10	.295	.148	25	.175	.144
	+ nitriet		26	.176	.156
10 + 13 uur	.170	.156			
11	.160	.136	27	.166	.144
12	.132	.236	28	.161	.165
13	.145	.296	29	.168	.168
		Nst.-H. + nitriet	30	.173	.165
13 + 14 uur	.170	.090	31	.180	.153
14 + 1 uur	.267	.068	32	.183	.163
	+ nitriet		33	.189	.170
16	.122	.057			
17	.141	.112	35	.192	.184
18	.165	.153	37	.274	.227
			38	.283	.274

opgehaald. Met het cultuurmedium voor *Nitrosomonas* werden 4 kolfjes gesteriliseerd en een gelijk aantal met dat voor *Nitrobacter*. Twee kolfjes van elke serie werden geënt; de vier overige dienden alleen als contrôle.

Het verloop van de oxydatie-reductiepotentialen in deze kolfjes vindt men verzameld weergegeven in de Tabellen XX en XXI en



Afb. 30.

graphisch in Afb. 30. De metingen in de contrôlekolfjes zijn niet opgenomen, daar het potentiaalniveau gedurende de geheele proefneming op ongeveer 300 mV bleef. De nummers aan het hoofd der beide tabellen corresponderen met de cijfers, welke zijn geplaatst aan het begin der lijnen in de afbeelding. In de graphiek zijn duidelijkheidshalve niet alle lijnen op hetzelfde niveau geteekend, daar deze anders te veel door elkaar zouden loopen. De in de graphiek



voorkomende woorden zijn zoodanig geplaatst, dat zij aangeven, welke stof op welk tijdstip aan het bij de betreffende lijn behorende kolfje werd toegevoegd.

Uit de graphiek blijkt duidelijk, dat de potentiaal na de enting in alle kolfjes geleidelijk daalt, om daarna weer vrij steil te stijgen. Reageert men op dat moment op ammoniak of nitriet, dan blijkt, dat deze reacties zeer zwak of negatief uitvallen. Verder ziet men, hoe de potentiaal in de cultuur van *Nitrosomonas* weer snel daalt na de toevoeging van ammoniak. Hetzelfde geldt voor *Nitrobacter* na toevoeging van nitriet. Op te merken valt, dat de nitratie in de kolfjes erg langzaam gaat. Wat hiervan de oorzaak is, is niet met zekerheid te zeggen. Misschien is de aëratie in deze kolfjes niet voldoende geweest, daar de opening, welke bovendien nog met een wattenprop was afgesloten, tamelijk nauw was. Het kan evenwel ook mogelijk zijn, dat van de aanwezigheid van de goud-electrode in het medium een oligodynamische werking is uitgegaan. De nitratie daarentegen heeft een normaal verloop gehad. Wij zien, hoe de nitratie van eenzelfde hoeveelheid nitriet de tweede maal sneller gaat dan de eerste maal, ongetwijfeld ten gevolge van de inmiddels ingetreden vermeerdering van de bacteriën. Het trekt de aandacht, dat met deze snellere nitratie de potentiaal iets dieper zakt. En tenslotte ziet men, dat na de tweede en derde toevoeging de nitratie steeds langzamer gaat ten gevolge van de remming door de steeds hooger wordende concentratie van het nitraat.

De Nst.-H. werd gelijktijdig aan eenige der contrôlekolfjes, welke niet waren geënt, en aan de cultures toegevoegd. Op de potentiaal in de contrôlekolfjes had deze toevoeging geen of zeer weinig invloed. De potentiaaldaling in de cultures en het verder verloop van de potentiaal werden er zeer duidelijk door beïnvloed. Wij zien, hoe in de cultures, waaraan Nst.-H. is toegevoegd, de potentiaal merkbaar sterker daalt dan in de cultures, waaraan alleen de ademhalingssubstraten werden toegevoegd.

Uitdrukkelijk zij vermeld, dat ik er mij na beëindiging van de proefneming door afstrijken op peptonagarplaten van overtuigde, dat de cultures niet waren geïnfecteerd.

Uit de boven weergegeven waarnemingen volgt nu eenerzijds, dat een actieve stofwisseling zoowel van *Nitrosomonas* als van *Nitrobacter* gepaard gaat met een daling van de oxydatie-reductiepotentiaal in het medium. Het lijkt op grond van de eerdergenoemde, met andere



bacteriënsoorten opgedane, ervaringen waarschijnlijk, dat het tot stand komen van een dergelijk reductieniveau een voorwaarde is voor het intreden van een actieve vermeerdering. Anderzijds blijkt uit de laatste proefneming duidelijk, dat toevoeging van Nst.-H. in hooge mate bevorderlijk is om een gereduceerden toestand in het medium teweeg te brengen. Op welke wijze dit geschiedt, laat zich momenteel nog niet beantwoorden. Het blijft denkbaar, dat Nst.-H. uitsluitend een laatste, voor het intreden van het celvermeerderingsproces onmisbare, factor is en dat de potentiaaldaling slechts hierdoor wordt veroorzaakt. De sterkere daling, welke de toevoeging van Nst.-H. veroorzaakt, in aanmerking genomen, lijkt het echter waarschijnlijker, dat de cellen één of meer der bestanddeelen van genoemd product rechtstreeks in hare stofwisseling betrekken en zodoende de potentiaal op een, voor de vermeerdering gunstige, hoogte brengen.

Het laat zich nu aanzien, dat deze factor vooral van veel betekenis zal zijn in die gevallen, waarin men een zwakke enting van een versch medium toepast. Is deze enting sterker, dan zullen conglomeraten van overgebrachte bacteriën tengevolge van hare actieve stofwisseling plaatselijk wel de noodige reductie van het omringende medium kunnen bewerken en zij kunnen van daaruit het medium bevolken. Het is dus alleszins denkbaar, dat een dergelijk streven, voor het geval van zwakkere entingen, merkbaar wordt vergemakkelijkt door een toevoeging van Nst.-H.

Ook zal deze factor van veel belang zijn bij het aanleggen van plaatcultures, waarbij de afgestreken bacteriën zijn blootgesteld aan de volle zuurstofspanning der lucht. In overeenstemming hiermede zagen wij dan ook in § 2, dat de gunstige werking van Nst.-H. zich in het bijzonder bij plaatcultures doet gevoelen.

Het is in dit verband merkwaardig te vermelden, dat ook eerdere onderzoekers, zij het dan ook op meer indirecte wijze, tot een analoge slotsom zijn gekomen. In dit opzicht is de volgende uitspraak van CONN en CONN <sup>1)</sup> tekenend: „In some way not yet explained, close contact with air enables them not only to resist the toxic effect of organic matter, but perhaps even to derive some benefit from such material, which is harmful under conditions of poor aeration”.

Het is verleidelijk, nog eenige andere, eerder in dit proefschrift medegedeelde, ervaringen met het bovenstaande in verband te

<sup>1)</sup> H. W. CONN and H. J. CONN, Bacteriology, Baltimore, 1923, p. 183.



brenge. Zoo zagen wij in Hoofdstuk II §3, dat de verkregen rein-cultures van *Nitrosomonas* zich niet ontwikkelden in het gebruikelijke medium, dat met gedestilleerd water en ruw keukenzout was bereid. Daarentegen was dit medium alleszins geschikt gebleken, zolang met ruwcultures werd gewerkt. Het is nu zeer denkbaar, dat dit verschillend gedrag hierop berust, dat de heterotrophe verontreinigende organismen in nauw contact met de *Nitrosomonas*-vlokjes, welke zoo rijk aan organische wandstoffen zijn, een passende reductie van het, de *Nitrosomonas*-cellen direct omgevende, medium bewerken. De gunstige werking van leidingwater voor de reincultures zou dan hierop terug zijn te voeren, dat de daarin aanwezige organische stof evenals Nst.-H. onder invloed van *Nitrosomonas* tot het ontstaan van een passend gereduceerden toestand aanleiding geeft.

Ook het feit, dat bij het afstrijken van ruwcultures op kiezelzuurplaten veelal een zoo groot aantal koloniën geïnfecteerd blijkt te zijn, zou hiermede kunnen samenhangen. Naast de eerder beschreven onaangename eigenschappen van het oppervlak van de kiezelzuurplaten moet dit er ongetwijfeld toe bijdragen, dat het zoo moeilijk is om van kiezelzuurplaten een reine kolonie te krijgen. Bovendien wordt hierdoor begrijpelijk, waarom de koloniën bij het afstrijken op de platen bijna nooit op een eenigszins grooten afstand van elkaar liggen, zooals dit bij het suspendeeren in kiezelzuurplaten wel het geval is. Het is misschien goed er nog eens op te wijzen, dat dit alles in het bijzonder voor *Nitrosomonas* geldt. Steeds bleek mij, dat *Nitrosomonas* een veel subtieler organisme is dan *Nitrobacter*.

Eindelijk is het ongetwijfeld merkwaardig, dat ALLYN en BALDWIN vonden, dat toevoeging van kleine hoeveelheden calciumchloride naast reduceerende agentia aan het door hen voor verschillende *Rhizobium*-stammen gebruikte cultuurmedium een bij uitstek gunstigen invloed uitoefende op de mate van enting, welke noodzakelijk was om een cultuur op gang te doen komen. De analogie van deze uitkomsten met de in § 2 van dit hoofdstuk beschreven resultaten is wel zeer treffend.

#### § 4. OVER DE OORZAAK VAN DE REMMENDE WERKING VAN PEP- TONEN OP DE VERMEERDERING DER NITRIFICEERENDE BACTERIËN.

Met de in de vorige paragraaf verkregen uitkomsten voor oogenleek het nu van belang, na te gaan, waarom Nst.-H. de ontwikkeling



der nitrificerende bacteriën niet remt en de verschillende peptonsoorten, welke gewoonlijk voor de bereiding der voedingsbodems worden gebruikt, dit in zoo sterke mate doen. Op zichzelf beschouwd is dit laatste feit wel zeer opmerkelijk. Het kan toch niet anders, of ook in de natuur zullen de nitrificerende bacteriën in tal van gevallen met eiwitbouwsteen en in aanraking komen en het is op het eerste gezicht verrassend, dat deze de activiteit dier bacteriën min of meer volledig zouden remmen. Zooals reeds in § 1 van dit hoofdstuk is opgemerkt, stellen WINOGRADSKY en OMELIANSKY zich voor, dat in dergelijke gevallen de nitrificatie wordt stopgezet, totdat de mede aanwezige heterotrophe bacteriën de organische stikstofverbindingen hebben gededamineerd en de daarin aanwezige stikstof dus als ammoniak is vrijgekomen.

Het leek mij van belang, de door deze onderzoekers beschreven waarnemingen nog eens te herhalen en meer in het bijzonder dus vast te stellen, of bij enting van *Nitrosomonas* en *Nitrobacter* in media, welke organische stikstofverbindingen bevatten, een nitrificatie van de daarin aanwezige stikstof kon worden bereikt, indien men deze media gelijktijdig entte met bacteriesoorten, welke tot een ammonificatie der toegevoegde stikstofverbindingen in staat zijn. Ik besloot, in dit opzicht zoowel den invloed van pepton als van ureum na te gaan en gebruikte als organismen, welke deze verbindingen kunnen ammonificeeren, respectievelijk een niet nader geïdentificeerde *Pseudomonas*-soort en *Urobacillus Pasteurii*.

In een vijftal kolfjes, welke het gewone voor *Nitrosomonas* gebruikte medium bevatten, met dien verstande, dat daarin in plaats van 0,1% ammoniumsulfaat: 0,1% pepton POULENC en 0,1% ureum waren gebracht, werden de in Tabel XXII aangegeven bacteriëncombinaties geënt. Na 14 dagen cultiveeren bij 30° C. werden de kolfjes op de aanwezigheid van ammoniak, nitriet en nitraat onderzocht. De daarbij verkregen uitkomsten zijn in genoemde tabel weergegeven.

Wij zien uit Tabel XXII, dat inderdaad een goede nitrificatie van organische stikstof kan worden bereikt, indien daartoe geschikte heterotrophe bacteriën hare medewerking verleenen. Tevens blijkt uit deze proef, dat ureum minder remmend op de nitrificatie werkt dan pepton, daar in kolfje 3, dat naast de nitrificerende organismen alleen *Urobacillus Pasteurii* bevat, alle ammoniak nog niet is geoxydeerd, terwijl dit wel het geval is in kolfje 4, waarin naast de nitri-



TABEL XXII.

*De vorming van ammoniak, nitriet en nitraat in media met pepton en ureum onder den invloed van verschillende bacteriëncombinaties.*

Nr.	Gebruikte bacteriëncombinaties	Ammoniak- reactie 1 en 2	Nitriet- reactie 1	Nitraat- reactie 2
1	<i>Urobacillus Pasteurii</i> . . . . .	+++	—	—
2	<i>Urobacillus Pasteurii</i> + <i>Pseudomonas</i> . .	+++	—	—
3	<i>Urob. Past.</i> + <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitrobacter</i>	++	+++	++
4	<i>Pseudomonas</i> + <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitro- bacter</i> . . . . .	—	+++	+++
5	<i>Urob. Past.</i> + <i>Pseudomonas</i> + <i>Nitroso- monas</i> + <i>Nitrobacter</i> . . . . .	—	+++	+++

ficeerende bacteriën alleen de *Pseudomonas*-stam voorkomt. Ook dit is in overeenstemming met de uitkomsten van WINOGRADSKY. Volledigheidshalve zij nog vermeld, dat ik mij er reeds tevoren van had overtuigd, dat, indien men alleen reïncultures van nitrificeerende bacteriën ent in kolfjes met ammoniumsulfaat, waaraan bovendien 0,1% pepton en 0,1% ureum is toegevoegd, in het geheel geen nitrificatie plaats vindt.

Nadat in de kolfjes 4 en 5 ook alle nitriet in nitraat was omgezet, werd nog eens 0,1% pepton en 0,1% ureum toegevoegd. Toen opnieuw de nitriet-reactie negatief was geworden, werd in kolfje 5 colorimetrisch bepaald, hoeveel nitraat er was gevormd. Gevonden werd 70 mg  $N_2O_5$ , terwijl ik, wanneer alle toegevoegde stikstof was omgezet in nitraat, ongeveer 230 mg  $N_2O_5$  had moeten vinden. Bij deze proefneming werd dus ongeveer 1/3 gedeelte van de toegevoegde hoeveelheid organische stikstof geoxydeerd. Men moet hierbij in aanmerking nemen, dat ten gevolge van den langen duur der proefneming ongetwijfeld een niet te verwaarloozen deel van de eerstgevormde ammoniak uit de kolfjes zal zijn vervluchtigd. Toch lijkt het niet waarschijnlijk, dat hieruit het geheele tekort kan worden verklaard. Dit is in zooverre van belang, omdat er uit zou volgen, dat de nitrificatie reeds goed voortgang heeft, terwijl er nog een belangrijk deel van de stikstof van de pepton in organische binding aanwezig is.

Men zou dus geneigd zijn, uit deze proefneming te besluiten, dat niet alle bestanddeelen van de pepton gelijkelijk remmend op

de nitrificatie werken. Voor dit gezichtspunt spreken nu ook nog andere overwegingen. Wij zagen toch in de vorige paragraaf, dat de geschiktheid van een gegeven medium in vele gevallen wordt bepaald door den reductiegraad van dit medium. Het is dus denkbaar, dat het medium een geschikte voedingsbodem voor de nitrificerende bacteriën zou worden, wanneer het zou worden bevrijd van stoffen, welke potentiaalbepalend werken. Het bewijs voor de aanwezigheid van zulke stoffen in pepton is door DUBOS<sup>1)</sup> geleverd. Het resultaat van zijn werk was, dat hij door toevoeging van zuur aan een peptonoplossing een stof kon neerslaan, welke wel in geoxydeerden, maar niet in gereduceerden toestand een remmende werking uitoefende op den groei van de vrij anaërobe *Pneumococcus*-stammen. Van een pepton, welke door de behandeling met zuur van deze stof was bevrijd, konden nu voedingsbodems worden bereid, welke zoowel direct na het steriliseeren als eenige dagen later geschikt waren als voedingsbodem voor de genoemde bacteriesoort. Om deze reden behandelde ik pepton POULENC op de door DUBOS aangegeven wijze met zuur. De behandeling had echter niet het gewenschte resultaat, daar ook de gezuiverde pepton de nitrificatie nog steeds volkomen stopzette.

Hierna onderzocht ik den invloed van peptonen van verschillende herkomst op de nitrificatie. Tevens werd nagegaan, of deze peptonen, hetzij door extractie met aether, hetzij door extractie met 96% alcohol van hare schadelijke eigenschappen konden worden bevrijd. De aether-extractie geschiedde in een Soxhlet-apparaat. Voor de alcoholische extractie werd de pepton eenige dagen met alcohol geschud, waarbij de alcohol een paar maal werd ververscht. Van de geëxtraheerde en niet-geëxtraheerde peptonen werden agarplaten met 0,75% pepton en 1,5% agar gemaakt. Na het steriliseeren werden de voor de nitrificatie gebruikelijke voedingszouten toegevoegd, op dezelfde wijze als reeds werd beschreven bij de bereiding van de platen met Nährstoff-Heyden.

In Tabel XXIII is het resultaat van deze proefneming neergelegd.

Als toelichting tot Tabel XXIII het volgende. De hoeveelheden gevormd nitriet of nitraat, aangeduid door de kruisjes, zijn tevens een maatstaf voor den groei op de verschillende platen. Elke pepton-

<sup>1)</sup> R. DUBOS, Journ. of Exp. Med. 52, 331, 1930.



TABEL XXIII.

*Invloed van extractie met aether of alcohol op de schadelijke werking van diverse peptonen op de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën.*

Peptonsoorten	Nitrosomonas			Nitrobacter		
	Niet geëxtraheerd	Geëxtraheerd met aether	Geëxtraheerd met alcohol	Niet geëxtraheerd	Geëxtraheerd met aether	Geëxtraheerd met alcohol
	nitriet	nitriet	nitriet	nitraat	nitraat	nitraat
Pepton Witte . . .	++	++	++	+	—	++
Pepton Poulenc . . (exempte d'indol pour bactériologie)	—	—	—	—	—	—
Pepton Merck 7213 . (Pepton trocken für bacteriologische Zwecke)	—	++	+++	—	+++	+++
Bacto pepton „Difco”	—	—	—	—	+++	—
Proteose pepton „Difco”	—	—	+++	—	—	—
Nährstoff-Heyden . .	+++		+++	+++		+++

soort werd eenige malen beproefd en in geval van groei werden enkele koloniën in kolfjes met peptonwater geënt om te zien, of zij rein waren, wat steeds het geval bleek te zijn. Wij zien dus, dat in enkele gevallen de nitrificeerende bacteriën ook wel op voedingsbodems met andere organische stoffen dan Nährstoff-Heyden willen groeien. Op den voedingsbodem met Nst.-H. is de groei echter veel beter. Daarop ziet men om de koloniën van *Nitrosomonas* ophelderingen ontstaan, doordat het magnesiumcarbonaat oplost, wat men op de andere platen nooit ziet.

Dat er geen volledige overeenstemming is tusschen *Nitrobacter* en *Nitrosomonas* is niet te verwonderen. Men moet bedenken, dat *Nitrobacter* zeer gevoelig is voor sporen ammoniak. MEYERHOF vond, dat de ademhaling van *Nitrobacter* bij pH 9,5 door 0,0015 N  $\text{NH}_3$  reeds voor 70% wordt geremd. De voedingsbodems voor *Nitrobacter* hebben deze hoge pH en dus is een zeer geringe concentratie van ammoniak al voldoende om de nitrificatie stop te zetten. In den voedingsbodem met pepton WITTE kon ik met Nessler's reagens gemakkelijk ammoniak aantonen. Dit kan dus verklaren, waarom

*Nitrobacter* slechts eenmaal op pepton WITTE-platen tot ontwikkeling kwam en daarentegen geregeld op de met alcohol geëxtraheerde pepton WITTE.

Het blijkt dus, dat in eenige gevallen de schadelijke eigenschappen aan een pepton konden worden ontnomen. Het leek nu denkbaar, dat dit resultaat zou moeten worden toegeschreven aan de verwijdering van een reversibel oxydoreductiesysteem, waarbij in de eerste plaats aan organische SH-verbindingen kon worden gedacht. Het gelukte evenwel niet, in de verkregen extracten dergelijke verbindingen met de bekende nitroprussied-natrium-reactie aan te toonen <sup>1)</sup>.

Ik kwam toen op de gedachte, dat het al of niet schadelijk zijn van bepaalde peptonmonsters zou kunnen worden bepaald door het al of niet daarin aanwezig zijn van vrije aminozuren. Uit het belangrijke onderzoek van MEYERHOF toch is duidelijk gebleken, dat juist de meest uiteenlopende aminoverbindingen de ademhaling der nitrificeerende bacteriën zeer sterk remmen <sup>2)</sup>.

Voor het aantonen der vrije aminozuren werd gebruik gemaakt van het reagens van FOLIN. Dit reagens, het 1.2. naphthochinon-sulphozuur, werd bereid volgens het recept van MANDEL en STEUDEL.<sup>3)</sup> Met dit reagens konden inderdaad in de verkregen alcoholische extracten aminozuren worden aangetoond. Het bleek evenwel, dat de extracten lang niet alle even sterk reageerden ondanks het feit, dat gelijke gewichtshoeveelheden van verschillende peptonsoorten waren geëxtraheerd. De extracten van Nährstoff-Heyden en pepton WITTE gaven een zeer zwakke reactie, zwakker dan een glycocoll-oplossing, welke 0,1 mg N/cc bevatte. De extracten van de andere peptonen gaven een veel sterkere reactie en wel gerangschikt in de volgorde van toenemende sterkte: Bacto, Proteose, MERCK, POULENC. Met het reagens van FOLIN werd ook nog colorimetrisch de aminostikstof der vrije aminozuren in de peptonen voor en na de extractie bepaald.

<sup>1)</sup> Aanvankelijk meende ik, in dit opzicht bij de aetherextracten een positief resultaat te hebben verkregen. Nader onderzoek leerde evenwel, dat de eerst gebruikte aether een verontreiniging bevatte (waarschijnlijk aceton), welke eveneens met het gebruikte reagens een roode verkleuring gaf.

<sup>2)</sup> O. MEYERHOF, Pflüger's Arch. 164, 353, 1916; *ibid.* 165, 229, 1916; *ibid.* 166, 240, 1917.

<sup>3)</sup> O. FOLIN, Journ. of biol. Chem. 51, 377, 1922; zie ook: P. RONA, Praktikum der physiol. Chem. Berlin 1926, Teil I, p. 276.



Het resultaat hiervan vindt men in Tabel XXIV.

TABEL XXIV.

*Percentage aminostikstof in geëxtraheerde en niet-geëxtraheerde peptonen.*

Peptonsoorten	Niet geëxtraheerd	Geëxtraheerd met alcohol
	aminostikstof	aminostikstof
Nährstoff-Heyden. . . . .	1%	
Pepton Witte . . . . .	1,9%	1,8%
„ Poulenc . . . . .	5%	3,7%
„ Merck . . . . .	3%	1,7%
Bacto pepton Difco. . . . .	3%	2,5%
Proteose pepton Difco . . . . .	3%	2%

De in Tabel XXIV vermelde uitkomsten kloppen in zooverre met de uitkomsten van de reacties van de alcoholische extracten, dat de volgorde, gerangschikt naar de toenemende hoeveelheid aminostikstof, welke door extractie met alcohol is verwijderd, dezelfde is. Deze uitkomst is goed in overeenstemming met de bereidingswijze der verschillende peptonsoorten. Nährstoff-Heyden en pepton WITTE zijn weinig afgebroken eiwitten, terwijl de andere vier veel vollediger zijn afgebroken, waardoor men in deze laatste meer vrije aminozuren aantreft dan in de eerste twee. Voor pepton WITTE <sup>1)</sup> komt hier nog bij, dat deze wordt verkregen door eiwitten eerst met pepsine te splitsen en dan de gevormde splitsingsproducten uit de oplossing met alcohol neer te slaan. Het in alcohol oplosbare gedeelte is dus in het verkregen product niet meer aanwezig.

Behalve voor pepton MERCK, welke uit caseïne, en voor Nährstoff-Heyden, welke uit kippeneiwit is gemaakt, gaat men bij de bereiding van de overige vier peptonsoorten waarschijnlijk uit van vleesch.

Wanneer wij Tabel XXIV nader bezien, dan treft het, dat juist die voedingsbodems, waarin men weinig vrije aminozuren vindt, de meest geschikte zijn en dat een deel van de ongeschikte door verwijdering van die aminozuren bruikbaar is geworden voor

<sup>1)</sup> Vergel.: J. KLEEBERG und H. BEHRENDT, Die Naehrpraeparate und Sauermilch-arten, Stuttgart, 1930, p. 33.

de nitrificeerende bacteriën. Dat *Nitrobacter* en *Nitrosomonas* niet gelijk reageeren op de verschillende peptonsoorten, is wel in overeenstemming met het werk van WINOGRADSKY en MEYERHOF, die vonden, dat eenzelfde organische verbinding voor de eene soort schadelijker kan zijn dan voor de andere. Het leek nu van belang, na te gaan, of Nährstoff-Heyden door toevoeging van deze extracten ook ongeschikt zou worden als voedingsbodem voor de nitrificeerende bacteriën. Aan een aantal agarplaten met 0,75% Nährstoff-Heyden werd telkens 0,1% van het ingedamppte alcoholische extract van één der peptonen toegevoegd.

Uit Tabel XXV zien wij, dat deze alcoholische extracten inderdaad een sterk remmende werking hebben, in enkele gevallen zelfs een volledige remming bewerken.

TABEL XXV.

*Invloed van de toevoeging van een weinig van de ingedamppte alcoholische extracten der diverse peptonsoorten op de gunstige werking van Nährstoff-Heyden.*

Toevoeging	Groei van <i>Nitrosomonas</i>	Groei van <i>Nitrobacter</i>
Nährstoff-Heyden	+ + +	+ + +
„ + Extract Poulenc	—	—
„ + „ Merck	+	—
„ + „ Bacto	+	+
„ + „ Proteose	—	—
„ + 0,1% glycocoll	—	—

Tenslotte zien wij in Tabel XXV nog, dat platen met Nährstoff-Heyden, waaraan 0,1% glycocoll is toegevoegd, ook totaal ongeschikt zijn geworden voor de nitrificeerende bacteriën. Toch is de op deze wijze toegevoegde aminostikstof slechts 1,3% van de aanwezige Nährstoff-Heyden. Het gehalte aan aminostikstof was in deze laatste platen dus niet hooger dan in de eerder vermelde platen, waaraan 0,75% van een der peptonen was toegevoegd. Wij hebben hier dus een nader bewijs, dat een aminozuurgehalte, zooals dit in de door mij onderzochte peptonen werd aangetroffen, voldoende kan zijn om een remming van de vermeerdering der nitrificeerende bacteriën te bewerken.



Aangezien wij nu uit het onderzoek van MEYERHOF weten, dat zeer uiteenlopende aminoverbindingen de ademhaling der nitrificerende bacteriën zeer sterk remmen, is door bovenstaande proefnemingen de remmende werking der peptonen op de ontwikkeling dier bacteriën wel begrijpelijk geworden. Dit te meer, daar de remmende werking der  $\text{NH}_2$ -verbindingen op de ademhaling niet verwonderlijk aandoet. Immers voor *Nitrosomonas* kan men er zich zeer goed in verplaatsen, dat deze verbindingen met de aan ammoniak zoo verwante aminogroep er in slagen, de ammoniak van den ademhalingskatalysator te verdringen. Voor *Nitrobacter* is iets soortgelijks te verwachten, gezien het feit, dat hier de ammoniak zoo geprononceerd remmend werkt.

§ 5. DE INVLOED VAN GLUCOSE OP DE ADEMHALING EN OP DE VERMEERDERING DER NITRIFICERENDE BACTERIËN.

Zooals wij in § 1 zagen, wordt door WINOGRADSKY terecht geaccentueerd, dat, wanneer men den invloed van organische stof op het nitrificatieproces wil bestudeeren, men onderscheid moet maken tusschen den invloed, welken deze verbindingen eenerzijds op het oxydeerend vermogen (de ademhaling) en anderzijds op de vermeerdering van deze bacteriën hebben. Bij de in de voorafgaande paragrafen beschreven proefnemingen werd de invloed van de onderzochte organische stoffen nagegaan door deze in bepaalde hoeveelheden toe te voegen aan de gebruikte cultuurmedia, waarna deze relatief zwak werden geënt. Wanneer dus in deze proefnemingen na gezetten tijd langs chemischen weg geen nitrificatie kon worden vastgesteld, dan mocht daaruit alleen worden geconcludeerd, dat in de bewuste media de voorwaarden voor de *vermeerdering* der nitrificerende organismen niet waren gerealiseerd. Immers het aantal der met de enting meegebrachte kiemen was zoo gering, dat hare oxydeerende werkzaamheid zich niet merkbaar kon doen maken.

In de reeds in de vorige paragraaf vermelde onderzoekingen van MEYERHOF is nu evenwel het bewijs geleverd, dat de remmende invloed, welken organische stoffen op de ontwikkeling der nitrificerende bacteriën hebben, in de meeste gevallen is toe te schrijven aan een remming van de *ademhaling* der bacteriën.

Ter vergelijking zijn in de Tabellen XXVI en XXVII de gegevens van WINOGRADSKY en van MEYERHOF, respectievelijk voor *Nitrosomonas* en voor *Nitrobacter*, nog eens naast elkaar gezet.

TABEL XXVI.

Invloed van uiteenlopende organische verbindingen in verschillende concentraties op de vermeerdering en de ademhaling van *Nitrosomonas*.

Winogradsky <sup>1)</sup>					Meyerhof			
Stof	Vermeerdering				Ademhaling			
	Begin van de remming		Volledige remming					
	Conc. in %	Mol. conc.	Conc. in %	Mol. conc.	Mol. conc.	Remming in %	Mol. conc.	Remming in %
Glucose	0,025	0,0012	0,2	0,01	0,2	0		
Asparagine	0,05	0,0033	0,3	0,02	0,005	34	0,01	70
Glycerine	>0,2	>0,02	?		0,1	18	0,3	30
Ureum	>0,2	>0,03	?		0,025	27	0,1	77
Na-acetaat	0,5	0,04	>1,5	>0,11	0,05	12	0,2	26
Na-butyraat	0,5	0,05	>1,5	>0,14	0,1	23	0,2	50
Pepton	0,025		0,2					
Manniet					0,12	10	0,25	25
*) Glycocoll	0,037	0,005	0,37	0,05	0,03	50		

\*) Eigen waarneming.

Voor de niet ingevulde plaatsen in de beide tabellen zijn door WINOGRADSKY of MEYERHOF geen cijfers gegeven. Van pepton was mij bij eigen onderzoek gebleken, dat dit de ademhaling sterk remt.

Wanneer men de resultaten van het onderzoek van WINOGRADSKY over de remmende werking van organische stof op den groei der nitrificerende bacteriën vergelijkt met die van MEYERHOF over de remmende werking op de ademhaling, dan treft het, dat, behalve voor glucose, de remming van de ademhaling en die van den groei in groote trekken parallel gaan.

Glucose remt toch in een concentratie van 0,3 M de ademhaling van *Nitrobacter* nog niet, terwijl volgens WINOGRADSKY 0,0025 M glucose den groei al begint te remmen en 0,01 M den groei reeds geheel verhindert. Hetzelfde geldt voor *Nitrosomonas*; de ademhaling van dit organisme wordt door 0,2 M nog niet, de groei reeds door

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, in: F. LAFAR, Handb. d. techn. Mykologie III, 167, 1906.



TABEL XXVII.

*Invloed van uiteenlopende organische verbindingen in verschillende concentraties op de vermeerdering en de ademhaling van Nitrobacter.*

Winogradsky <sup>1)</sup>					Meyerhof			
Stof	Vermeerdering				Ademhaling			
	Begin van de remming		Volledige remming					
	Conc. in %	Mol. conc.	Conc. in %	Mol. conc.	Mol. conc.	Remming in %	Mol. conc.	Remming in %
Glucose	0,05	0,0025	0,2—0,3	0,01—0,015	0,3	0	0,6	10
Asparagine	0,05	0,0033	0,5—1,0	0,033—0,066	0,15	10—20		
Glycerine	0,05	0,0054	>1,0	>0,108				
Ureum	0,5	0,08	>1,0	>0,16	0,15	0	0,5	32
Na-acetaat	1,5	0,11	3,0	0,22	0,3	50		
Na-butyraat	0,5	0,05	1,0	0,1	0,15	43	0,3	50
Pepton	0,8		1,25					
Manniet					0,15	0		

0,01 M glucose geheel geremd. Als mogelijke verklaring oppert MEYERHOF de veronderstelling, dat de glucose niet zoo snel door den plasmawand binnendringt en dientengevolge eerst bij langere inwerking schadelijk voor de nitrificerende bacteriën zou worden. De mogelijkheid, dat het niet rein zijn van het door hem gebruikte bacteriën materiaal op de uitkomst van de met glucose verrichte ademhalingsproeven invloed heeft gehad, wordt niet door MEYERHOF overwogen. Hij is zich er wel terdege van bewust, dat het door hem gebruikte bacteriën materiaal zich niet leent voor proeven met organische stoffen, indien de proefnemingen langer dan 4 à 5 uren worden voortgezet. Nu vertrouwt MEYERHOF er mijns inziens echter te veel op, dat heterotrophe organismen zich in het minerale medium, dat bij de cultiveering van het bacteriën materiaal wordt gebruikt, slecht ontwikkelen. Hij meent dan ook, dat hij met eventuele infectie van het bacteriën materiaal bij proeven van korten duur niet veel rekening behoeft te houden. Mijn eerder medegedeelde ervaringen stemmen

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, in: F. LAFAR, Handb. d. techn. Mykol. III, 174, 1906.

in dit opzicht evenwel tot voorzichtigheid. Van alle door MEYERHOF op hun invloed op de ademhaling onderzochte organische verbindingen is glucose de eenige, welke door normale heterotrophe bacteriën gemakkelijk wordt geoxydeerd. Het leek mij daarom geenszins uitgesloten, dat de, in de proeven met glucose geconstateerde, ademhaling het gevolg zou zijn geweest van de mede-aanwezigheid van heterotrophe bacteriën. Het scheen dan ook de moeite waard, deze proeven nog eens te herhalen.

Hiervoor werd gebruik gemaakt van de bekende manometrische WARBURG-apparatuur, welke ook door MEYERHOF voor zijn proeven is toegepast.

Ik heb deze proeven alleen met *Nitrosomonas* verricht. Om een goed meetbare ademhaling te krijgen, moet er in de WARBURG-vaatjes een relatief groote hoeveelheid bacteriën materiaal aanwezig zijn. Hiervoor werd de inhoud van 4 cultuurkolfjes met 50 cc cultuurvloeistof, waaruit de ammoniak juist was verdwenen, gecentrifugeerd. Het uitgecentrifugeerde bacteriën materiaal werd vervolgens eenige malen met versche steriele cultuurvloeistof uitgewassen, totdat het nog maar een zeer zwakke nitrietreactie gaf, waarna het werd gesuspenseerd in 30 cc cultuurvloeistof. Van deze suspensie werd onder voortdurend omschudden 5 cc afgepipetteerd en in elk der vaatjes gebracht. Om het gevormde koolzuur te absorbeeren was in een afzonderlijke ruimte in het stofwisselingsvaatje barietwater aanwezig. De te onderzoeken organische stof bevond zich in opgelosten toestand in een zij-retortje, waaruit deze oplossing, door kantelen van het toestel, bij de bacteriënsuspensie kon worden gevoegd. De voor deze proeven gebruikte cultures werden vóór het centrifugeeren afgestreken op peptonagar om te controleeren, of het gebruikte materiaal inderdaad nog rein was.

Tijdens de proef werden de vaatjes voortdurend geschud, zoodat de vloeistof verzadigd bleef met zuurstof. Het resultaat vindt men in Tabel XXVIII. In de kolommen van deze tabel is opgegeven, hoeveel de druk in cm Brodie-vloeistof in de vaatjes tengevolge van de ademhaling is afgenomen gedurende het aan de linkerzijde vermelde tijdsverloop. Ik heb er van afgezien, van elk vaatje nauwkeurig het volume te bepalen, zoodat de gegeven cijfers slechts benaderende waarden zijn. Voor vergelijkende doeleinden zijn zij echter voldoende nauwkeurig. Ten naasten bij komt 1 cm Brodie-vloeistof in al deze gevallen overeen met 18 mm<sup>3</sup> zuurstof.



De getallen boven de gestippelde horizontale scheidingslijn geven de drukafneming aan vóór de toevoeging van de organische stof. De cijfers onder de getrokken horizontale lijn hebben betrekking op een periode van de proefneming, nadat het schudden en de waarnemingen gedurende 8 uren waren onderbroken.

TABEL XXVIII.

*Invloed van glucose en van glycocoll op de ademhaling van Nitrosomonas.*

Waarnemings- tijd in uren	Drukafneming in cm Brodie-vloeistof			
	geen toev.	0,1% glucose = 0,005 M	4% glucose = 0,2 M	0,2% glycocoll = 0,03 M
3	16.9	15.1	17.9	15.5
1	6.4	6.4	6.2	6.7
1	8.0	7.0	5.7	3.4
1	7.7	6.6	5.1	3.0
1	10.3	7.1	4.5	3.0
1		7.1	5.3	3.4
1	8	4.8	4.2	2.3
1	7.7	9.1	4.2	3.4
2	12.5	10.8	10.3	4.6
1	5.0	3.1	9.5	3.3
nitrietreactie na afloop . . . .	++++	++++	+++	+

Uit Tabel XXVIII volgt heel duidelijk, dat 0,1% glucose niet den minsten invloed heeft op de ademhaling. Dat dit ook werkelijk zoo is, bleek nog uit het feit, dat uit beide vaatjes na 24 uur de ammoniak nagenoeg was verdwenen. De teruggang van de ammoniakconcentratie is ook duidelijk te zien aan de ademhaling, welke in het laatste uur al sterk begint af te nemen. Met 0,2% glycocoll treedt daarentegen een sterke remming op, terwijl 4% glucose slechts matig remt. Ook hier was de sterkte der nitrietreactie na afloop van de proef in overeenstemming met de gevonden ademhaling.

Wel moet worden opgemerkt, dat aan het einde der proefneming alle cultures bij afstrijken op pepton-agar geïnfecteerd bleken te zijn. Dit was niet te verwonderen, daar de gebruikte vaatjes niet steriel

waren en ook de voorafgaande manipulaties niet onder volledig aseptische voorwaarden hadden plaats gehad. De waarden, gevonden voor de ademhaling na het langdurig stilstaan, zijn dus niet meer betrouwbaar.

Tegen de verwachting in bevestigen deze proeven dus het door MEYERHOF verkregen resultaat in groote trekken volkomen. Dat MEYERHOF vond, dat 4% glucose nog niet remt en er hier een merkbare remming viel waar te nemen, is van weinig belang. De remmende invloed van glucose op de ademhaling, vergeleken met dien van glycolli, is werkelijk onbetekenend. Wanneer glucose de ontwikkeling der nitrificerende bacteriën reeds in een concentratie van 0,2% volledig remt, is de oorzaak hiervan dus niet een remming van de ademhaling. Er moet hier dus een andere factor in het spel zijn. Een en ander noopte tot een nader onderzoek. Het leek mij nu niet uitgesloten, dat de door MEYERHOF geconstateerde, slechts geringe invloed van glucose op de ademhaling rechtstreeks verband zou houden met de krachtige aëratie van het medium, welke het gevolg is van het schudden in de WARBURG-apparatuur, en dat bij WINOGRADSKY'S groeiproeven de glucose in de zooveel zwakker geaëreerde cultures wel de ademhaling — en daarmee dus ook de ontwikkeling — der bacteriën aanmerkelijk zou remmen.

Het scheen de moeite waard, dit gezichtspunt experimenteel te toetsen. Om deze reden zette ik met *Nitrosomonas* eenige normale cultuurproeven in het gebruikelijke medium in, waaraan respectievelijk 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 en 4,0% glucose was toegevoegd. Van deze cultuurmedia werden nu twee reeksen bereid, waarvan er één in een schudapparaat werd geplaatst. De glucose werd niet met de andere zouten tezamen, maar afzonderlijk in leidingwater in reageerbuisen gesteriliseerd. Alle kolfjes werden geënt met 1 cc van een actieve cultuur. Na 10 dagen was uit alle kolfjes de ammoniak verdwenen, ook uit de niet geschudde. Het eerste oogenblik meende ik, dat dit een gevolg was van een vervluchtiging van de ammoniak uit de kolfjes, maar tot mijn groote verwondering werd in alle onderzochte media practisch de vereischte hoeveelheid nitriet hiervoor in de plaats gevonden.

Dit resultaat was wel zeer verrassend. Het zou alleen dan in overeenstemming zijn te brengen met de boven beschreven uitkomsten van WINOGRADSKY en MEYERHOF, indien men mocht aannemen, dat de waargenomen nitrificatie geheel op rekening moest



worden gesteld van de ademhaling der met de enting medegebrachte bacteriën.

In de eerste plaats leek het mij in dit verband van belang, de door WINOGRADSKY medegedeelde uitkomsten aangaande de remmende werking van organische stoffen op de vermeerdering der nitrificerende bacteriën nog eens aan een onderzoek te onderwerpen. Ten-einde te bereiken, dat hierbij een ingetreden nitrificatie inderdaad ook tot ontwikkeling der bacteriën zou mogen doen besluiten, was het uiteraard gewenscht, de media zeer zwak te enten. De kolfjes werden daarom voor deze proef met slechts 0,1 cc van een vloeistofcultuur, waaruit de ammoniak of het nitriet juist was verdwenen, geënt. De organische stoffen werden afzonderlijk gesteriliseerd en daarna aan het medium toegevoegd. Gedurende de proef werd eenige malen door afstrijken van de kolfjes op peptonagarplaten gecontroleerd, of de cultures bij de herhaalde monsterneming niet waren geïnfecteerd. De proef met *Nitrobacter* werd in 2 verschillende media genomen. Het ééne medium was het gewone van WINOGRADSKY en het andere was als volgt samengesteld: leidingwater + 0,1%  $K_2HPO_4$  + 0,2% NaCl + spoor ijzer + 0,1%  $CaCO_3$ . Dit laatste medium heeft een lagere pH dan dat van WINOGRADSKY, zoodat wij dus ook nog een indruk kunnen krijgen van den invloed van de pH op de remmende werking.

De pH werd na afloop van de proef met de glaselectrode gemeten. Het resultaat van deze proefnemingen, welke alle in duplo geschieden, vindt men in de Tabellen XXIX, XXX en XXXI. De in Tabel XXX vermelde proeven hebben betrekking op het medium van WINOGRADSKY, de in Tabel XXXI vermelde op het minder alkalische medium. Deze beide reeksen werden uit afzonderlijke cultures geënt.

Alvorens nu tot de bespreking van de verkregen uitkomsten over te gaan, wil ik er eerst even op wijzen, dat het in Tabel XXIX vermelde gedrag van Na-acetaat en Na-butyraat in een concentratie van 0,05 M ten opzichte van de vermeerdering van *Nitrosomonas* niet geheel juist is weergegeven. Feitelijk had er moeten staan, dat de vetzuren zouten in de genoemde concentratie de nitrificatie versnellen. In de vier contrôle-kolfjes zonder toevoegingen was nl. na 7 dagen nog een merkbare hoeveelheid ammoniak aanwezig, terwijl in die met de genoemde vetzuren zouten geen ammoniak meer was aan te toonen. In één der vier blanco-kolfjes was zelfs na 13 dagen nog wat ammo-

*Invloed van uiteenlopende organische verbindingen in verschillende concentraties op de vermeerdering van Nitrosomonas.*

Verbinding	Concentratie																
	0,005 M			in %	0,05 M			in %	0,2 M			in %					
	Remming		pH		Remming		pH		Remming		pH						
glucose . . . . .					+	+	+	+	8,5	1	+	+	+	+	8,5	4	
glycerine . . . . .							+		8,7	0,46			+		8,7	1,84	
manniet . . . . .							+		8,7	0,91			+		8,7	3,64	
glycocoll . . . . .	+	+	+	8,5	0,037	+	+	+	+	8,5	0,37						
asparagine . . . . .	+	+	+	8,5	0,075	+	+	+	+	8,5	0,75						
ureum . . . . .		+		8,7	0,03	+	+	+		8,7	0,3						
Na-formiaat . . . . .							—		8,7	0,34	+	+	+	+	8,9	1,36	
Na-acetaat 3 H <sub>2</sub> O							—		8,8	0,68		+	+		8,9	2,72	
Na-butyraat . . . . .							—		8,8	0,55	+	+	+	+	9,0	2,2	
Na-lactaat . . . . .							—		8,8	0,56	+	+	+	+	9,0	2,24	
Na-tartraat 2 H <sub>2</sub> O							+		8,8	1,15	+	+	+	+	9,0	4,6	
Na-citraat 11 H <sub>2</sub> O					+	+	+	+	9,5	3,57	+	+	+	+	9,6	14,3	
Na-oxalaat . . . . .					+	+	+	+	9,5	0,92	+	+	+	+	9,7	3,68	
Contrôle . . . . .									8,7						8,7		

## Toelichting:

Het aantal kruisjes is een maatstaf voor de remming.

- geen remming, na 7 dagen ammoniakreactie negatief.
- + zeer zwakke remming, na 13 dagen ammoniakreactie negatief.
- ++ sterke remming, na 25 dagen ammoniakreactie negatief.
- +++ zeer sterke remming, na 42 dagen ammoniakreactie negatief.
- ++++ volledige remming.



niak aanwezig. Er is dus van deze vetzure zouten eerder een stimulerende dan een remmende invloed op de vermeerdering uitgegaan, ondanks het feit, dat MEYERHOF vond, dat de ademhaling in dezelfde concentratie reeds voor 12% wordt geremd. Intusschen is dit resultaat in overeenstemming met de reeds in § 2 van dit Hoofdstuk meer terloops vermelde groeibevorderende werking van natriumacetaat.

Wanneer wij dan de mate van remming van de verschillende organische verbindingen vergelijken met de uitkomsten van het onderzoek van WINOGRADSKY, dan blijkt, dat er in deze zoowel voor *Nitrosomonas* als voor *Nitrobacter* vrijwel volledige overeenstemming heerscht. In de eerste plaats blijkt dan, dat inderdaad ook hier glucose den groei volledig remt in een concentratie, waarbij de vetzure zouten dit nog niet of nauwelijks doen. Eveneens komt met WINOGRADSKY overeen, dat glycerine en natriumbutyrat voor *Nitrobacter* schadelijker zijn dan voor *Nitrosomonas*, terwijl voor asparagine juist het omgekeerde geldt. Het eenige verschil is, dat WINOGRADSKY vond, dat ureum de nitratie sterker remt dan asparagine, terwijl uit mijn proefnemingen volgt, dat deze verbindingen in een concentratie van 0,005 M gelijk remmen en dat asparagine in de concentratie van 0,05 M veel minder remt dan ureum. Bij glycocoll vindt men ongeveer hetzelfde; in de concentratie van 0,005 M remt het de nitratie minder sterk dan asparagine en bij 0,05 M is het juist andersom. Dat er in het laatste geval geen vergissingen hadden plaats gehad wat betreft de toegevoegde hoeveelheden, kon achteraf nog colorimetrisch worden vastgesteld met het reagens van FOLIN.

Nu vond MEYERHOF, dat bij *Nitrobacter* de remmende werking van verbindingen met  $\text{NH}_2$ -groepen, evenals die van  $\text{NH}_3$ , met de pH toeneemt. Er is dus reden om na te gaan, of er ook in mijn proefnemingen enig verband is te vinden tusschen de pH en de waargenomen remming van de zoo juist genoemde verbindingen. Wanneer wij in Tabel XXX de aan het einde der proefneming gevonden waarden voor de pH van de cultuurvloeistof met 0,005 M glycocoll, asparagine en ureum vergelijken met de pH in cultuurvloeistoffen, waaraan 0,05 M van één van deze stoffen is toegevoegd, dan zien wij, dat de pH bij de hogere concentratie van asparagine abnormaal laag is. Toch is voor beide concentraties van asparagine de mate van remming dezelfde; de geringere schadelijke werking van de lage concentratie wordt dan als het ware gecompenseerd door

TABEL XXX.

*Invloed van uiteenlopende organische verbindingen in verschillende concentraties op de vermeerdering van Nitrobacter.*

Verbinding	Concentratie							
	0,005 M		0,05 M		0,2 M			
	Remming	pH	Remming	pH	Remming	pH		
glucose . . . . .			++++	++++	8,5	++++	++++	7,8
glycerine . . . . .			++++	++++	8,9	++	++	8,9
manniet . . . . .			—	—	9,0	—	—	8,7
glycocoll . . . . .	—	—	9,0	++++	++++	8,7		
asparagine . . . . .	++	++	8,8	++	++	8,2		
ureum . . . . .	++	++	8,8	++++	++++	8,6		
Na-formiaat . . . . .			—	—	9,0	++++	++++	8,6
Na-acetaat 3 H <sub>2</sub> O			—	—	9,0	++	++	8,9
Na-butyraat . . . . .			+	+	9,0	++++	++++	8,9
Na-lactaat . . . . .			+	++	8,8	++++	++++	9,3
Na-tartraat 2 H <sub>2</sub> O			—	—	9,0	—	—	9,0
Na-citraat 11 H <sub>2</sub> O			—	—	9,0	++++	++++	9,5
Na-oxalaat . . . . .			—	—	9,0	++++	++++	8,9
Contrôle . . . . .					9,0			9,0

## Toelichting:

- geen remming, na 13 dagen nitrietreactie negatief.
- ++ sterke remming, na 25 dagen nitrietreactie negatief.
- +++ zeer sterke remming, na 42 dagen nog nitriet, er kon evenwel duidelijk nitraat worden aangetoond.
- ++++ volledige remming.

de verhoogde werking als een gevolg van de hoogere pH. Bij glycocoll en ureum daarentegen is de pH voor beide concentraties nagenoeg gelijk, zoodat de remming dan ook in de hoogere concentratie toeneemt.

Deze uitkomsten zijn dus in bevredigende overeenstemming met de resultaten van MEYERHOF. Vergelijken wij echter Tabel XXX en XXXI, dan is voor geen der drie stoffen een vermindering van de remming bij lagere waarde van de pH te constateeren; bij ureum is zij eerder toegenomen. Men moet evenwel in het oog houden, dat het in Tabel XXX gebruikte medium merkbaar anders is samengesteld dan dat in Tabel XXXI.



TABEL XXXI.

*Invloed van uiteenlopende organische verbindingen in verschillende concentraties op de vermeerdering van Nitrobacter.*

Verbinding	Concentratie					
	0,005 M		0,05 M		0,2 M	
	Remming	pH	Remming	pH	Remming	pH
glucose . . . . .			+++++	7,3	+++++	7,2
glycerine . . . . .			++	8,4	+++++	8,4
manniet. . . . .			—	8,2	—	8,2
glycocoll . . . . .	—	8,2	+++++	8,3		
asparagine. . . . .	++	8,2	++	7,7		
ureum . . . . .	+++	8,4	+++++	8,3		
Na-formiaat . . . . .			—	8,9	+++++	8,4
Na-acetaat 3 H <sub>2</sub> O			—	8,3	+++++	8,3
Na-butyraat . . . . .			+++++	8,3	+++++	8,7
Na-lactaat . . . . .			+++++	7,3	+++++	5,9
Na-tartraat 2 H <sub>2</sub> O			—	8,3	—	8,6
Na-citraat 11 H <sub>2</sub> O			+++++	8,8	+++++	8,6
Na-oxalaat . . . . .			—	8,8	+++++	8,8
Contrôle . . . . .				8,2		8,2

## Toelichting:

- geen remming, na 18 dagen nitrietreactie negatief.  
 ++ sterke remming, na 27 dagen nitrietreactie negatief.  
 +++ zeer sterke remming, na 42 dagen nog nitrietreactie; nitraat duidelijk aan te toonen.  
 ++++ volledige remming.

Vergelijkt men de remming van de vetzuren uit Tabel XXX met die uit Tabel XXXI, dan ziet men, dat — afgezien van het tartraat, dat in het geheel niet remt — de remming toeneemt bij lagere pH.

Dat, zooals uit Tabel XXIX blijkt, Na-citraat en Na-oxalaat de nitritatie zoo sterk hebben geremd, zal wel het gevolg zijn geweest van de abnormaal hoge pH van de daarmede bereide media. Eigenaardig is nog, dat in Tabel XXX glycerine in de hoogere concentratie minder sterk heeft geremd dan in de lagere. Door de met zwavelzuur aangezuurde kolfjes met verdunde bichromaat-oplossing op te koken en vervolgens de intensiteit van de hierbij optredende groene kleur onderling te vergelijken, werd vastgesteld, dat er geen verwisseling van de kolfjes had plaats gehad.

Wanneer men nu de waargenomen remming van de vermeerdering

met de door MEYERHOF gevonden remming van de ademhaling vergelijkt, dan blijkt, dat ook bij deze proefneming doorgaans de mate van remming van de vermeerdering correspondeert met de mate van remming van de ademhaling. Zoo gaat bij glycocoll, asparagine en ureum, zoowel voor *Nitrosomonas* als voor *Nitrobacter*, een sterke remming van de ademhaling gepaard met een sterke remming van den groei, terwijl de zwakke remming van de ademhaling door manniet samengaat met een zwakke remming van den groei.

Er zijn evenwel ook gevallen, waarin deze paralleliteit niet aanwezig is. Zoo remt bijv. asparagine de ademhaling van *Nitrobacter* sterker dan ureum, terwijl dit voor den groei van dit organisme juist omgekeerd is. Eveneens remmen natriumacetaat en natriumbutyraat in een concentratie van 0,05 m de ademhaling van *Nitrosomonas* sterker dan manniet in dezelfde concentratie, terwijl hier voor de vermeerdering het omgekeerde geldt.

Maar ook, wanneer men het gedrag der beide organismen onderling vergelijkt, zal men in vele gevallen bevestigd vinden, dat het organisme, waarvan de ademhaling door een gegeven stof in een bepaalde concentratie het sterkst wordt geremd, door die stof in zijn groei eveneens het sterkst wordt belemmerd. Zoo remmen asparagine en manniet beide de ademhaling van *Nitrobacter* minder sterk dan die van *Nitrosomonas* en dienovereenkomstig wordt ook de groei van eerstgenoemd organisme het minst geremd. Voor natriumbutyraat geldt hetzelfde; deze verbinding remt de ademhaling van *Nitrosomonas* minder dan die van *Nitrobacter* en zoo wordt ook de groei van eerstgenoemd organisme het minst geremd.

Toch zijn er ook uitzonderingen op dezen regel. Zoo wordt door ureum de ademhaling van *Nitrobacter* minder geremd dan die van *Nitrosomonas*, terwijl voor den groei het omgekeerde geldt.

Een scherpe tegenstelling in den invloed op de ademhaling en op den groei treedt nu echter aan het licht, wanneer wij dan tenslotte het geval van de glucose in beschouwing nemen. Het moet toch worden geaccentueerd, dat glucose zich bij deze proefnemingenreeks weer geheel heeft gedragen, zooals dit op grond van de oorspronkelijke waarnemingen van WINOGRADSKY mocht worden verwacht. Dit resultaat is nu wel zeer merkwaardig met het oog op de eerder door mij verrichte waarnemingen, waarbij ik zelfs in een medium met 4% glucose een zeer volledige nitrificatie had vastgesteld.



Wanneer wij ons afvragen, wat aan deze tegenstrijdigheid ten grondslag kan liggen, dan valt als eenige oorzaak aan te voeren, dat bij de laatstgenomen proevenreeks zooveel zwakker was geënt dan bij de eerder vermelde proefnemingen.

Met dit gezichtspunt voor oogen scheen er nu toch aanleiding te bestaan om te besluiten, dat de aanvankelijk in de glucosehoudende media vastgestelde nitritatie inderdaad zou moeten worden toegeschreven aan een voortgezette ademhaling van de, met de enting in het medium gebrachte, bacteriën. In dit verband mag niet onvermeld blijven, dat ook WINOGRADSKY <sup>1)</sup> reeds had vastgesteld, dat *Nitrobacter* bij wat sterkere enting in een medium, dat 0,2% glucose bevatte, nog wel eenige nitratatie bewerkte. Ook hij schrijft dit toe aan de oxydeerende werkzaamheid van de, met de enting meegebrachte, bacteriën, ook bij uitsluiting van vermeerdering dier bacteriën.

Toch kon deze verklaring mij niet bevredigen; het leek mij te onwaarschijnlijk, dat de, bij de relatief sterkere enting geconstateerde, practisch volledige nitritatie het gevolg zou zijn geweest van een ademhaling onder uitsluiting van bacteriënvermeerdering. Immers er was ook voor deze enting toch altijd niet meer dan 1 cc van een actieve cultuur gebruikt en het leek niet denkbaar, dat de betreffende geringe hoeveelheid daarin aanwezig bacteriën materiaal de ammoniak met een snelheid zou oxydeeren, welke practisch overeenkwam met die van een, in een normaal medium zich krachtig vermeerderende, cultuur.

Ik bleef dus geneigd, met de mogelijkheid rekening te houden, dat er, om welke reden dan ook, in het medium met 4% glucose toch vermeerdering van de nitriteerende bacteriën had plaats gevonden. Om deze reden besloot ik, de cultuurproeven in tegenwoordigheid van glucose nog eens te herhalen en ditmaal zoowel voor *Nitrosomonas* als voor *Nitrobacter*. En wel geschiedde dit in media met verschillende glucoseconcentraties.

Daarom werden de gebruikelijke media, waaraan respectievelijk 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 en 4% glucose was toegevoegd, wederom met 1 cc van een goed actieve cultuur geënt. Deze proefnemingen geschiedden alle in duplo. Het bleek nu, dat inderdaad weer na 10 dagen in alle gevallen een goede nitritatie, resp. nitratatie, kon worden vastgesteld.

<sup>1)</sup> S. WINOGRADSKY, in: F. LAFAR, Handb. d. techn. Mykologie III, 174, 1906.

Om nu uit te maken, in hoeverre deze resultaten al dan niet te danken waren aan in de media ingetreden bacteriënvermeerdering, werden deze kolfjes gebruikt om daarmee weer een nieuwe serie kolfjes met overeenkomstige glucoseconcentraties te enten. Indien nu ook deze serie nitrificatie te zien zou geven, dan zou de mogelijkheid, dat deze aan de ademhaling van de, bij de nieuwe enting toch meegebrachte, bacteriën zou moeten worden toegeschreven, wel geheel zijn uitgesloten. En indien dan ook nog hernieuwde overentingen tot nitrificatie zouden leiden, mocht wel met absolute zekerheid tot vermeerdering der nitrificeerende bacteriën in de glucosehoudende media worden besloten.

De resultaten van de hierop betrekking hebbende proefnemingen kunnen kort worden samengevat in de uitspraak, dat het in nagenoeg alle gevallen mogelijk bleek, zoowel *Nitrosomonas* als *Nitrobacter*, ook bij voortgezette cultuur, in de glucosehoudende media aan te houden. Voor *Nitrosomonas* werd in niet minder dan 4 achtereenvolgende overentingen geconstateerd, dat de nitritatie zich goed bleef voltrekken. Met dit resultaat voor oogen leek het niet noodig, voor *Nitrobacter* de proefneming zoo lang voort te zetten, daar ook de tweede overenting nog met onveranderde snelheid nitrateerde.

In een enkel geval werd voor *Nitrosomonas* nagegaan, in hoeverre ook bij voortgezette toevoeging van ammoniumsulfaat aan een bepaalde cultuur deze steeds weer door de bacteriën werd verwerkt. Het bleek hierbij mogelijk, in een proefneming, welke zich over anderhalve maand uitstreckte, op deze wijze in een 2% glucose bevattend medium  $4 \times 50$  mg ammoniumsulfaat te oxydeeren.

Niet onvermeld mag blijven, dat door op gezette tijden uit de kolfjes af te strijken op peptonagar- en op peptonagar 2% glucoseplaten werd nagegaan, of geen infectie met heterotrophe bacteriën had plaats gevonden. Slechts in een enkel kolfje, dat dan verder bij de proefneming werd uitgeschakeld, werd een schimmelinfectie geconstateerd.

Ook overtuigde ik er mij in verschillende gevallen van, dat er aan het einde der proefneming nog rijkelijk glucose aanwezig was. Voor de cultures van *Nitrobacter* kon door quantitative bepalingen worden vastgesteld, dat de toegevoegde hoeveelheid glucose nog onveranderd aanwezig was; een vermindering van eenige be-



teekenis was althans niet vast te stellen. In de cultures van *Nitrosomonas* stuitte een nauwkeurige bepaling van de glucose op eenige bezwaren in verband met het aanwezige nitriet; toch kon ook hierin nog met zekerheid de aanwezigheid van een hoog percentage van de toegevoegde glucose worden aangetoond.

Wel werden bij deze proefnemingen eenige ervaringen opgedaan, welke hier niet onvermeld mogen blijven. In de eerste plaats wel deze, dat, ofschoon de bacteriën in alle glucoseconcentraties waren aan te houden, toch moest worden geconstateerd, dat niet zelden enkele overentingen niet op gang kwamen. In den regel deed de duploculture dit dan wel, zoodat het uiteindelijke resultaat niet in gevaar werd gebracht. In het algemeen trad dit verschijnsel bij *Nitrosomonas* veelvuldiger op dan bij *Nitrobacter*, terwijl het opmerkelijk was, dat dergelijke negatieve resultaten bij alle suikerconcentraties min of meer gelijkelijk verdeeld voorkwamen. Slechts werden voor *Nitrobacter* speciaal bij het 4% glucose-medium moeilijkheden ondervonden. Een tweede belangrijke ervaring, welke ik geleidelijk opdeed, was, dat de overentingen in het bijzonder niet slaagden, wanneer deze plaats hadden uit media, waaruit de ammoniak, respectievelijk het nitriet, reeds volledig was verdwenen. Wel was het dan soms nog mogelijk, dergelijke verzwakte cultures weer te doen opleven door in de kolfjes zelf opnieuw ammoniumsulfaat, resp. nitriet, toe te voegen.

De vraag rijst nu, of het mogelijk is, voor het boven beschreven merkwaardige gedrag van glucose ten opzichte van de nitrificeerende bacteriën eenige verklaring te geven. De omstandigheid, dat de overentingsproeven uit de glucosehoudende media leeren, dat de glucose blijkbaar eerst een schadelijke werking op de bacteriën gaat uitoefenen, zoodra de normale ademhalingssubstraten — ammoniak voor *Nitrosomonas* en nitriet voor *Nitrobacter* — zijn verbruikt, doet besluiten, dat de aanwezigheid van deze anorganische substraten in het medium voldoende is om de glucose van het katalysatorsysteem der bacteriën af te houden. Een en ander althans voor zoover de bacteriën in een toestand van actieve stofwisseling verkeeren. Iets analogoos is bijv. door WIELAND en BERTHO <sup>1)</sup> beschreven voor de ademhaling der azijnbacteriën, welke door

---

<sup>1)</sup> H. WIELAND und A. BERTHO, Liebigs Ann. 467, 95, 1928.



toevoeging van chinon aan het medium tijdelijk — d. w. z. totdat volledige reductie tot hydrochinon heeft plaatsgevonden — wordt stopgezet. Dit vindt zijn verklaring hierin, dat, wanneer chinon en zuurstof als waterstofacceptor bij de dehydrogenatie van het ademhalingssubstraat concurreren, het chinon er in slaagt, de op zichzelf toch als acceptor alleszins bruikbare zuurstof geheel van het katalysatorsysteem af te houden. Deze beschouwing is nu wellicht geschikt om een verklaring te geven van het principiële verschillende gedrag van de nitrificerende cultures bij enting in glucosehoudende media bij uiteenlopende sterkte van enting. Het is toch een bekend feit, dat bij toepassing van zwakke entingen in steriele media doorgaans een z.g.n. „lag phase” intreedt, d. w. z. dat de bacteriënstofwisseling in belangrijke mate wordt verstoord en dientengevolge de bacteriënvermeerdering aanvankelijk geheel stop staat en eerst wederom intreedt, wanneer er een zekere wisselwerking tusschen de bacteriën en het haar direct omringende milieu heeft plaatsgevonden. Bij sterkere enting pleegt de „lag phase” aanmerkelijk te worden verkort, zij kan zelfs onder omstandigheden geheel wegvallen. Het is nu zeker denkbaar, dat bij de toegepaste sterke entingen plaatselijk in de cultures voorwaarden aanwezig waren, welke een voortzetting van de actieve stofwisseling voor een deel der enting toelieten. Uit een dergelijk actief centrum kan dan geleidelijk de geheele cultuur worden bevolkt.

Door de geslaagde cultuurproeven in de glucosehoudende media is de tot dusver bestaande tegenstelling in de uitkomsten van WINOGRADSKY en van MEYERHOF opgehelderd. In overeenstemming met het feit, dat glucose zelfs in vrij hoge concentratie de ademhaling niet remt, is toch vastgesteld, dat de beide nitrificerende bacteriënsoorten zich ook in dergelijke glucosehoudende media voortreffelijk kunnen vermeerderen. Er bestaat dan ook alle reden om aan te nemen, dat een remmende werking van organische stoffen op de vermeerdering van de bewuste bacteriën steeds parallel gaat met een remming van de ademhaling door deze stoffen en daarin dan ook hare verklaring vindt. Slechts doet zich in het geval van de glucose de complicatie voor, dat deze stof niet in staat is, bij actief stofwisselende cellen de normale anorganische substraten van den ademhalingskatalysator te verdringen, doch dat zij anderzijds wel blokkeerend werkt op dezen katalysator, wanneer zij daarmee in aanraking komt bij afwezigheid dezer substraten.



§ 6. SLOTBESCHOUWING OVER DE BETREKKINGEN TUSSCHEN DE NITRIFICEERENDE BACTERIËN EN DE ORGANISCHE STOF.

Wanneer wij dan tenslotte op grond van de in het voorafgaande medegedeelde waarnemingen de betrekkingen tusschen de nitrificerende bacteriën en de organische stof nog eens overzien, dan laat zich het volgende opmerken. In de eerste plaats moet dan worden geconstateerd, dat de gangbare meening, dat de organische stof voor deze organismen steeds hetzij indifferent, hetzij schadelijk is, zeker herziening behoeft. Onder omstandigheden kan toch van de aanwezigheid van bepaalde organische stoffen in het medium der nitrificerende bacteriën zeker een gunstige invloed op de levensverrichtingen dier organismen uitgaan. Wat nu de schadelijke invloed van sommige organische stoffen betreft, is het door het in de beide voorafgaande paragrafen medegedeelde aannemelijk geworden, dat een schadelijke invloed op de vermeerdering der bestudeerde bacteriën steeds parallel gaat met een remming van het ademhalingsproces. Met andere woorden berust genoemde schadelijke invloed op een verdringing der anorganische ademhalingssubstraten door de bewuste organische stoffen.

De eerder genoemde gunstige werking van andere organische stoffen leidt ertoe, nog even de vraag onder de oogen te zien, in hoeverre in deze vaststelling een aantasting van het obligaat autotrophe karakter der nitrificerende bacteriën is gelegen. Wij zagen echter reeds in § 3, dat, ondanks de gelijktijdige aanwezigheid van gunstig werkende organische stoffen, zoowel de gebruikelijke anorganische ademhalingssubstraten als ook het koolzuur als bouwstenen voor de nieuwe celbestanddeelen ten eenen male onmisbaar zijn. Op grond van deze waarnemingen zou men dus geneigd zijn, het streng autotrophe <sup>1)</sup> karakter der bestudeerde bacteriën ten volle te handhaven. Daartegenover moet dan echter het volgende worden opgemerkt. In de eerste plaats hebben wij er reeds op gewezen, dat aan de bedoelde proefnemingen niet het bewijs is te ontleenen, dat niet sommige organische bestanddeelen van het gebruikte medium mede voor den opbouw van nieuwe celbestanddeelen worden verwerkt. Toch is dit zeker geenszins uitgesloten en a priori zelfs tot op zekere hoogte waarschijnlijk.

---

<sup>1)</sup> Overeenkomstig de nomenclatuur van PRINGSHEIM (zie hieronder): chemoautotrophe.

Wanneer wij ons toch een oogenblik indenken, wat de opbouw van nieuw celmateriaal uit koolzuur eigenlijk omvat, dan kunnen wij niet aan de conclusie ontsnappen, dat dit proces de intermediaire vorming van uiteenlopende, eenvoudige organische verbindingen met zich brengt. En dan laat het zich niet inzien, dat, wanneer de cellen der nitrificeerende bacteriën dezelfde organische verbindingen in het haar omringende medium aantreffen, zij deze ook niet in hare syntheses zullen betrekken.

Ook de omstandigheid, dat Nährstoff-Heyden — en zooals mij later is gebleken ook andere organische stoffen bijv. pepton en glucose — bij toevoeging aan het anorganische medium van rein-cultures van nitrificeerende bacteriën de daarin aanwezige oxydatie-reductiepotentiaal beïnvloedt, doet besluiten, dat onder den invloed dezer bacteriën genoemde organische stoffen chemische veranderingen ondergaan. Immers bij afwezigheid der bacteriën heeft een dergelijke toevoeging aan het medium geen invloed op de aan de edelmetaal-electroden optredende potentiaalverschillen.

Op grond van deze laatste overwegingen willen wij dus nog de mogelijkheid openlaten, dat nadere onderzoekingen ertoe zouden kunnen leiden, de stofwisseling der nitrificeerende bacteriën als „chemomixotrooph” te karakteriseeren, welk woord dan wordt gevormd in analogie met het door PRINGSHEIM <sup>1)</sup> gegeven indeelings-systeem der stofwisselingstypen en waarbij het begrip „mixotrooph” wordt gebruikt in de beteekenis, welke daaraan — in afwijking van de meer gangbare opvatting — terecht door LIESKE <sup>2)</sup> is gegeven.

---

<sup>1)</sup> E. G. PRINGSHEIM, Die Naturwissenschaften 20, 479, 1932.

<sup>2)</sup> R. LIESKE, Centralbl. f. Bakt. II, 49, 413, 1919.



## HOOFDSTUK VI.

### OVER *HYPHOMICROBIUM VULGARE* STUTZER ET HARTLEB.

#### § 1. OVERZICHT DER VROEGERE ONDERZOEKINGEN.

In de voorafgaande hoofdstukken is meermalen ter sprake gekomen, dat men tijdens de bestudeering van de nitrificerende bacteriën herhaaldelijk kennis maakt met begeleidende organismen, welke zelf geen nitrificerend vermogen bezitten. Nu zal het ongetwijfeld zijn nut hebben, de bacteriën, welke regelmatig worden aangetroffen bij het in reïncultuur brengen van de nitrificerende bacteriën, nader te leeren kennen. Een nadere bestudeering van deze begeleidende bacteriën zou mij echter in het algemeen te ver hebben gevoerd. Ik heb evenwel gemeend, om verschillende redenen voor *Hyphomicrobium vulgare* een uitzondering te moeten maken. Ten eerste op grond van de merkwaardige groeiwijze van deze bacteriesoort, welke reeds daarom ongetwijfeld meer algemeene bekendheid verdient. Maar verder ook, omdat dit organisme, zooals uit de litteratuur blijkt, zeer regelmatig in ophooping van nitrificerende bacteriën, in het bijzonder van *Nitrobacter*, wordt aangetroffen en verschillende onderzoekers het maken van reïncultures van *Nitrobacter* zeer heeft bemoeilijkt.

In Hoofdstuk I vermeldden wij reeds, dat RULLMANN<sup>1)</sup>, STUTZER en HARTLEB<sup>2)</sup>, JOSHI<sup>3)</sup>, FRED en DAVENPORT<sup>4)</sup>, PROUTY<sup>5)</sup> en GIBBS<sup>6)</sup> dit organisme hebben ontmoet.

Uit het feit, dat *Hyphomicrobium* zoowel in Engelsch-Indië als in Amerika en Europa is gevonden, mag worden geconcludeerd, dat deze bacterie in den grond zeer verspreid voorkomt.

JOSHI en FRED en DAVENPORT hebben echter den waren aard van

<sup>1)</sup> W. RULLMANN, Centralbl. f. Bakt. II, 3, 229, 1897; *ibid.* 4, 152, 1898; *ibid.* 5, 716, 1899.

<sup>2)</sup> A. STUTZER und R. HARTLEB, Centralbl. f. Bakt. II, 3, 621, 1897; *ibid.* 5, 678, 1899; A. STUTZER und R. HARTLEB, Mitt. landw. Inst. Breslau, 1, 75, 197, 1899.

<sup>3)</sup> N. V. JOSHI, Memoirs of the Departm. of Agricult. in India, 1, 86, 1915.

<sup>4)</sup> E. B. FRED and A. DAVENPORT, Soil Science 11, 389, 1921.

<sup>5)</sup> CHAS. C. PROUTY, Soil Science 28, 125, 1929.

<sup>6)</sup> W. M. GIBBS, Soil Science 8, 427, 1919.

dit organisme niet gerealiseerd, zij hielden het voor een nitrificerende bacterie. Wij moeten hieruit besluiten, dat zij mengcultures van *Nitrobacter* en *Hyphomicrobium* in handen hebben gehad. Dit wordt des te eerder begrijpelijk, wanneer men weet, dat het kolonietype van dit organisme zeer veel gelijk op dat van *Nitrobacter* en ook de bacterie zelve, wat vorm en grootte betreft, zeer veel gelijkenis met *Nitrobacter* vertoont.

Doordat *Hyphomicrobium* zulke lage eischen stelt aan zijn koolstofvoedsel, groeit het in de, voor het cultiveeren van *Nitrobacter* gebruikte, media even goed als laatstgenoemd organisme. Het kan dus niet verwonderen, dat deze twee micro-organismen moeilijk van elkaar zijn te scheiden.

Het organisme werd het eerst door RULLMANN ontdekt en wel in de door dezen onderzoeker ingezette nitrificatieophooping. Daar hij aanvankelijk meende, dat dit micro-organisme nitriteerend vermogen bezat, werd het door hem onder den naam „*Nitrosobacterium formae novae*” beschreven. RULLMANN heeft een praeparaat van dit micro-organisme aan WINOGRADSKY gezonden om diens meening over deze merkwaardige groeivormen te hooren. WINOGRADSKY stuurde aan RULLMANN een photo van een ophooping van *Nitrosomonas*, waarin deze bacterie voorkwam, onder mededeeling, dat ook hij de groeiwijze zeer merkwaardig vond, maar dat hij er geen verklaring voor wist. WINOGRADSKY heeft, voor zoover mij bekend, verder nooit eenige aandacht aan dit organisme besteed.

STUTZER en HARTLEB meenden aanvankelijk, dat het bewuste organisme, dat zij geregeld in hun *Nitrobacter*-ophooping tegenkwamen, een bijzondere vorm was van hun „*Salpeterpilz*”. Ook hielden zij het langen tijd voor identiek met *Nitrobacter*. Het kostte hun veel moeite, het van *Nitrobacter* te scheiden. Nadat zij er in waren geslaagd, het gezochte organisme in reïncultuur te brengen, zagen zij evenwel in, dat hun vermoeden niet juist was. Genoemde onderzoekers maakten nu een uitvoerige studie van dit organisme, waaraan zij den naam *Hyphomicrobium vulgare* gaven. In alle door hen onderzochte grondsoorten met nitrificeerend vermogen, welke uit nageoeg alle deelen der wereld afkomstig waren, troffen zij *Hyphomicrobium* aan. Op grond van het feit, dat *Hyphomicrobium* steeds in de ophooping van *Nitrobacter* aanwezig was, achtten zij het niet uitgesloten, dat dit organisme op de een of andere wijze de nitrificatie begunstigde.



Het in reïncultuur brengen geschiedde met behulp van nitriet-agarplaten. Toen zij over de reïncultuur beschikten, verrichtten zij eenige onderzoekingen over de stofwisseling van het organisme.

Ten eerste stelden zij vast, dat *Hyphomicrobium* groeide in een oplossing, welke bevatte: 0,05% neutraal kaliumphosphaat, 0,05% natriumchloride, 0,03% magnesiumsulfaat en 0,2% kaliumnitraat, maar dat het beter groeide, wanneer nog 0,2% natriumcarbonaat werd toegevoegd. Naar aanleiding van hun waarnemingen, dat *Hyphomicrobium* niet groeide in een kolfje met bovengenoemde cultuurvloeistof zonder natriumcarbonaat, althans wanneer dit kolfje met kaliloog van de lucht was afgesloten, maar dat het in deze cultuurvloeistof wel wilde groeien, indien natriumcarbonaat was toegevoegd, concludeerden zij, dat dit organisme koolzuur kan assimileren. Weliswaar maken zij hierbij eenig voorbehoud, omdat zij het niet uitgesloten achten, dat *Hyphomicrobium* zou zijn gegroeid ten koste van spoortjes organische stof, welke mogelijk nog in het medium aanwezig waren en ook omdat het onbegrijpelijk is, „in welcher Weise das CO<sub>2</sub>-Molekül behufs Assimilation von *Hyphomicrobium* gespalten werden könnte”. Dit neemt evenwel niet weg, dat zij probeerden, of er nog andere carbonaten waren, welke als koolstofbron zouden kunnen dienst doen. Daar het ook hun aandacht trok, dat *Hyphomicrobium* met zoo weinig stikstof toe kon, probeerden zij eveneens, of dit organisme ook stikstof kon binden. Dit bleek niet het geval te zijn. Ook werd vastgesteld, dat nitraten onder anaërobe voorwaarden niet werden gereduceerd.

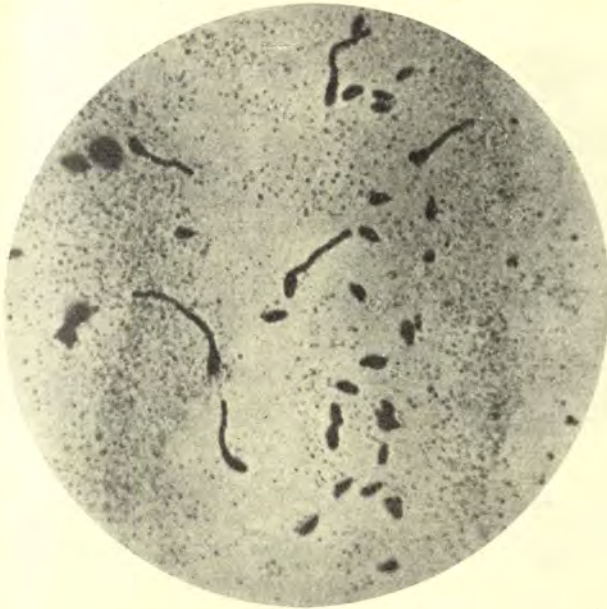
Tenslotte probeerden deze onderzoekers, welke organische verbindingen een goed voedsel waren voor *Hyphomicrobium*. Het bleek, dat het organisme niet groeide in vleeschbouillon en in peptonwater. Zij gebruiken dan ook als criterium voor de reinheid der cultures, dat de genoemde media, wanneer zij hiermede worden geënt, niet troebel mogen worden.

In een oplossing van asparagine groeide *Hyphomicrobium* wel. In een oplossing, welke nitraat als stikstofbron bevatte, ontwikkelde *Hyphomicrobium* zich goed, indien glycerine of manniet als koolstofvoedsel werden toegevoegd. Daarentegen waren rietsuiker en glucose als zoodanig geheel ongeschikt.

Ook de vetzure zouten bleken een goede koolstofbron te zijn. Uit dit alles krijgen wij dus den indruk, dat *Hyphomicrobium* vrij grillig is in de keuze van zijn koolstofvoedsel.

§ 2. ISOLATIE EN MORPHOLOGIE VAN *HYPHOMICROBIUM VULGARE*.

Het eerst werd dit micro-organisme door mij waargenomen bij het microscopeeren van vlokjes „activated sludge” met „Dunkelfeld”-verlichting. Uit vele van deze vlokjes zag ik dunne draden komen, welke aan het einde een dun knopje droegen. Later kwam ik deze zelfde stelen met knopjes in grooten getale tegen in de ophoo-



Afb. 31.

*Hyphomicrobium*.

Zettnow-kleuring. Aplan. cond.; apochr. N.A. 1.4; proj. oc.  
(Vergr. 1600 ×).

pingen van *Nitrobacter*, waarbij bleek, dat in de meeste gevallen aan beide einden van het draadje een knopje zat. Meestal was het eene knopje merkbaar grooter dan het andere; het bleek verder, dat bij normale belichting van deze steeltjes niets was te zien. Dit laatste feit zal er veel toe hebben bijgedragen, dat dit zoo merkwaardige micro-organisme zoo weinig bekend is geworden. Behalve in „Dunkelfeld” kon ik de steeltjes slechts door kleuren, bijv. met carbol-fuchsine, zichtbaar maken. Vooral de ZETTNOW-kleuring was hiervoor



zeer geschikt (Zie: Afb. 31). Wanneer men niet beter wist, zou men dit voor een ciliënpraeparaat houden, waarbij de ciliën door forsche beitsing te dik zijn geworden.

Ondanks de aanwijzingen van STUTZER en HARTLEB gaf de isolatie van *Hyphomicrobium* meer moeite dan ik had verwacht. In de koloniën, welke ik op nitrietagarplaten kreeg, door uit een ophooping van *Nitrobacter* af te strijken, vond ik nooit bacteriën met steeltjes. De oorzaak hiervan zou kunnen zijn, dat *Hyphomicrobium* niet op deze



Afb. 32.

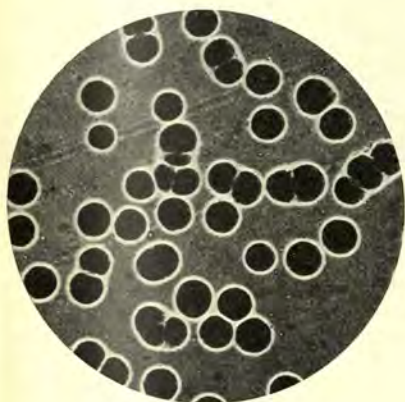
*Hyphomicrobium*.

In peptonwater. Cardioïd-cond.;  
apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).

platen wilde groeien, maar ook is het mogelijk, dat de gebruikte ophoopingsmedia nog te arm waren aan het gezochte organisme. Ook ophooping in een medium met natriumformiaat, zooals dit door STUTZER en HARTLEB was aangegeven, slaagden aanvankelijk niet. Tenslotte gelukte het mij, uitgaande van een uitgedroogde ruwcultuur van *Nitrobacter*, *Hyphomicrobium* in cultuur te krijgen. Uit dit kolfje werd geënt in het gewone cultuurmedium voor *Nitrobacter* en eveneens in hetzelfde medium met natriumformiaat. In beide media kwam het gezochte organisme goed tot ontwikkeling. Ook later

bij het aanhouden van mijn cultures bleek, dat *Hyphomicrobium* uitdrogen zeer goed weerstaat. Uit bovengenoemde cultures werd nu afgestreaken op kiezelzuurplaten. Ik vond op deze platen platte koloniën, welke afkomstig bleken te zijn van *Hyphomicrobium*, daar het microscopisch praeparaat in het „Dunkelfeld” talrijke bacteriën met de typische steeltjes te zien gaf. De koloniën bereikten een doorsnede van 0,5—1 mm. Met een pipetje werd een kolonie opgezogen, in een druppel steriel water uitgeblazen en opnieuw afgestreaken op een kiezelzuurplaat. Op deze plaat kreeg ik weer hetzelfde type koloniën. Hiervan werden eenige geënt zoowel in het cultuurmedium voor *Nitrobacter* als in peptonwater. Met het bloote oog was van

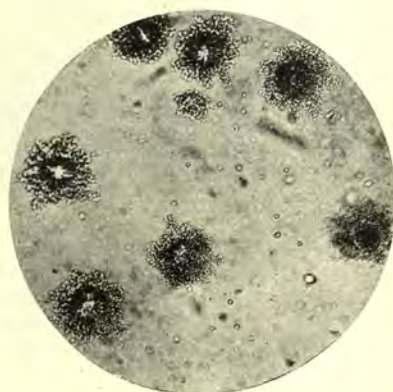
eenige ontwikkeling in deze media niets waar te nemen; het geënte kolfje leek iets meer troebel dan een ongeënt kolfje, doch met zekerheid was dit niet te zeggen. Bij microscopisch onderzoek bleek echter, dat *Hyphomicrobium* zeer goed was gegroeid. Afb. 32 geeft een beeld van de daarin aangetroffen groeiwijze. Uit het kolfje met peptonwater werd op pepton-agar afgestrekten. In de eerste vijf dagen was op deze platen met het bloote oog nog niets te zien, maar met den microscoop waren al duidelijk heel kleine koloniën waar te



Afb. 33.

*Hyphomicrobium*.

Jonge koloniën op pepton-agar.  
(Vergr. 85 ×).



Afb. 34.

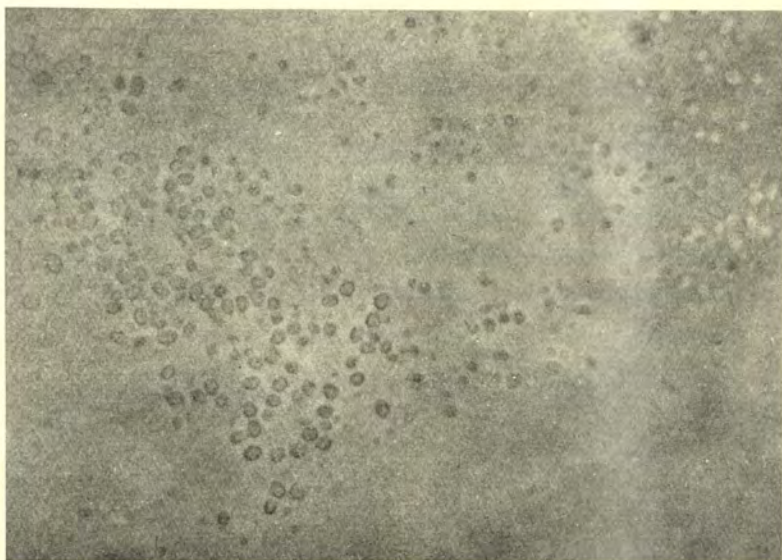
*Hyphomicrobium*.

Oude koloniën op pepton-agar.  
(Vergr. 85 ×).

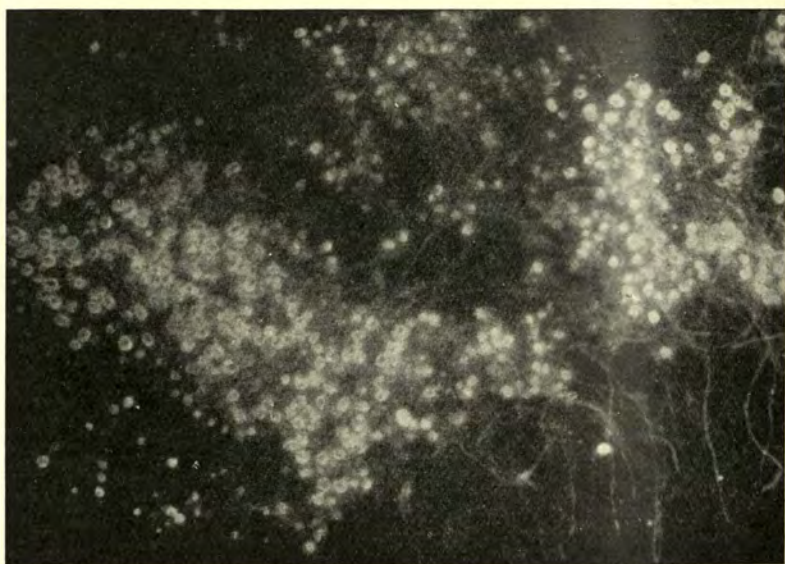
nemen. Na een dag of tien kon men de koloniën echter ook met het bloote oog zien. Op Afb. 33 vindt men een photo van jonge koloniën op een pepton-agarplaat en in Afb. 34 koloniën van een oude plaat. Ook van één dezer platen werd een kolonie gesuspendeerd en opnieuw afgestrekten op pepton-agar. Op deze plaat kreeg ik maar één type koloniën en wel hetzelfde als dat van de vorige plaat. Ik mocht de verkregen cultuur dus als rein beschouwen.

In tegenstelling met hetgeen STUTZER en HARTLEB mededeelen, moet ik dus besluiten, dat *Hyphomicrobium* wel op pepton-agar en in peptonwater groeit. Het lijkt waarschijnlijk, dat deze tegenstrijdigheid een gevolg is van het feit, dat vroeger weinig aandacht aan den zuurgraad dezer media werd geschonken.

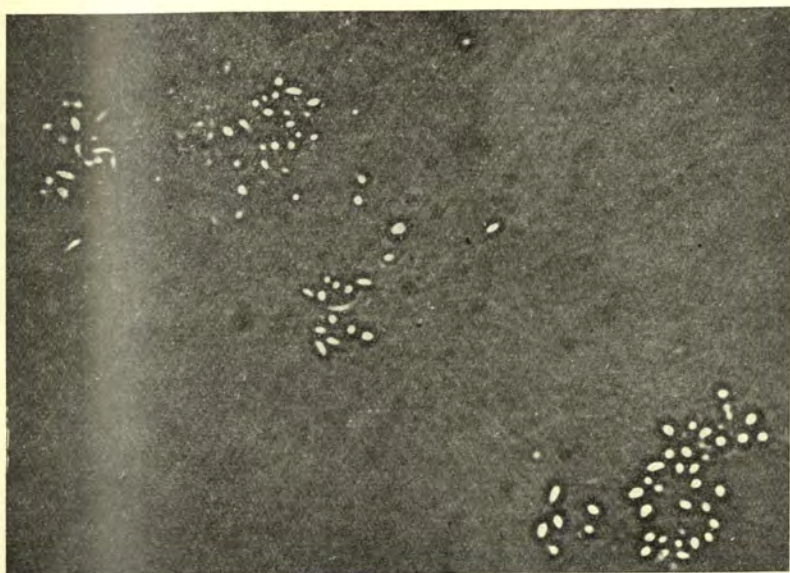




Afb. 35.  
*Hyphomicrobium*  
(Scherp ingesteld.)  
Aplan. cond.; apochr. N.A. 1.4; comp. oc. 12 ×  
(Vergr. 1400 ×).



Afb. 36.  
*Hyphomicrobium*.  
Cardioïd cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).

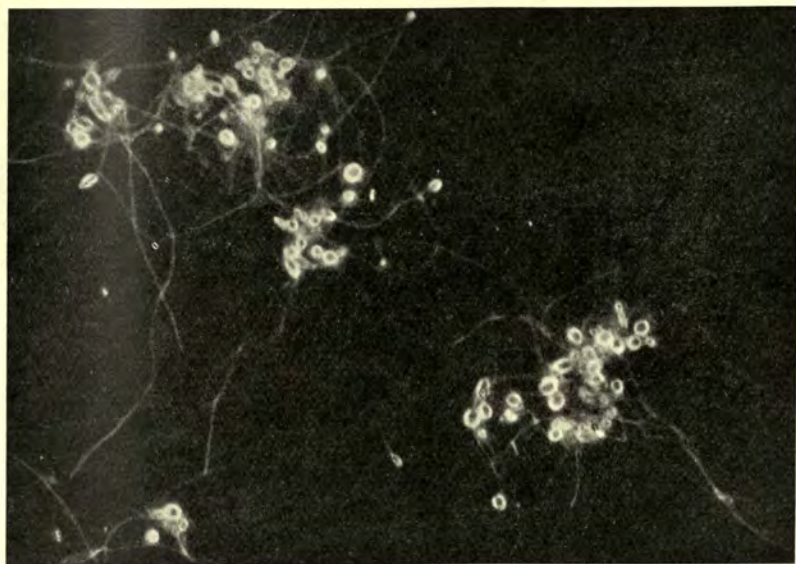


Afb. 37.

*Hyphomicrobium.*

(Onscherp ingesteld.)

Aplan. cond.; apochr. N.A. 1.4; comp. oc. 12 ×  
(Vergr. 1400 ×).



Afb. 38.

*Hyphomicrobium.*

Cardioid cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).



Ook uit cultures van *Nitrosomonas* kon ik met behulp van nitriet-agarplaten *Hyphomicrobium* isoleeren. Tenslotte bleek mij, dat druppels van zeer langzaam lekkende, weinig gebruikte kranen ideaal materiaal zijn om *Hyphomicrobium* uit te isoleeren. Wanneer men een praeparaat van deze druppels maakt, dan vindt men in het „Dunkelfeld” nagenoeg steeds de typische vormen van *Hyphomicrobium*. Het regelmatig voorkomen van deze bacterie op de genoemde plaatsen wordt door de in § 3 te bespreken stofwisseling wel eenigermate begrijpelijk. Om uit deze druppels een ophooping van dit organisme te krijgen, is het het beste, ze in kolfjes met het nitrietmedium voor *Nitrobacter* te brengen.

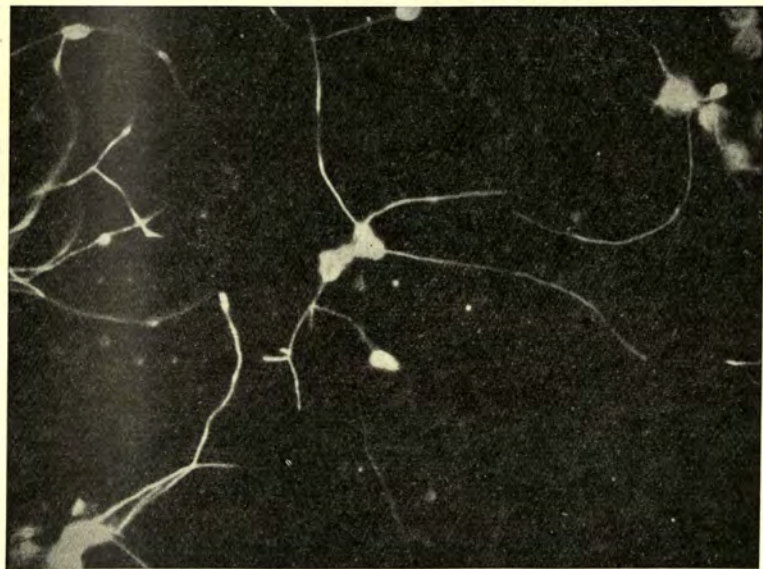
Voor de verkregen reïncultuur kon ik vaststellen, dat zij zich inderdaad overeenkomstig het door STUTZER en HARTLEB medegedeelde voortreffelijk ontwikkelde in een medium, dat naast natriumformiaat als koolstofbron nitraat als stikstofvoedsel bevatte. Het zijn in het bijzonder de daarin verkregen cultures, welke voor de hieronder volgende morphologische waarnemingen zijn gebruikt.

Wanneer men *Hyphomicrobium* in het „Dunkelfeld” bekijkt, dan valt het direct op, dat de vorm sterk afhankelijk is van het medium, waarin men dit organisme heeft gecultiveerd. In Afb. 32 zagen wij reeds het beeld van *Hyphomicrobium* in peptonwater en deze gedaante treft men eveneens aan, wanneer men op vaste voedingsbodems gegroeide cultures microscopeert. Ook in de ophooping van *Nitrobacter* heeft *Hyphomicrobium* hetzelfde uiterlijk. Veel indrukwekkender is echter de groei in het hierboven genoemde natriumformiaat-medium, zooals blijkt uit Afb. 36, 38, 39 en 40. De submicroscopische draden worden hier verbazend lang en zoo nu en dan vertoonen zij echte vertakkingen. Soms treft men heel merkwaardige, lang uitgegroeide cellen aan, zooals links op Afb. 39. Zooals reeds werd opgemerkt, is van deze draden bij directe belichting niets te zien. In Afb. 36 vindt men een „Dunkelfeld”-photographie van hetzelfde vlokje als in Afb. 35 bij normale verlichting is gefotografeerd. Alleen wanneer men niet scherp instelt, meent men soms wel eens iets van deze draden te zien. Zoo geeft Afb. 38 hetzelfde vlokje als Afb. 37; doordat bij laatstgenoemde photographie opzettelijk niet geheel scherp is ingesteld, is er ditmaal iets van de draden te zien. Bij rechtstreeksche, visueele waarneming ziet men deze nog veel minder duidelijk dan op de photographie.

Het is moeilijk te zeggen, wat de beteekenis van de stelen is. Om



Afb. 39.  
*Hyphomicrobium*.  
Cardioïd cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).



Afb. 40.  
*Hyphomicrobium*.  
Cardioïd cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).



dienaangaande zekerheid te krijgen zou het zeer gewenscht zijn, den groei van enkele geïsoleerd liggende bacteriën in een hangenden druppel te blijven vervolgen. Hiertoe is dan vanzelfsprekend de toepassing van „Dunkelfeld”-verlichting geheel onmisbaar. Ik besloot, hiertoe een poging te doen. Voor de isolatie van de waar te nemen cellen was het met het oog op de vereischte bewegingsvrijheid in het vochtige kamertje noodig, dat de „Dunkelfeld”-condensor een brandpuntsafstand had van minstens 4 mm. De door de firma ZEISS voor dergelijke doeleinden in den handel gebrachte praepareercondensor voldeed weliswaar aan dezen eisch, maar van dezen condensor was de num. ap. (0,7—0,8) te klein om met een objectief van voldoende oplossend vermogen een behoorlijk „Dunkelfeld” te krijgen. Wanneer nl. de num. ap. van het te gebruiken objectief grooter wordt dan 0,4, krijgt men al geen goed „Dunkelfeld” meer. In verband met den zeer kleinen diameter der draden van *Hyphomicrobium* was het wenschelijk, een objectief met een wat grooter oplossend vermogen te gebruiken. Ik kwam toen op het denkbeeld, dat de groote gascondensor van ZEISS (No. 114521) <sup>1)</sup> met een num. ap. van 0,96—0,98 voor dit doel zeer geschikt zou kunnen zijn. Dit bleek nu inderdaad het geval te zijn. Wanneer de condensor werd gebruikt met de apochromaat „X” — een olie-immersie, welke van een irisdiaphragma is voorzien — in combinatie met een compensatie-oculair 20×, dan waren de draadvormige uitgroeisels van *Hyphomicrobium* ook in hangende druppeltjes uitstekend waar te nemen. Als lichtbron werd hierbij gebruik gemaakt van een 5 Amp. wisselstroombooglamp.

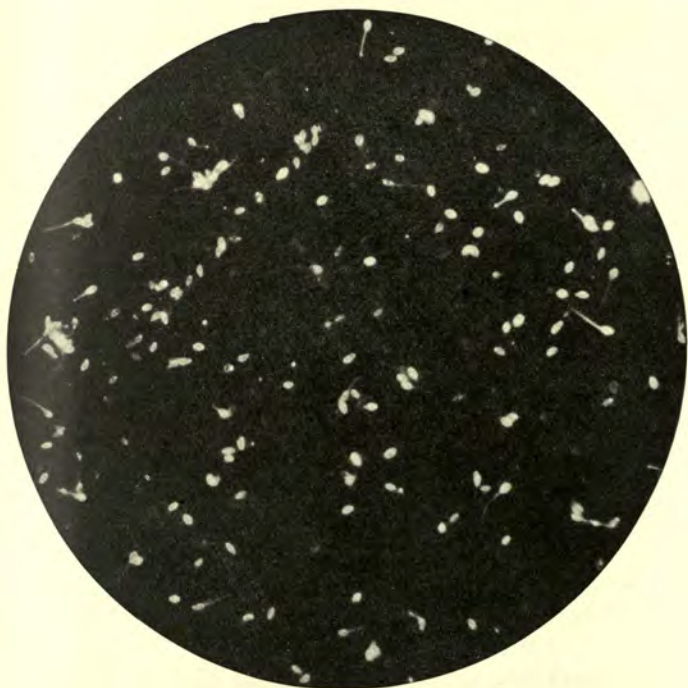
Van een suspensie van *Hyphomicrobium* in het voedingsmedium met natriumformiaat werden met den micromanipulator op een dekglas kleine druppels uitgezet. Daarna werd het dekglas op een glazen kamertje gelegd, waarin zich ook iets vochtig filtreerpapier bevond, zoodat er geen gevaar bestond, dat de druppels zouden indrogen. Daarna werd het kamertje weer onder den microscoop gelegd en vervolgens werd de microscoop met de booglamp in een ruimte van 30° C. opgesteld.

Tot mijn spijt kwam in geen der druppeltjes, ook na dagenlang

<sup>1)</sup> Deze gascondensor maakt het ook mogelijk, in het bacteriëntelkamertje van REICHERT een „Dunkelfeld” te krijgen. Met objectief D en comp. oculair 20 × kan men dan de bacteriën bijzonder duidelijk waarnemen, terwijl tevens de verdeling goed zichtbaar is.

wachten, ook maar één bacterie tot ontwikkeling. Wat hiervan de oorzaak was, is moeilijk te zeggen; waarschijnlijk zal de sterke belichting tijdens de waarnemingsperioden hiervoor verantwoordelijk zijn geweest.

Het was echter wel mogelijk, door het microscopeeren van cultures



Afb. 41.

*Hyphomicrobium.*

Jong stadium.

Cardioid-cond.; apochr. „X”; comp. oc. 20 ×  
(Vergr. 1400 ×).

van verschillenden ouderdom een algemeenen indruk te krijgen van de ontwikkelingswijze. Toen ik de vloeistof uit een kolfje, dat twee of drie dagen tevoren was geënt, microscopeerde, zag ik daarin kleine ovale bacteriën rondzwemmen. In een nog wat oudere cultuur zag ik een aantal nog beweeglijke cellen, welke reeds waren geken-



merkt door de aanwezigheid van een heel kort steeltje. Dit steeltje zelf was echter star en dus niet als bewegingsorgaan op te vatten. Wanneer het ongeveer tweemaal de lengte van de bacterie heeft verkregen, houdt de beweging op. In Afb. 41 vindt men een photographie van bacteriën uit een vier dagen oude cultuur, waarin de verschillende genoemde stadia gemakkelijk zijn terug te vinden. Typisch is ook, dat de bacteriën dikwijls in stervorm bij elkaar gaan liggen, zoodat de steeltjes naar buiten en de bacteriën naar binnen zijn gericht.

Karakteristiek is het nu, dat men in de wat oudere draden dikwijls een sterk lichtbrekend puntje aantreft. Soms tijds bevindt dit zich aan het einde van den draad, maar in andere gevallen treft men het aan op willekeurigen afstand van de bacterie. Of dit puntje zijn oorsprong vindt in de bacterie en zich dan langzaam naar het einde van den draad verplaatst, moet ik in het midden laten. Uit andere waargenomen stadia blijkt onmiskenbaar, dat dit lichtbrekende puntje zich tenslotte tot een nieuwe bacteriecel ontwikkelt. Ik heb echter nooit kunnen waarnemen, dat de op deze wijze nieuw gevormde cel zich van het steeltje losmaakte. Wel zag ik een enkele maal een steeltje met aan beide uiteinden een cel rondzwemmen.

Dergelijke groeivormen verwekken, wanneer men met de ontwikkeling ervan niet bekend is, sterk den indruk, dat men hier met twee copuleerende bacteriecellen heeft te doen. Toch is hiervan, zooals uit het voorafgaande blijkt, zeker geen sprake. STUTZER en HARTLEB, die de ontwikkeling van *Hyphomicrobium* eveneens trachtten te vervolgen, zijn in het algemeen tot dezelfde resultaten gekomen.

Samenvattend mogen wij besluiten, dat *Hyphomicrobium vulgare* in morphologisch opzicht een ongemeen belangwekkende bacteriesoort is. Voor zoover mij bekend, is dit toch de eenige bacterie, waarvoor een dergelijke submicroscopisch draadvormige groeiwijze is vastgesteld. Ook zijn er op zijn minst genomen sterke aanwijzingen, dat het celdeelingsproces onder omstandigheden geheel van dat der bekende bacteriënsoorten afwijkt. Het optreden van de draadvormige groeiwijze zou ertoe kunnen verleiden, deze bacterie in verband te brengen met de *Actinomyceten*. Het feit evenwel, dat voor de jongere cellen het vermogen tot eigen beweging buiten twijfel is, maakt deze veronderstelling niet aannemelijk. Voorloopig moet dan ook de systematische positie van *Hyphomicrobium vulgare* nog als geheel raadselachtig worden beschouwd.



§ 3. DE STOFWISSELING VAN *HYPHOMICROBIUM VULGARE*.

Het leek nu verder niet overbodig, te trachten een nader inzicht in de stofwisseling van *Hyphomicrobium vulgare* te verkrijgen. De dienaangaande door STUTZER en HARTLEB verzamelde ervaringen geven daarvan toch geen helder beeld; in het bijzonder noopte hun mededeeling, dat deze bacterie zich goed kon ontwikkelen op een zuiver anorganisch medium, waarin nitraat als eenige stikstofverbinding voorkwam, tot een nader onderzoek. Immers het was volkomen onbegrijpelijk, waaraan de bacterie op dezen voedingsbodem de door haar voor de koolzuurreductie benodigde energie zou ontleenen.

In eerste instantie leek het aangewezen na te gaan, hoe de door mij geïsoleerde *Hyphomicrobium*-stammen zich ten opzichte van verschillende, ook door STUTZER en HARTLEB onderzochte, organische substraten gedroegen.

In overeenstemming met de door deze onderzoekers verkregen uitkomsten bleek, dat *Hyphomicrobium* voortreffelijk groeide in media, samengesteld uit leidingwater met 0,1% kaliumnitraat en 0,1% natriumformiaat, natriumacetaat of natriumlactaat.

In het door STUTZER en HARTLEB zoo sterk aanbevolen medium: leidingwater met 1% asparagine kon ik daarentegen geen groei constateeren. Eveneens in strijd met hun opgave vond ik wel groei in leidingwater met 0,5% rietsuiker en 0,1% kaliumnitraat.

Wat nu de groei in het genoemde anorganische medium betreft, kon ik inderdaad vaststellen, dat het organisme zich in leidingwater, waaraan alleen 0,1% kaliumnitraat en 0,1% dinatriumphosfaat was toegevoegd, goed ontwikkelde.

Een toevoeging van natriumcarbonaat, welke door STUTZER en HARTLEB essentieel wordt geacht, bleek geheel overbodig. De koolzuurassimilatie-theorie werd hierdoor reeds nog onwaarschijnlijker en er moest wel worden geconcludeerd, dat de waargenomen groei had plaats gehad ten koste van organische stof, welke hetzij in het leidingwater, hetzij in de lucht aanwezig was.

Daarom werd deze proef nog eens herhaald in zorgvuldig schoon-gemaakte kwartskolfjes, terwijl voor de bereiding van het medium z.g.n. geleidbaarheidswater, d.i. met zorg in een kwartsapparatuur onder toevoeging van permanganaat en zwavelzuur gedestilleerd water, werd gebruikt. Hieraan werden de volgende, meerdere malen omgekristalliseerde zouten toegevoegd: 0,05% natriumchloride;



0,05% magnesiumsulfaat; 0,001% ferrosulfaat; 0,001% kaliumchloride en 0,1% dinatriumphosphaat. Na veertien dagen bleek, dat *Hyphomicrobium* zich ook in dit medium goed had ontwikkeld. Hieruit moeten wij dus besluiten, dat dit organisme van de sporen organische stof uit de lucht kan groeien.

In dit opzicht gelijkt *Hyphomicrobium* dus veel op de in Hoofdstuk III ook reeds ter sprake gekomen *Bac. oligocarbohilus*, welk organisme het eerst in 1903 door BEIJERINCK en VAN DELDEN is geïsoleerd en waarvoor door deze onderzoekers buiten twijfel is gesteld, dat het kan groeien van de sporen organische stof, welke in de verontreinigde lucht van bewoonde ruimten voorkomt.

Nu eenmaal was vastgesteld, dat *Hyphomicrobium* werkelijk van sporen organische stof kon groeien, was het natuurlijk de vraag, of de groei, waargenomen in pepton, rietsuiker en de vetzure zouten, ook werkelijk ten koste van deze organische verbindingen had plaats gehad. Het leek mij van belang, deze kwestie aan een nader onderzoek te onderwerpen. Daarvoor was het dus noodzakelijk, de groeiproeven nog eens te herhalen, doch ditmaal in een geheel van organische stof bevrijde lucht. Voor deze proef werden weer kwartskolfjes met geleidbaarheidswater gebruikt. Hieraan werden in de afzonderlijke gevallen de in Tabel XXXII aangegeven zouten en organische verbindingen toegevoegd. De helft van de kolfjes werd in exsiccatoren geplaatst. Door deze exsiccatoren werd langzaam lucht geleid, welke eerst door een waschflesch met sterk zwavelzuur en chroomzuur ging, vervolgens door een waschflesch met 20% kaliloog en daarna door één met gedestilleerd water. Deze laatste waschflesch diende alleen om de lucht weer te bevochtigen, daar er anders tijdens de proef, welke ongeveer 3 weken duurde, te veel water uit de kolfjes zou zijn verdamppt. De buis, waardoor de lucht uit den exsiccator ontsnapte, was eveneens afgesloten met een waschflesch met zwavelzuur en chroomzuur, zoodat het niet mogelijk was, dat, wanneer de perslucht bij toeval zou worden afgesloten, ongewassen buitenlucht in den exsiccator zou treden. Om een goeden indicator te hebben, dat de door den exsiccator geleide lucht werkelijk rein was, werd besloten, *Bacillus oligocarbohilus* mede in deze proef te betrekken. Dit organisme werd door mij zonder veel moeite volgens de door BEIJERINCK aangegeven methode uit tuingrond geïsoleerd. De kolfjes met de uiteenloopende media werden nu als volgt over 6 exsiccatoren verdeeld: In exsiccator I de media 1, 11 en 13; in II

de media 4 en 14; in III de media 6 en 16; in IV het medium 10; in V de media 5, 7 en 15; in VI de media 2, 3, 8, 9, 12. In alle exsiccatoren, behalve in IV, was dus ook een kolfje met *Bac. oligocarbohilus*. Het resultaat van deze proefneming vindt men in Tabel XXXII weergegeven.

TABEL XXXII.

*Proefnemingen aangaande den invloed van het reinigen der lucht op de ontwikkeling van Hyphomicrobium vulgare en Bacillus oligocarbohilus in uiteenlopend samengestelde media.*

Nummer van het medium	Stamoplossing <sup>1)</sup> , waaraan toegevoegd:	Groei in onge-reinigde lucht (beoordeeld na 3 weken)	Groei in gerei-nigde lucht (beoordeeld na 3 weken)
		<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	
1	—	matig	geen
2	0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	goed	geen
3	0,1% KNO <sub>3</sub> . . . . .	goed	geen
4	0,1% Na-formiaat . . . . .	zeer goed	zeer zwak
5	0,1% Na-formiaat + 0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	zeer goed	zeer goed
6	0,1% Na-formiaat + 0,1% KNO <sub>3</sub> .	zeer goed	zeer goed
7	0,1% NH <sub>4</sub> -formiaat . . . . .	zeer goed	zeer goed
8	0,1% Na-acetaat + 0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	goed	goed
9	0,1% rietsuiker + 0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	goed	geen
10	0,1% asparagine . . . . .	matig	geen
		<i>Bacillus oligocarbohilus</i>	
11	—	goed	geen
12	0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	goed	geen
13	0,1% KNO <sub>3</sub> . . . . .	goed	geen
14	0,1% Na-formiaat . . . . .	goed	geen
15	0,1% NH <sub>4</sub> -formiaat . . . . .	goed	geen
16	0,1% Na-formiaat + 0,1% KNO <sub>3</sub> .	goed	geen

<sup>1)</sup> Geleidbaarheidswater + 0,1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,05% NaCl + 0,05% MgSO<sub>4</sub> + + 0,001% FeSO<sub>4</sub> + 0,001% KCl.

Uit het feit, dat *Bac. oligocarbohilus* in geen enkel der kolfjes in de exsiccatoren is gegroeid, terwijl in de normaal aangehouden, met dit organisme geënte, kolfjes goede ontwikkeling was ingetreden,



blijkt wel, dat de gereinigde lucht inderdaad van iedere spoor organische stof was bevrijd. Wanneer dus *Hyphomicrobium* in de eerstgenoemde kolfjes wel is gegroeid, moet dit zijn te danken aan de toegevoegde organische verbindingen. Wij zien dus, dat *Hyphomicrobium* wel ten koste van enkele vetzure zouten, als formiaat en acetaat, kan groeien, maar niet van rietsuiker of asparagine. Dat in het stikstofvrije medium No. 4 in de gereinigde lucht een zwakke groei is opgetreden, is waarschijnlijk te wijten aan sporen van stikstofverbindingen; welke nog in deze oplossing aanwezig waren.

Uit de hierboven beschreven proefnemingen volgt dus, dat *Hyphomicrobium*, in tegenstelling met *Bac. oligocarbohilus*, ook een aantal eenvoudige, bekende koolstofverbindingen kan aangrijpen.

Verder blijkt uit deze proef, dat rietsuiker en asparagine als koolstofvoedsel voor *Hyphomicrobium* ongeschikt zijn, doch dat deze verbindingen anderzijds den groei ten koste van de organische verbindingen der lucht geenszins verhinderen. Waarom STUTZER en HARTLEB in het geheel geen groei bij aanwezigheid van rietsuiker vonden, is niet duidelijk. Misschien is de pH van het door hen gebruikte medium hiervoor verantwoordelijk geweest; *Hyphomicrobium* is toch zeer gevoelig voor zelfs zeer zwakke zuurgraden. Dat zij anderzijds zulke bijzonder gunstige uitkomsten voor het door hen gebruikte asparaginemedium rapporteeren, zal wellicht aan de mindere zuiverheid van het door hen gebruikte praeparat moeten worden toegeschreven; de door mij gebruikte asparagine was met zorg eenige malen omgekristalliseerd.

De ontdekking van *Bac. oligocarbohilus* door BEIJERINCK en VAN DELDEN heeft ons voor de eerste maal bekend gemaakt met een agens voor de biologische reiniging van de lucht; de hier beschreven proefnemingen laten geen twijfel, dat ook aan *Hyphomicrobium vulgare* dezelfde eigenschap moet worden toegekend.

---

## SAMENVATTING.

1. De litteratuur over de bacteriën, welke het z.g.n. nitrificatieproces bewerken, werd aan een critische bespreking onderworpen. In het bijzonder werd hierbij aandacht geschonken aan de verschillende moeilijkheden, welke zich bij de isolatie dier bacteriën voordoen en aan de fouten, welke hierbij in vele gevallen door vroegere onderzoekers zijn gemaakt. De slotsom, waartoe deze beschouwing leidde, was wel, dat het beschikbaar feitenmateriaal zeer ten gunste sprak van de opvatting, dat de verwekkers der nitrificatie alle behooren tot de, door WINOGRADSKY reeds ruim veertig jaren geleden zoo scherp omschreven, groep van autotrophe bacteriën. De talrijke, deels zeer recente uitspraken, waarin een ander inzicht wordt gehuldigd, bleken alle aan gegronde bedenkingen onderhevig. Duidelijk kwam ook aan het licht, dat, ondanks de groote belangstelling, welke deze bacteriën o.m. van de zijde der landbouw-microbiologen hebben ondervonden, het aantal onderzoekers, dat er in is geslaagd, deze micro-organismen in reïncultuur te brengen, uiterst beperkt is.

2. Bij de isolatie der nitrificeerende, althans bij die der nitriteerende, bacteriën werden door mij eveneens verschillende moeilijkheden ondervonden. In de eerste plaats bleek mij, dat bij gebruik van ver gezuiverde zouten het door WINOGRADSKY aangegeven medium geenszins optimaal is voor een goede ontwikkeling der nitriteerende bacteriën, in het bijzonder, wanneer het reïncultures dezer organismen betreft. De vervanging van het zuivere natriumchloride door ruw zout bracht in dit opzicht een aanmerkelijke verbetering. Verder bleek het voor het aanleggen van reïncultures essentieel, bij de bereiding van het medium in plaats van gedestilleerd water leidingwater te gebruiken.

3. Bij het aanleggen van cultures op kiezelzuurplaten werd geconstateerd, dat de kwaliteit van het, voor de bereiding dezer platen benodigde, waterglas van doorslaggevende beteekenis was. Voor de bereiding van voor het beoogde doel goed bruikbare platen werd een passend voorschrift uitgewerkt. Tevens werd vastgesteld, dat het voor het verkrijgen van reine koloniën der nitriteerende bacteriën



grootte voordeelen bood, het entmateriaal niet op de kiezelzuurplaten af te strijken, doch in het nog niet gestolde kiezelzuursol te suspenderen.

Dank zij het complex der bovengenoemde maatregelen en mede door het gebruik van den micromanipulator volgens JANSE-PÉTERFI bleek het mogelijk, de isolatietechniek zoo te verbeteren, dat met het verkrijgen der reïncultures slechts een vijftal weken zijn gemoeid. De reïncultuur der nitrateerende bacteriën werd overeenkomstig de gebruikelijke voorschriften zonder veel moeite verkregen.

4. Nadat geleidelijk uit verschillende grondmonsters een vrij groot aantal reïncultures van nitriteerende bacteriën was verkregen, werd nader onder oogen gezien, in hoeverre deze stammen konden worden ondergebracht in één der drie, door WINOGRADSKY in zijn laatste verhandeling aanvaarde, geslachten: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis* en *Nitrosospira*. Van den aanvang af was het duidelijk, dat de geïsoleerde stammen niet tot laatstgenoemd geslacht waren te rekenen. Vervolgens werd critiek uitgeoefend op de overwegingen, welke WINOGRADSKY ertoe hebben geleid, in 1933 het nieuwe geslacht *Nitrosocystis* op te stellen. Deze critiek werd gesteund door de experimenteele ervaringen, welke door mij met verschillende stammen waren verkregen en waaruit volgde, dat eenzelfde stam, afhankelijk van voorgeschiedenis en cultuurvoorwaarden, zoowel de karakteristieke eigenschappen van *Nitrosomonas* als van *Nitrosocystis* vertoonde. Door middel van ééncel-cultures slaagde ik er in, aan te toonen, dat inderdaad van een geslachts- en zelfs van een soortsverscheidenheid van de beide, door WINOGRADSKY beschreven, vormen geen sprake is.

5. Wat de nitrateerende bacteriën betreft, bleken de geïsoleerde stammen volkomen te zijn onder te brengen in het, door WINOGRADSKY reeds in 1892 opgestelde, geslacht *Nitrobacter*. Er werd verder op gewezen, dat de, in de laatste verhandeling door WINOGRADSKY beschreven, afwijkende bacteriën, waaraan door dezen onderzoeker eveneens nitrateerend vermogen wordt toegeschreven, naar alle waarschijnlijkheid een dergelijk vermogen missen en identiek zijn met, of althans nauw verwant aan *Bacillus oligocarbohilus* Beijerinck et van Delden.

6. Een spectrographisch onderzoek naar den onbekenden factor, welke verantwoordelijk is voor de, in deze samenvatting onder 2 vermelde, gunstige werking van ruw keukenzout, in tegenstelling



tot het zuivere natriumchloride, maakte het waarschijnlijk, dat als zoodanig het calcium of het strontium moest worden beschouwd. Door cultuurproefnemingen werd het bewijs geleverd, dat het calcium de factor is, welke in het met gedestilleerd water bereide medium van WINOGRADSKY ontbreekt.

7. Een onderzoek naar den invloed van de organische stof op de ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën toonde de onjuistheid aan van de gangbare meening, dat organische stoffen steeds hetzij schadelijk, hetzij indifferent voor deze ontwikkeling zijn. Voor het praeparaat: Nährstoff-Heyden werd een onmiskenaar — en in practisch opzicht belangrijke — gunstige werking vastgesteld. In aansluiting hierop werd het aannemelijk gemaakt, dat het gunstige effect van leidingwater op de ontwikkeling der nitriteerende bacteriën op de, in dit water aanwezige, organische stoffen is terug te voeren.

8. Er werd aangetoond, dat, niettegenstaande de gunstige werking van Nährstoff-Heyden, ook bij gebruik van dit praeparaat bevattende media zoowel de normale anorganische ademhalingssubstraten als ook het koolzuur voor de ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën teneenenmale noodzakelijk zijn. Hoewel dit resultaat een krachtigen steun oplevert voor de opvatting van het streng autotrophe karakter der genoemde organismen, werd er anderzijds op gewezen, dat het niet uitgesloten is, dat latere onderzoekingen ertoe zullen leiden, de bewuste nitrificeerende bacteriën als „chemomixotroph” te beschouwen.

9. Wat de schadelijke werking van de peptonen op de ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën aangaat, werd aangetoond, dat deze rechtstreeks samenhangt met het voorkomen daarin van vrije aminozuren. De verdere onderzoekingen maken het aannemelijk, dat de schadelijke werking van uiteenlopende organische verbindingen op de ontwikkeling der beschouwde bacteriën in alle gevallen is te wijten aan een remmende werking dier verbindingen op het ademhalingsproces. Voor het geval van de glucose, welke stof blijkens de in de litteratuur aanwezige gegevens op dezen regel een uitzondering maakt, werd aangetoond, dat deze uitzondering slechts schijnbaar is, doordat het experimenteele bewijs kon worden geleverd, dat ontwikkeling der nitrificeerende bacteriën in media, welke zelfs tot 4% glucose bevatten, mogelijk is.

10. Van de in nitrificatie-ophoopingingen als begeleidingsorganisme veelvuldig aangetroffen bacteriesoort *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer



et Hartleb werd een nadere studie verricht. Hierbij werd in het bijzonder aandacht geschonken aan de submicroscopische groeiwijze van dit organisme. Een onderzoek naar de stofwisseling van deze bacterie leerde, dat zij zich kon ontwikkelen ten koste van de organische verontreinigingen, welke in de lucht van bewoonde ruimten plegen voor te komen. Met *Bacillus oligocarbophilus* mag dus *Hyphomicrobium vulgare* worden beschouwd als een agens voor de biologische reiniging van de lucht.

---

## SUMMARY.

1. The literature on the bacteria which are responsible for the so-called nitrification process was critically reviewed. Special attention was paid to the various difficulties which are involved in the isolation of these bacteria and to the errors made by earlier investigators in this field. This survey of the literature led to the conclusion that the available facts are strongly in favour of the opinion that all nitrifying bacteria belong to the group of autotrophic organisms, which was so well characterized by WINOGRADSKY already more than 40 years ago. The numerous, partly very recent statements, in which a different opinion was brought forward, appeared to be subject to well founded criticism. It became evident that notwithstanding the great interest paid to these bacteria, especially by agricultural microbiologists, only very few investigators succeeded in obtaining pure cultures of these microorganisms until now.

2. In isolating the nitrifying, at least the nitritating bacteria, the author too encountered various difficulties. In the first place it was found that, when highly purified salts are used, the medium prescribed by WINOGRADSKY is not at all optimal for a good development of the nitrifying bacteria, especially when pure cultures are concerned. Replacing the pure sodium chloride by crude salt brought about a considerable improvement in this respect. Moreover it appeared essential to use tap water instead of distilled water in the preparation of the medium for obtaining pure cultures.

3. In preparing cultures on silica gel plates, it was found that the quality of the sodium silicate used was of fundamental importance. A prescription for the preparation of suitable plates has been given. For obtaining pure colonies of the nitrifying bacteria it is advantageous to suspend the inoculation material in the silica sol before the gelation, instead of streaking out upon the plates.

By taking the above-mentioned measures and by making use of the micromanipulator of JANSE-PÉTERFI, the author could improve the technique of isolation in such a way that the time for obtaining pure cultures was reduced to five weeks. Pure cultures of the



nitratating bacteria were obtained by the usual method without much trouble.

4. A fairly large number of pure cultures of nitritating bacteria was obtained from various soil samples. It was tried to incorporate these strains into one of the three genera accepted by WINOGRADSKY in his recent publication: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis* and *Nitrospira*. Immediately it was clear that the isolated strains did not belong to the last mentioned genus. The considerations that led WINOGRADSKY to create in 1933 the new genus *Nitrosocystis* were criticized. This criticism was partly based on experimental evidence obtained by the author with the different strains: the same strain being found to give the characteristics of both *Nitrosomonas* and *Nitrosocystis* depending on its history and on the conditions of cultivation. By means of single cell cultures it was demonstrated that it is out of question that there is any difference in genus or species of the two forms described by WINOGRADSKY.

5. The isolated strains of nitratating bacteria obviously belonged to the genus *Nitrobacter*, created by WINOGRADSKY already in 1892. It was suggested further that the other bacteria described by WINOGRADSKY in his last publication as being capable of nitratation, probably lack this capacity and are identical with or closely related to *Bacillus oligocarophilus* Beijerinck et van Delden.

6. A spectrographic investigation made it probable that calcium or strontium had to be considered as the unknown factor responsible for the favourable influence of crude salt in contrast to pure sodium chloride, as referred to in this summary under 2. By culture experiments it was shown that calcium is the factor, in which the medium of WINOGRADSKY, when prepared with distilled water, is lacking.

7. An investigation of the influence of organic material upon the development of the nitrifying bacteria showed the incorrectness of the current view that organic substances are always either injurious or indifferent to this development. Of Nährstoff-Heyden it was proved that it has an unmistakable and practically important favourable influence. In connection with this it was made plausible that the favourable influence of tap water upon the development of the nitritating bacteria is to be ascribed to the presence of traces of organic substances in this water.

8. It was proved that, notwithstanding the favourable influence of Nährstoff-Heyden the normal inorganic substrates of respiration,

as well as carbon dioxide, are absolutely necessary for the development of the nitrifying bacteria in media containing the preparation in question. Although this result gives a strong support to the view of the strictly autotrophic character of these bacteria, it was pointed out that it is not impossible that later investigations will lead to the insight that the nitrifying bacteria will have to be considered as being „chemomixotrophic”.

9. It was demonstrated that the harmful influence of commercial peptones upon the development of the nitrifying organisms is directly connected with the presence of free amino acids in these preparations. Further investigations made acceptable that the injurious influence of various organic compounds upon the development of the mentioned bacteria is due to the inhibition of the respiration process by these compounds. Of glucose, which compound, according to the data available in the literature, made exception to this rule, it was shown that this exception is only apparent, since the experimental proof could be given that the development of the nitrifying bacteria is possible in media containing even 4% of glucose.

10. A somewhat detailed study was made of *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer et Hartleb, the bacterium that often occurs in the enrichment cultures of the nitrifying bacteria. Special attention was given to the submicroscopical growth of this organism. An investigation of the metabolism made it clear that the organism could thrive on the organic impurities always present in the atmosphere of inhabited dwellings. On the analogy of the conclusion of BEIJERINCK and VAN DELDEN that *Bacillus oligocarbophilus* is an active agent in the biological purification of the air, the same function may be claimed for *Hyphomicrobium vulgare*.

---





## STELLINGEN.

---

### 1.

Alle, in de laatste 40 jaren gedane, pogingen om het bestaan van nitrificeerende bacteriën aan te toonen, welke niet behooren tot de door WINOGRADSKY in 1890 ontdekte, door dezen onderzoeker afdoende gekarakteriseerde, groep van autotrophe bacteriën, hebben gefaald.

### 2.

Hoezeer de, door WINOGRADSKY in de laatste jaren ten dienste van de landbouwmicrobiologie uitgewerkte, methode er zich toe leent, een betrouwbaren indruk te krijgen van de mate van voorkomen en van activiteit van bepaalde bacteriën in een grondmonster, toch maakt bedoelde methode de bestudeering dezer bacteriën in reincultuur geenszins overbodig.

### 3.

Het onderzoek van MERRILL over de stofwisseling van *Mycobacterium tuberculosis* levert een goed voorbeeld van de noodzakelijkheid om in de microbiologie de begrippen ademhaling en gisting te contrasteeren.

M. H. MERRILL, Journ. of Bact. 20, 235, 1930.

### 4.

De bacteriënciliën, welke met de gangbare kleurmethode kunnen worden aangetoond, zijn steeds artefacten, ontstaan door ineenstrengeling van een groot aantal elementaire ciliën.

F. NEUMANN, Centralbl. f. Bakt. I, 109, 143, 1928.



5.

Voor het moderne gasbedrijf kan het groote voordeelen bieden, het in het geproduceerde gas aanwezige kooloxyde langs biologischen weg in methaan om te zetten.

R. LIESKE und F. HOFMANN, *Brennstoffchemie* 11, 208, 1930.

F. FISCHER, R. LIESKE und WINZER, *Brennstoffchemie* 11, 452, 1930.

F. FISCHER, R. LIESKE und WINZER, *Brennstoffchemie* 12, 193, 1931.

W. BERTELSMANN, *Gas- und Wasserfach* 75, 130, 1932.

6.

De opmerking van BAAS BECKING, volgens welke nitraat zou zijn: <<het stikstofvoedsel „par excellence” voor vele groene planten, vooral in een zure omgeving>>, is, wat het tweede gedeelte van deze uitspraak betreft, aan bedenking onderhevig.

L. G. M. BAAS BECKING, *Geobiologie*, 's-Gravenhage, 1934. p. 119.

7.

Behalve aan de „uronzuren” in engeren zin zal men ook aan het 5-ketogluconzuur van BOUTROUX aandacht hebben te schenken als moederstof voor de, in de levende organismen voorkomende, pentosen.

8.

Het is niet waarschijnlijk, dat de ontwikkelbare centra in de zilverhalogenide korrels ontstaan door een samenvlokken van de, bij de belichting gevormde, zilveratomen.

9.

Op grond van het Raman-effect van benzeen verdient de structuurformule van Kekulé de voorkeur boven de van andere zijden voorgestelde formules.

K. W. F. KOHLRAUSCH, *Die Naturwissenschaften* 22, 161, 1934.

10.

Terecht merkt STAUDINGER op, dat de methoden der synthetische organische chemie niet kunnen leiden tot een volledige opheldering van de constitutie der hoogmoleculaire organische verbindingen.

H. STAUDINGER, *Die Naturwissenschaften*, 22, 65, 1934.

11.

Voor de verklaring van het mechanisme van de potentiaalvorming aan edelmetalelectroden is de electronentheorie te prefereeren boven de gasbeladingstheorie.

L. MICHAELIS, *Oxydations-Reductions-Potentiale*, Berlin, 1933, p. 26.

12.

De door LEWIS en RANDALL en door PARKS en HUFFMAN verkregen experimenteele uitkomsten mogen als een steun worden beschouwd voor de derde hoofdwet der thermodynamica, zooals die door eerstgenoemde onderzoekers is geformuleerd.

G. N. LEWIS and M. RANDALL, *Thermodynamics*, London 1923.

G. S. PARKS and H. M. HUFFMAN, *The free energies of some organic compounds*, New York, 1932.

13.

Voor de quantitative bepaling van nitriet en nitraat in oplossingen, welke beide zouten bevatten, verdient het aanbeveling, naast een afzonderlijke bepaling van het nitriet volgens bekende methoden de som van de nitriet- en nitraat-stikstof vast te stellen volgens de door VAN NIEUWENBURG en DE GROOT gewijzigde methode van Devarda.

C. J. VAN NIEUWENBURG en G. P. DE GROOT, *Chem. Weekbl.* 24, 202, 1927.

14.

De door NELSON, LEVINE en BUCHANAN aangegeven methode ter bepaling van nitraat in afvalwater verdient geen aanbeveling.

D. H. NELSON, M. LEVINE and J. H. BUCHANAN, *Ind. and Eng. Chem., Analyt. Ed.* 4, 56, 1932.



15.

De tot dusver beschreven methoden voor de bepaling van het bakkend vermogen van steenkoolsoorten geven nog geen voldoende basis voor de beoordeeling van de geschiktheid van deze koolsoorten voor de bereiding van cokes.

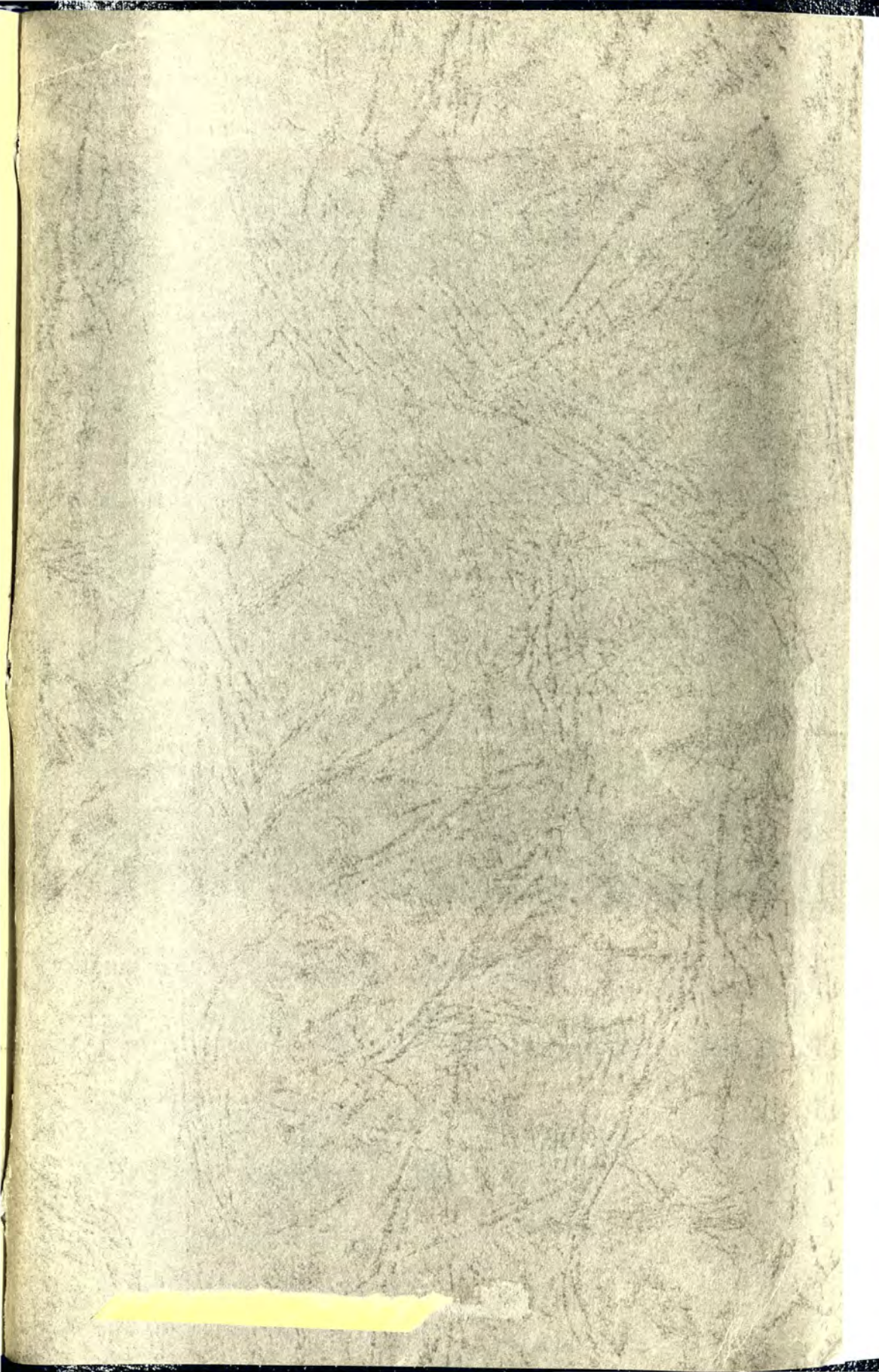
16.

Voor de Nederlandsche zuivelindustrie zou het, in verband met de steeds moeilijker wordende afzet van de vetvrije melkbestanddeelen, van groot belang zijn, meerdere aandacht te schenken aan het opsporen van nieuwe technische toepassingen van caseïne.

#### FECHA DE DEVOLUCION

El lector se obliga a devolver este libro antes del vencimiento de préstamo señalado por el último sello.













1877





