

# RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION GRONINGEN.

---

## Nitraatvormende bacteriën

DOOR

Dr. J. SACK,

*Bacterioloog aan het Rijkslandbouwproefstation te Groningen.*

---

Tot nu toe neemt men aan, dat er slechts één nitraatvormende bacterie bestaat, n.l. de „Nitrobacter Winogradskyi”. WINOGRADSKY noemde het geslacht, waartoe hij zijne ontdekte nitraatvormende bacterie bracht, nitrobaacter. Een soortnaam heeft hij echter niet gegeven. Door R. E. BUCHANAN wordt in Journal of bacteriology, Vol. III, blz. 180, in deze leemte voorzien en schrijft „Nitrobacter Winogradskyi”.

LEHMANN en NEUMANN schrijven in hun handboek „Atlas und Grundriss der Bakteriologie” nog steeds over „Bakterium Nitrobacter” en LÖHNIS in zijn leerboek „Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie” van Bacillus Nitrobacter. Dat deze benamingen onjuist zijn, blijkt duidelijk uit het eerste geschrevene.

Wanneer men de omvangrijke literatuur nagaat, die bestaat over deze nitraatvormende bacterie, wordt men getroffen door de tegenstrijdige berichten van de verschillende onderzoekers. Het vermoeden ligt voor de hand, dat zij verschillende nitraatvormende bacteriën in handen hebben gehad en dat slechts enkele beschikt hebben over een werkelijke reincultuur.

Het is zeer opvallend, dat sommige onderzoekers gewag maken van het feit, dat deze bacterie in voedingsbodems met organische stof niet of zeer slecht groeien en zoo de bacterie er in groeit, dan geen nitraat vormt. Zoo schrijft BEYERINCK<sup>1)</sup> „dass das Nitraterment eben mit groszer Leichtigkeit von allerlei organischen Körpern leben und sich vermehren kann, dabei jedoch, das ist beim Wachstum auf kosten organischer Nahrung das Vermögen Nitrite zu Nitraten zu oxydieren sehr bald völlig verliert, wobei es sich in eine scheinbar gewöhnliche saprophytische Bakterie umwandelt”. OTTO MEIJERHOF<sup>2)</sup> deelt mede, dat eene oplossing van 0,045 pct. glucose de groei tegenhoudt, maar dat eene oplossing van ruim 6 pct. glucose op de ademhaling nog geen invloed heeft.

---

1) Folia microbiologica Delft III Jahrgang 1914, seite 91—118.

2) Archiv, für die ges. Physiologie Bd. 165 blz. 283.

2100560

Dat deze bacteriën geen nitraat zouden vormen in tegenwoordigheid van zelfs veel organische stof is in strijd met wat plaats heeft in de natuur. In de eerste plaats moet men denken aan de oude salpeterplantages en ten tweede, dat in gronden met veel organische stof toch ook salpetervorming plaats heeft. Wanneer men het „Handbuch der Landwirtschaftlichen Bakteriologie“ van LÖHNIS, blz. 608 opslaat, vindt men daar literatuur opgegeven over de vorming van salpeter in tegenwoordigheid van veel organische stof. Naar aanleiding van de vele tegenstrijdigheden kwam het mij gewenscht voor een onderzoek te doen naar het feit of werkelijk slechts één nitraatvormende bacterie voorkomt in den grond en van deze dan de eigenschappen na te gaan.

In een Erlenmeyerkolff van een liter inhoud werd 10 gram tuingrond gedaan met 100 c.c. leidingwater<sup>1)</sup> en 100 m.gr. natriumnitriet. Na eene week was nitraat gevormd. Van deze vloeistof werden een paar druppels gedaan in een tweede kolff met 300 c.c. leidingwater, waarin nog 0,1 gram bikaliumfosfaat en 0,1 gram natriumnitriet waren opgelost. Alvorens de druppels toe te voegen, werd de kolff met inhoud gesteriliseerd, deze en de verdere proeven hadden plaats bij ongeveer 28° C. Na ongeveer vier weken was in de kolff nitraat aan te toonen. Daarna werden drie agarnitrietplaten<sup>2)</sup> gereed gemaakt en eenige uren na het vastworden op de eerste plaat één oogje der vloeistof gedaan en uitgestreken met een geflambeerden glazen haak. Zulk een haak werd het eerst aangewend door v. DRIGALSKI en CONRADL. Met denzelfden haak werd gestreken over de tweede en derde plaat. Met de rechterhand strijkt men met den haak heen en weer, terwijl de linkerhand de plaat draait. Deze bewerking der platen duurt ongeveer 10 seconden. Na veertien dagen staan, blijkt de eerste plaat gewoonlijk onbruikbaar doordat de kolonies zoo dicht bij elkaar liggen, dat van een enkele kolonie niets af te halen is zonder andere te raken. Op de tweede plaat liggen de kolonies verder, maar op de derde liggen ze ver genoeg van elkaar.

Van de derde plaat werden van zes verschillende kolonies iets geënt in Erlenmeyerkolven van 750 c.c. inhoud met 300 c.c. leidingwater, waaraan 0,1 gram bikaliumfosfaat en 0,1 gram

---

1) Het leidingwater in de gemeente Groningen heeft geen constante samenstelling, het bestaat uit een mengsel van rivier- en bronwater, waarvan de verhouding telkens verandert. Het leidingwater bevat, op fosforzuur na, de benodigde anorganische voedingszouten voor de bacteriën.

2) De agarnitrietplaten werden verkregen door agar-agar af te spoelen met water en daarna op te lossen in leidingwater, waaraan 0,1 gram bikaliumfosfaat en 0,1 gram natriumnitrietwaren toegevoegd. Het leidingwater heeft na koking veelal eene alkalische reactie, d.w.z. dat phenolphthaleïne even licht roos wordt gekleurd, eene reactie waarbij, naar mijne ondervinding deze bacteriën het best groeien. Mocht de reactie na oplossing der agar-agar niet meer zoo zijn, dan waren enkele druppels 1/10 N. natronloog voldoende om deze alkaliteit te verkrijgen. Het filtreren had plaats door onvette watten. De oplossing bevat 2 pct. agar-agar.

natriumnitriet waren toegevoegd. Omdat de kolven lang moesten staan, werden kapjes van pergamentpapier over de halzen gedaan.

Het bleek, dat in vier der zes kolven na ongeveer 4 weken staan, nitraat was gevormd. De beide anderen vormden zelfs na maanden staan geen nitraat. Daarna werden van ieder der vier kolven op agarnitrietplaten uitgestreken. Na twee weken staan werd wederom eene losliggende kolonie in eene vloeistof gedaan en gewacht totdat nitraat was gevormd en dan wederom uitgestreken. Op deze wijze werd voortgegaan, totdat de kolonies op de plaat, zoowel macro- als microscopisch geheel hetzelfde waren. Zodoende werden reïncultures verkregen van vier verschillende nitraatvormende bacteriën. Door zulk een wijze van werken heeft men alle zekerheid, dat geschikt wordt over reïncultures, hoewel daar ruim vier maanden mede gemoeid zijn. Trouwens alle proeven met deze bacteriën eischen veel tijd en dus veel geduld. Men doet het best de cultures minstens 6 weken te laten staan.

Uit het onderstaande zal blijken, dat de nitraatvormende bacteriën op of in de gewoonlijk gebruikte voedingsbodems over het algemeen goed groeien en daarin nitraat maken uit nitriet. Het beste doet men de voedingsbodems te enten van kolonies, daar men dan meer kans heeft op groei. Het is mij herhaaldelijk voorgekomen, dat op aardappel, gelatineplaten of steek geen groei plaats had na het enten met waterige voedingsbodems, maar na het bestrijken met eene kolonie binnen eenige dagen reeds kolonies te voorschijn kwamen.

Ook kwam een onverwachte eigenschap aan den dag, n.l. *het aantasten van cellulose*. Hierdoor rees de gedachte of deze vier nitraatvormende bacteriën eigenlijk niet ondergebracht moesten worden bij het geslacht „*cellulomonas*”, maar daar de door mij gevondene cellulose aantasters de nitraten juist afbouwen tot nitriet en ammoniak, werden deze vier ondergebracht bij het geslacht *Nitrobacter*. Van de *Nitrobacter* Winogradskyi vindt men opgegeven, dat de kolonies lichtbruin van kleur zijn, die bij langer staan donkerder worden. Deze vier vertoonden die kleur niet en werden naar het uiterlijk hunner kolonies op de agarnitrietplaat door mij genoemd:

*Nitrobacter roseo-albus.*

*Nitrobacter flavus.*

*Nitrobacter punctatus.*

*Nitrobacter opacus.*

***Nitrobacter roseo-albus.***

*Vorm*: staafje.

*Afmetingen*: lengte kleiner dan 1 micron;  
breedte kleiner dan 0,4 micron.

*Bewegelijkheid*: niet bewegelijk.

De bewegelijkheid werd nagegaan in alle gebruikte vloe-

stoffen als leidingwater, vleeschwater, peptonwater, enz. en altijd in den hangenden druppel, geen enkele maal werd een bewegelijke gezien.

*Gramkleuring*: gram positief.

*Spoorvorming*: geen sporen.

Van eene drie weken oude cultuur op aardappel werd een afstrijksel gekleurd naar de methode BITTER, maar geene sporen waren te zien. Verder werd 2 c.c. leidingwater geënt met eenige oogjes van een sterk werkende cultuur en gedurende 20 minuten in een waterbad verhit op 70° C. Eenige oogjes werden uitgestreken op twee agarnitrietplaten, maar deze bleven na zes weken staan steriel. De rest der vloeistof werd uitgegoten in 200 c.c. leidingwater, waaraan bikaliumfosfaat en natriumnitriet was toegevoegd. Nitraat was na drie maanden staan nog niet aan te toonen.

*Uitdrogen*: van eene sterk werkende cultuur werden 100 c.c. gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof afgeschonken. Daarna werd het sediment met 100 c.c. leidingwater opgeschud, gecentrifugeerd en de vloeistof afgeschonken. Deze bewerking werd nog eens herhaald. Toen werd het sediment uitgestreken op reepjes filtreerpapier en in een exsiccator met chloorcalium gedurende 5 maanden bewaard. De reepjes werden na dien tijd in leidingwater gedaan, waaraan bikaliumfosfaat en natriumnitriet waren toegevoegd. Nitraat was niet aan te toonen. Na drie weken staan was nitraat aan te toonen. Op langer bestand zijn tegen uitdrogen werd niet onderzocht.

Bij deze proef viel het op, dat de reepjes filtreerpapier in de kolf sterk aangetast werden, daarna uit elkaar vielen en nagenoeg geheel verdwenen.

*Ultraviolet licht*: binnen 15 seconden gedood.

Gebruikt werd een kwartslamp van HERAEUS van 4 Amp. en 220 Volt. De afstand was 35 c.M. en de temperatuur steeg niet boven 25° C.

*Vleeschnat*: binnen 4 dagen is het vleeschnat troebel. Op den bodem der kolf komt bezinksel, dat rose van kleur is en daarna wordt de vloeistof helder. Nitraat werd gevormd. Het vleeschnat werd bereid door een half kilo biefstuk te malen en een uur onder herhaald omroeren te laten staan met 1000 c.c. leidingwater. Daarna werd een half uur gekookt, door een doek gefiltreerd en zachtjes uitgeknepen. Na afkoeling en filtreren door papier, werd aangevuld tot 1300 c.c., 5 gram keukenzout en 0,05 gram natriumnitriet toegevoegd. Zeer zwak alkalisch werd gemaakt met natronloog, wederom gekookt en gefiltreerd.

*Peptonwater*: gebruikt werd eene 1 pct. peptonoplossing, die zeer zwak alkalisch werd gemaakt, gekookt en gefiltreerd. Natriumnitriet werd toegevoegd. Nitraat werd gevormd.

*Agarnitrietplaat*: de bereidingswijze is reeds vroeger opgegeven. De kolonies worden na ongeveer 8 dagen met eene loupe zicht-

baar en na 10 dagen met het bloote oog. Zij vertoonen zich als rond en heel licht rose gekleurd. De rose kleur is het beste te zien door de plaat op een zwarte tafel te leggen. Onder het microscoop zijn de kolonies bijna geheel rond, gaaf van rand en niet gekorrelt. Nitraat wordt op de plaat gevormd.

*Agarplaat zonder nitriet*: de groei heeft op dezelfde wijze plaats als op de agarplaten met nitriet. De benoodigde stikstof verkrijgen de bacteriën waarschijnlijk uit de eiwitstoffen die in de agar-agar voorkomen<sup>1)</sup>.

*Agarnitrietplaten met bouillon en pepton*: in plaats van leidingwater werd gebruikt vleeschnat, waarin per liter 10 gram pepton was opgelost. Op deze platen heeft betere groei plaats, dan op die met water bereid. De kolonies zijn hetzelfde als op de gewone agarnitrietplaat. Nitraat wordt gevormd.

*Gelatineplaat*: op 10 pct. waterige gelatineplaat met nitriet worden evenzoo ronde, rose kolonies gevormd. De groei is uitstekend. Nitraat wordt gevormd. Bij deze en de vorige platen werden de platen eerst gereed gemaakt en dan een oogje der cultuur op de platen gedaan en met den glazen haak uitgewreven. Wanneer men bij de nog vloeibare voedingsbodems een oogje der cultuur doet en dan in de Petrischalen uitgiet, verkrijgt men gewoonlijk geen goede resultaten. De beste en de snelste methode is over de platen eene kolonie uit te wrijven.

*Gelatinesteek*: in de steek liggen de kolonies van elkaar en versmelten niet. De bovenste worden het eerst oranje, langzamerhand de dieper in de steek liggende. Sterk is de groei niet in de steek, omdat de bacterie aeroob is. Vervloeiing werd zelfs na 3 maanden staan niet waargenomen. De nitraatvormende bacterie van BEYERINCK<sup>2)</sup> vervloeit de waterige gelatine niet duidelijk, maar de bouillongelatine sterk. Deze bacterie vervloeit ook niet na 3 maanden staan de bouillongelatine.

*Agarnitrietsteek*: groeit met rose gekleurde kolonies. De groei is niet sterk in de steek.

*Agarnitrietstreek*: de groei is evenals op de agarnitrietplaat.

*Indol*: doordat tryptofaan niet te mijner beschikking stond, werd eene 1 pct. peptonwater met natriumnitriet gebruikt. Na eene maand staan werd gedistilleerd en aan het distillaat eene alcoholische oplossing van paradimethylamidobenzaldehyde toegevoegd en daarna sterk zoutzuur bijgedruppeld. Een roode verkleuring trad niet op. Bij uitschudden met amyalkohol werd deze ook niet rood gekleurd, zoodat geen indol aanwezig was.

*Zwavelwaterstof*: geen zwavelwaterstof. Aan de reeds beschrevene agarnitrietplaten met 1 pct. pepton werden aan sommige 2 pct. ijzertartraat en aan andere 2 pct. ijzerhydroxyde toegevoegd. Zwarte plekjes waren met het microscoop zelfs niet zichtbaar.

<sup>1)</sup> Zie SACK, bulletin No. 23 van het Koloniaal Museum te Haarlem. Gevonden werd van zuivere agar-agar: water = 17,33 pct., eiwit = 3,62 pct. en vet 0,20 pct.

<sup>2)</sup> Folia microbiologica, Delft, III Jahrgang, 1914.

*Mannietoplossing*: groeit in 5 pct. mannietoplossing en vormt nitraat. Manniet werd opgelost in leidingwater, waaraan bikaliumfosfaat en natriumnitriet waren toegevoegd. Grootere concentraties werden niet onderzocht.

*Melk*: ontvette, nitriethoudende, lakmoesmelk wordt na 3 maanden staan uiterlijk niet veranderd. Nitraat werd gevormd. Er vormt zich ten laatste een oranje bezinksel.

*Tyrosinase*: geen tyrosinase. Na het uitgieten van de agarnitriet op de plaat werden eenige c.c. toegevoegd van een oplossing van tyrosine in water, waaraan eenige druppels natronloog waren toegevoegd. Na de enting der plaat bleef deze langen tijd ongekleurd. Verder werd in leidingwater, bikaliumfosfaat, natriumnitriet en tyrosine gedaan, ook deze vloeistof bleef na de enting maanden lang kleurloos.

*Aardappel*: kleine, ronde, oranje gekleurde kolonies. Groei is niet sterk. De bacterie groeit zoowel op aardappel met als zonder natriumnitriet. Wanneer op den aardappel een druppel natriumnitrietoplossing was gedaan, was na 3 weken nitraat aan te toonen. De groei had het beste plaats, wanneer de aardappel alvorens in de buis van ROUX te doen een kwartier te laten liggen in gedistilleerd water, waaraan wat natriumcarbonaat was toegevoegd.

*Cellulose*: wordt aangetast. In eene Erlenmeyerkolf van 1 liter inhoud wordt 200 c.c. leidingwater met 0,1 gram bikaliumfosfaat, 0,1 gram natriumnitriet en eene schijf filtreerpapier, doorsnede 9 c.M., gedaan. De randen van de schijf raken de wanden der kolf niet. Na ongeveer twee weken ziet men reeds, dat het papier wordt aangetast, de rand vertoont geen cirkel meer en gaten komen in de schijf. Ten laatste valt het papier geheel uit elkaar en begint te verdwijnen. Schijven, die niet geënt waren en onder dezelfde omstandigheden bewaard worden gedurende 10 maanden, vertoonen niet de minste verandering.

#### **Nitrobacter flavus.** <sup>1)</sup>

*Vorm*: staafje.

*Afmetingen*: lengte 0,5 micron;  
breedte 0,2 micron.

*Bewegelijkheid*: niet beweeglijk.

*Gramkleuring*: gram negatief.

*Spoorvorming*: geen sporen.

*Uitdrogen*: kan 5 maanden uitdrogen verdragen.

*Ultraviolet licht*: binnen 15 seconden gedood.

*Vleeschnat*: blijft helder, zelfs na 3 maanden staan. Nitraat wordt gevormd.

<sup>1)</sup> De samenstelling der voedingsbodems is voor deze en de twee volgende bacteriën hetzelfde als gebruikt werd voor de *N. roseo-albus*. Het woordt gesteriliseerd is overal weggelaten, het spreekt vanzelf, dat alle voedingsbodems, glaswerk, enz. degelijk ge steriliseerd was.

*Peptonwater*: nitraat wordt gevormd.

*Agarnitrietplaat*: ronde, gele kolonies na 10 dagen met het bloote oog zichtbaar. Onder het microscoop blijken de jonge kolonies geheel rond, de oudere worden veelal hoekig. Niet gekorrelt, maar het lijkt, alsof in de kolonies kristallen liggen, de binnenin gelegene zijn het grootst en worden kleiner naar de randen toe. De randen zijn gaaf.

*Agarplaat zonder nitriet*: dezelfde groeiverschijnselen als op de agarnitrietplaat met uitzondering van het voorkomen der kristallen in de kolonies.

*Agarnitrietplaat met bouillon en pepton*: dezelfde groei als op de agarnitrietplaat.

*Gelatineplaat*: ronde, gele kolonies. Nitraat wordt gevormd.

*Gelatinesteek*: gele, losliggende kolonies. Geen vervloeiing, zelfs niet na 3 maanden staan. Hetzelfde uiterlijk in groei als bij de *N. roseo-albus*.

*Agarnitrietsteek*: geen bijzondere groeiverschijnselen, gele kolonies, groei is niet sterk.

*Agarnitrietstreek*: dezelfde kolonies als op de plaat.

*Indol*: vormt indol.

*Zwavelwaterstof*: geen zwavelwaterstof.

*Mannietoplossing*: groeit in 5 pct. mannietnitrietoplossing. Vormt nitraat.

*Melk*: ontvette, nitriethoudende, lakmoesmelk verandert uiterlijk niet. Nitraat wordt gevormd.

*Tyrosinase*: bevat tyrosinase. De plaat wordt binnen eene week licht bruin, die bij staan donkerder wordt. De vloeistof evenzoo.

*Aardappel*: sappig, dik crème beslag. Nitraat wordt gevormd.

*Cellulose*: wordt aangetast.

#### **Nitrobacter punctatus.**

*Vorm*: staafje (eivorm).

*Afmetingen*: gemiddelde lengte 3 micron;  
gemiddelde breedte aan het dikste deel, d. i. in het midden 2 micron.

*Bewegelijkheid*: niet bewegelijk.

*Gramkleuring*: gram positief.

*Spoorvorming*: geen sporen.

*Uitdrogen*: kan 5 maanden uitdrogen verdragen.

*Ultraviolet licht*: binnen 15 seconden gedood.

*Vleeschnat*: blijft helder en vormt nitraat.

*Peptonwater*: vormt nitraat.

*Agarnitrietplaat*: met het bloote oog zichtbare, ronde, witte kolonies. Onder het microscoop niet volkomen rond, rand als gekarteld en inhoud gepuncteerd. Vormt op de plaat nitraat.

*Agarplaat zonder nitriet*: groei evenals op de agarnitrietplaat.

*Agarnitrietplaat met bouillon en pepton*: groeit uitstekend, hetzelfde uiterlijk der kolonies als van die op de agarnitrietplaat.

- Gelatineplaat*: groeit uitstekend, dezelfde groeiverschijnselen als op de agarnitrietplaat. Nitraat wordt gevormd.
- Gelatinsteeek*: witte, losse kolonies. Hetzelfde uiterlijk als die van de beide reeds beschrevene. Gelatine begint binnen 2 weken tekenen van vervloeiing te geven, daarna gaat de vervloeiing snel voort.
- Agarnitrietsteek*: geen bijzondere groei. De groei is slecht in de steek.
- Agarnitrietstreek*: groei als op de plaat.
- Indol*: geen indol.
- Zwavelwaterstof*: geen zwavelwaterstof.
- Mannietoplossing*: groeit in 5 pct. mannietnitrietoplossing en vormt nitraat.
- Melk*: ontvette, nitriethoudende, lakmoesmelk verandert uiterlijk niet. Nitraat wordt gevormd.
- Tyrosinase*: geen tyrosinase.
- Aardappel*: sappig, licht bruin beslag. Nitraat wordt gevormd.
- Cellulose*: wordt aangetast.

#### **Nitrobacter opacus.**

- Vorm*: staafje.
- Afmetingen*: lengte 2 micron;  
breedte 0,4 micron.
- Bewegelijkheid*: niet bewegelijk.
- Gramkleuring*: gram positief.
- Spoorvorming*: geen sporen.
- Uitdrogen*: kan 5 maanden uitdrogen verdragen.
- Ultraviolet licht*: binnen 15 seconden gedood.
- Vleeschnat*: wordt troebel, vormt oranje gekleurd bezinksel en maakt nitraat.
- Peptonwater*: vormt nitraat.
- Agarnitrietplaat*: ronde, opake kolonies. Onder het microscoop, rond, zeer licht geel gekleurd, gave randen en in de kolonies lijkt het alsof een kern aanwezig is.
- Agarplaat zonder nitriet*: dezelfde groei als op de agarnitrietplaat.
- Agarnitrietplaat met bouillon en pepton*: volkomen ronde kolonies, die oranje gekleurd zijn, duidelijk is de z.g. Kern te zien. Deze kolonies onderscheiden zich van de *N. roseo-albus*, doordat ze oranje zijn en de andere rose en verder door de z.g. Kern. Ook zijn de kolonies volkomen rond en de *N. roseo-albus* heeft het voorkomen, alsof eene kleurloze ring, die grillig om de kolonies aanwezig is.
- Gelatineplaat*: evenals op de agarnitrietplaat.
- Gelatinsteeek*: geen losse kolonies, zoals bij de drie anderen, de gelatine vervloeit.
- Agarnitrietsteek*: zeer slechte groei.
- Agarnitrietstreek*: zelfde kolonies als op de agarnitrietplaat.
- Indol*: geen indol.



*Zwavelwaterstof*: geen zwavelwaterstof.

*Mannietoplossing*: vormt nitriet in 5 pct. mannietnitrietoplossing.

*Melk*: ontvette, nitriethoudende, lakmoesmelk blijft uiterlijk onveranderd. Nitraat wordt gevormd. Geen gekleurd bezinksel als bij de *N. roseo-albus*.

*Tyrosinase*: geen tyrosinase.

*Aardappel*: dik, sappig, rood oranje gekleurde massa. Nitraat wordt gevormd.

*Cellulose*: wordt aangetast.

Nagegaan werd de hoeveelheid nitriet, die gedurende 24 uren door een cultuur kon omgezet worden. Daartoe werden Erlenmeyerkolven gevuld met 1 liter leidingwater, waarbij 0,1 gram bikaliumfosfaat gedaan werd. Een caoutchouc stop werd er op geplaatst, waardoor twee glazen buizen gestoken waren. Het geheel werd omgekeerd op een driehoek geplaatst en constant lucht doorgeleid. De lucht werd gefiltreerd door watten en het geheel geplaatst in een verwarmingskast, waarin de temperatuur op ongeveer 28° C. werd gehouden. Na de enting werden de kolven bedeed met 4 gram natriumnitriet. Het duurde ongeveer eene maand alvorens deze hoeveelheid was verbruikt, daarna ging het verbruik plotseling naar boven en steeg tot ongeveer 4 gram per 24 uren. Bij enkele kwam het voor, dat 5 gram natriumnitriet geoxydeerd werd, hetgeen iets minder is dan de door MEIJERHOF opgegeven hoeveelheid van 5—6 gram per dag en per liter<sup>1)</sup>. Sommige kolven werden niet ververscht, maar telkens natriumnitriet toegevoegd, totdat ten laatste in de kolven aanwezig was 60 gram natriumnitraat; de proef werd daarna afgebroken.

Algemeen heerscht de opvatting, dat ammoniumsulfaat de nitratie tegengaat, hetgeen steunt op de onderzoekingen van WINOGRADSKY, BOULLANGER en MASSOL<sup>2)</sup> besloten uit hunne proeven, dat niet het ammoniumsulfaat de nitratie tegenging, maar de vrije ammoniak. MEIJERHOF<sup>3)</sup> toont aan, dat de nadeelige werking van het ammoniumsulfaat niet uitgaat van  $NH_4$  maar van  $NH_3$ , en dus afhangt van de waterstofionenconcentratie van het cultuurmedium. Ook door GERRETSEN<sup>4)</sup> is aangetoond, dat de veronderstelling van WINOGRADSKY, dat in een mengcultuur van nitriet en nitraatbacteriën de nitratie eerst begint als alle ammoniak geoxydeerd is, onjuist is. Afhankelijk van de  $pH$  heeft in ammoniumsulfaathoudende cultuurmedia wel degelijk nitratie en nitratie gelijktijdig plaats. Door mij werden kolfjes gevuld met

<sup>1)</sup> Archiv. für die ges. Physiologie Bd. 164 S. 357.

<sup>2)</sup> Ann. Pasteur Bd. 17 p. 492 jaar 1903 en Compt. rend. 1905 p. 687.

<sup>3)</sup> Archiv. für die ges. Physiologie Bd. 165 blz. 241.

<sup>4)</sup> Een onderzoek naar de nitrificatie en denitrificatie in tropische gronden, Diss. Delft, 1921 blz. 38.

150 c.c. leidingwater, waarin een weinig bikaliumfosfaat en natriumnitriet waren opgelost. Verder werden resp. toegevoegd 0,1, 0,5, 1,0 en 2,0 gram ammoniumsulfaat. Na de enting bleven de kolfjes 4 weken staan en bleek, dat alle nitraat bevatten. De  $pH$  der vloeistoffen waren 7,7, 7,2, 7,0 en 6,9.

Daarna werd de proef gedaan met zand. In bekerglazen werd 400 gram uitgewasschen en uitgegloeid zand gedaan en nog eens gesteriliseerd. Toen werd 80 c.c. leidingwater met een weinig bikaliumfosfaat en natriumnitriet toegevoegd, alsmede ammoniumsulfaatoplossingen, die bevatten 0,5, 1,0, 2,0 en 5,0 gram. Na de enting bleven de glazen 4 weken staan en bevatten toen alle nitraat. De  $pH$  der gronden was na de proef gemiddeld 8,0.

Ten laatste werden Erlenmeyerkolven gevuld met 900 c.c. leidingwater, waarin 0,1 gram bikaliumfosfaat, 0,1 gram natriumnitriet en 10 gram ammoniumsulfaat waren opgelost, daarna werd 100 c.c. van eene sterk werkende cultuur toegevoegd en op de bovenbeschrevene wijze lucht doorgevoerd. Het bleek, dat het natriumnitriet geoxydeerd werd en dat nieuw toegevoegde hoeveelheden hetzelfde lot ondergingen. De  $pH$  der vloeistoffen was op het einde gemiddeld 7,4.

Om na te gaan of eventueel in de lucht aanwezige koolstofhoudende stoffen de koolstofvoorziening kunnen doen plaats hebben, werden kolfjes van 100 c.c. geschuurd met uitgewasschen en gegloeid zand, daarna behandeld met geconcentreerd zwavelzuur en ten laatste met gedestilleerd water gewasschen, totdat alle zwavelzuur verdwenen was. De kolfjes werden bedeed met 50 c.c. dubbel gedestilleerd water, dat gekookt werd en daarna  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  werden opgelost en alkalisch gemaakt met natronloog. Na sterilisatie werd afgekoeld in een exsiccator en na de enting de exsiccator luchtleedig gezogen. Daarna werd door het openen der kraan van de exsiccator lucht toegelaten, die eerst streek door een glazen buis van 40 c.M. lengte en die gevuld was met vochtige watten. Daarna ging de lucht achtereenvolgens door een waschflesch met geconcentreerd zwavelzuur, sterke kaliloog en water en ten laatste door een glazen buis van 30 c.M. lengte met watten gevuld en die gesteriliseerd was. Om goede filtratie te krijgen, werd de lucht toegelaten met eene snelheid van 1 gasbel per seconde. Na 8 weken staan was nog geen nitraat gevormd. Werd echter een mengsel van lucht en koolzuur toegelaten, dat op dezelfde wijze behandeld werd als hierboven geschreven, natuurlijk met uitzondering van de waschflesch met kaliloog, dan was na 4 weken staan nitraat aanwezig. De nitraatvormende bacteriën kunnen dus hun benodigde koolstof halen uit het koolzuur.

Daarna werd nagegaan of deze bacteriën in staat zijn de koolstof te betrekken uit carbonaten. Daartoe werden de kolfjes behandeld op een wijze als hierboven beschreven en nog toegevoegd resp.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$  en  $\text{MgCO}_3$ . In de exsiccator werd lucht



Fig. 1.

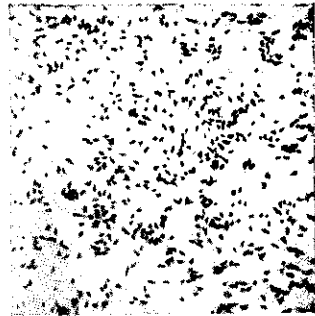


Fig. 2.

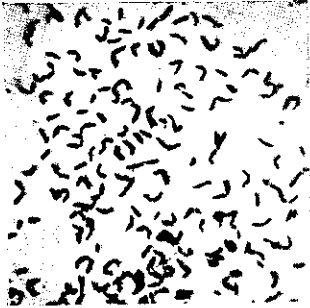


Fig. 3.



Fig. 4.

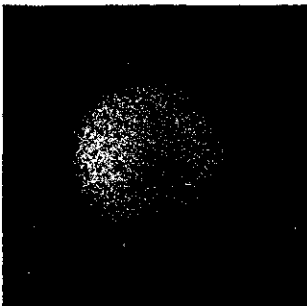


Fig. 5.



Fig. 6.





Fig. 7.

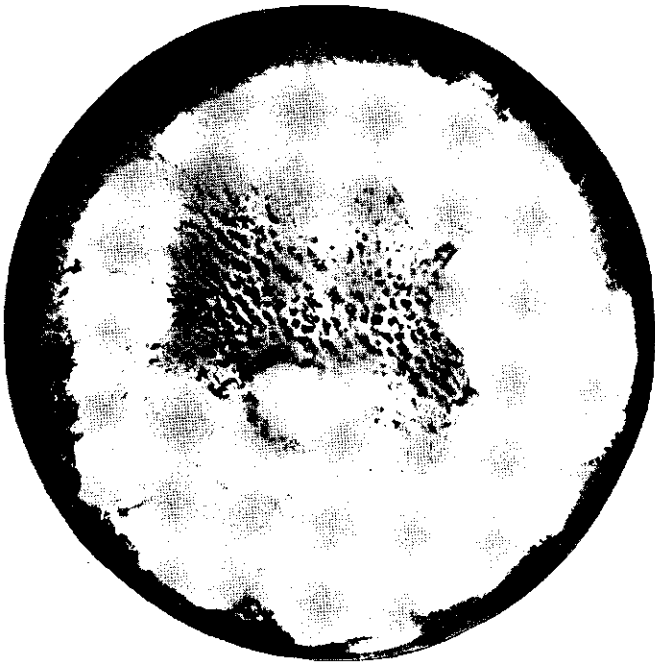


Fig. 8.



toegelaten, die ook streek door kaliloog en op den bodem van de exsiccator werd nog 100 c.c. natronloog 1 : 1 gedaan. Na 8 weken staan was nog geen nitraat gevormd.

Ten laatste werd nog nagegaan of verschillende organische stoffen als koolstofbron kunnen dienen. De proef werd op dezelfde wijze ingericht als die met de carbonaten, maar in plaats van carbonaten werden toegevoegd resp. dextrose, laevulose, saccharose, lactose, manniet en stukjes filtreerpapier. Natuurlijk werden in de exsiccatoren contrôlekolfjes gedaan, waaraan geen organische stoffen waren toegevoegd. Het bleek, dat na 5 weken staan de contrôlekolfjes geen nitraat bevatten, maar de overige wel, waaruit dus volgt, dat de nitraatvormende bacteriën hunne koolstof uit bovengenoemde stoffen kunnen gebruiken.

*Samenvatting.* Het is gebleken, dat behalve de Nitrobacter Winogradskyi er nog minstens 4 andere nitraatvormende bacteriën bestaan. Verder dat deze laatste vier de eigenschap hebben cellulose aan te tasten en in voedingsbodems met veel organische stof kunnen leven en zelfs nitraat maken uit nitriet. Deze bacteriën kunnen uitdrogen goed verdragen en oefenen hunne functies uit in tegenwoordigheid van ammoniumsulfaat. Ook is gebleken, dat zij hunne benodigde koolstof kunnen halen uit het koolzuur en verschillende organische stoffen als dextrose, laevulose, saccharose, lactose, manniet en cellulose, maar niet uit carbonaten.

Het is mij eene aangename plicht om Dr. F. C. GERRETSEN, directeur van de microbiologische afdeling van het Rijkslandbouwproefstation te Groningen dank te zeggen voor den steun, die ik bij mijn werk mocht ontvangen.

---

#### Verklaring der foto's.

1. Nitrobacter flavus 1000 ×.
  2. Nitrobacter roseo-albus 1000 ×.
  3. Nitrobacter opacus 1000 ×.
  4. Nitrobacter punctatus 1000 ×.
  5. Kolonie van N. punctatus 50 ×.
  6. Kolonies van N. opacus 50 ×.
  - 7 en 8. Gewezen schijven filtreerpapier na drie weken staan, nadat enting met de N. opacus had plaats gehad. Schijven filtreerpapier geënt met de drie andere nitraatvormende bacteriën gaven nagenoeg hetzelfde beeld te zien.
-

