

# En stamme af *Nitrosomonas europaea* fra staldgødning.

Af H. L. Jensen.

## Indledning.

Som bekendt er rendyrkning af de nitrificerende bakterier (*Nitrosomonas* og *Nitrobacter*) især for den første slægts vedkommende forbundet med store vanskeligheder, da disse organismer kun vokser meget langsomt på fast substrat og hemmes af mange, især kvælstofholdige, organiske stoffer i ret lav koncentration. Siden *Winogradsky's* (1892) klassiske undersøgelser synes pålidelige renkulturer kun at være opnået af *Boullanger* og *Massol* (1903), *Makrinoff* (1909), *Bonazzi* (1919), *Gibbs* (1919), *Boltjes* (1934), *Hanks* og *Weintraub* (1937) og *Meiklejohn* (1949) ved dyrkning på kiselsyre-gel, af *Rubentschick* (1929) ved dyrkning på gibsplader, af *Nelson* (1931) ved mikromanipulation, og af *Heubült* (1929), *Engel* og *Skallau* (1934) og *Bömeke* (1939) ved særlige fortyndingsmetoder. Disse kulturer stammer næsten alle fra jord, enkelte fra kloakfiltre (*Boullanger* og *Massol*) eller saltvandsdynd (*Rubentschick*). Også i staldgødning vides salpeterbakterier at forekomme (*Niklewski*, 1934), men der synes ikke at foreligge meddelelser om renkulturer heraf. En sådan organisme omtales i det følgende.

## Isolation.

*Cutler* og *Mukerji* (1931) har beskrevet forskellige heterotrofe bakterier, der vokser på almindelige bakteriologiske substrater og angives at danne små mængder nitrit af ammoniumsulfat. I løbet

af sommeren 1948 anstilledes, forøvrigt med negativt resultat, en del forsøg på at isolere sådanne bakterier fra staldgødning. En enkelt kultur, der gav tydelig nitritdannelse i *Cutler* og *Mukerji's* sucrose-ammoniumsulfat-opløsning, viste sig at være forurenset med »ægte« salpeterbakterier, idet den viste kraftig nitrifikation i den nedennævnte uorganiske ammoniumsulfat-opløsning, hvorimod de bakterier, der voksede på kødextrakt-pepton-agar, ganske manglede nitrifikationsevne. Da den oprindelige blandede kultur hidrørte fra en koloni på et agarsubstrat svarende til *Cutler* og *Mukerji's* opløsning, syntes den pågældende stamme af *Nitrosomonas* således at kunne vokse på agar. I litteraturen angives som regel, at *Nitrosomonas* ikke lader sig dyrke på agarsubstrat; enkelte positive angivelser foreligger dog (*Gibbs, Bonazzi*), og senere har *Boltjes* (1934) og *Hes* (1937) iagttaget en påfaldende god vækst af *Nitrosomonas* på ammoniumsulfat-agar med tilsætning af »Nährstoff Heyden« (albumose) og iflg. *Hes* tillige jordextrakt og gærextrakt. I overensstemmelse hermed viste den foreliggende urene kultur sig ved udgnidning på agar med ammoniumsulfat-opløsning at give stærk nitritdannelse i agaren, og samtidig fremkom der efter 2–3 ugers inkubation ved 25° C. mellem de makroskopisk synlige kolonier af ikke-nitrificerende bakterier talrige ganske små (højest ca. 0,1 mm) ukarakteristiske kolonier af bakterier, som dannede nitrit ved podning i ammoniumsulfat-opløsning. Efter to agarpassager og gentagne fortyndinger i ammoniumsulfatopløsning opnåedes sluttelig kulturer, der opfyldte de almindelige kriterier på en renkultur af *Nitrosomonas*: mikroskopisk ensartethed, kraftig nitritdannelse af ammoniumsalte, men ikke af andre kvælstofforbindelser, ingen vækst på almindelige bakteriologiske substrater (kødextrakt-pepton-bouillon og -agar med eller uden glucosetilsætning, peptonvand, gærextrakt, glucose-asparagin-lucerne-extraktagar) efter 2 til 4 ugers inkubation. Ej heller fremkom der, bortset fra tilfældige luftforureninger, nogen kendelig vækst i ammoniumsulfat-opløsning med tilsætning af forskellige organiske stoffer (sukkerarter, alkoholer, aminosyrer, pepton, salte af organiske syrer). I ren ammoniumsulfat-opløsning, og undertiden også i opløsning med lavere koncentrationer af nogle organiske stoffer, sås efter 6–8 dages forløb en netop synlig, ensartet uklarhed, der skyldes selve salpeterbakterierne, som omtalt allerede af *Wino-*

gradsky (1892). Den af Boltjes (1934) beskrevne ejendommelige *Hyphomicrobium vulgare*, der ofte ledsager salpeterbakterierne, sås ikke ved mikroskopisk undersøgelse eller ved dyrkning på natriumformiat-ammoniumsulfat-agar.

### Morfologiske karaktertræk.

I ammoniumsulfat-opløsning sås ret store, ovale stave,  $0.6-1.0 \times 0.8-2.4 \mu$ , overvejende af »nul-form«, som beskrevet af Winogradsky (1892), mest enkeltvis, ofte parvis, undertiden 3-4 sammenhængende celler, men aldrig længere kæder. (se pl., fig. 1-3). I unge kulturer (6-8 dage) sås mange livligt bevægelige celler; ciliefarvning efter Gray viste en enkelt polær cilie, men lykkedes forøvrigt sjældent. Nogen zoogloeadannelse kunne ikke iagttages. Cellerne farvedes ret dårligt med almindelige basiske farvestoffer, derimod godt med fenol-anilinblåt i eddikesur opløsning. *Nitrosomonas* beskrives almindeligt som grampositiv, af Meiklejohn (1949) dog som gramnegativ. Også den foreliggende stamme var nærmest gramnegativ, omend en del af cellerne kunne ses at beholde noget af gramfarven, især når kontrastfarvning udelodes; den må således betegnes som gramlabil. I kolonier på agar sås talrige uregelmæssigt opsvulmede, pæreformede eller ovale celler, undertiden næsten af *Azotobacter*-størrelse (se pl., fig. 4), sandsynligvis involutionsformer (sml. Winogradsky, 1892). Bortset fra den manglende zoogloeadannelse, som forøvrigt også er omtalt af Rubentschick (1929) og Nelson (1931), synes organismen identisk med *Nitrosomonas europaea* Winogradsky (1892).

### Biologiske egenskaber.

Væksten under forskellige betingelser undersøgte ved dyrkning i ammoniumsulfat-opløsning (efter F. Löhnis, Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.4 g (den sidste unødvendigt høje koncentration reduceredes ofte til 0.1 g), ledningsvand 1000 ml. Efter autoklavering tilsattes særskilt steriliseret calciumcarbonat som stødpude; det ellers almindeligt anvendte magnesiumcarbonat gav substratet en så stærkt alkalisk re-

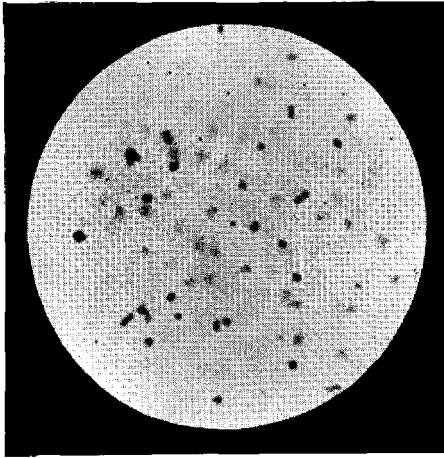


Fig. 1.

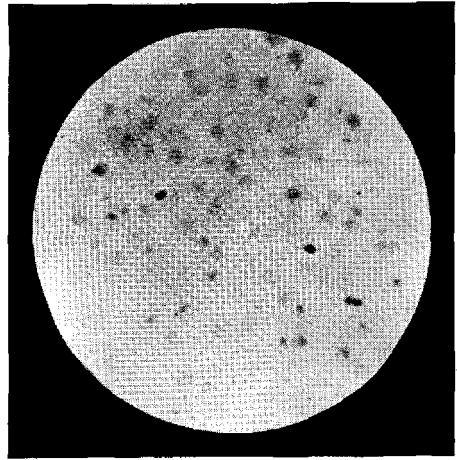


Fig. 2.

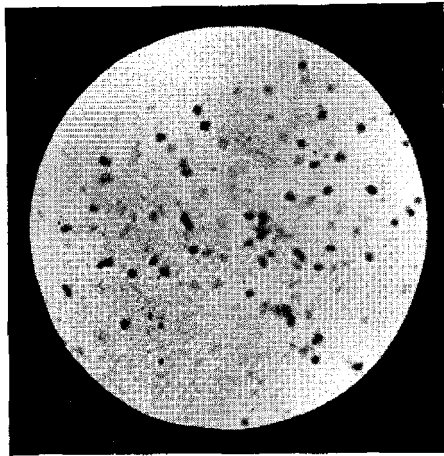


Fig. 3.

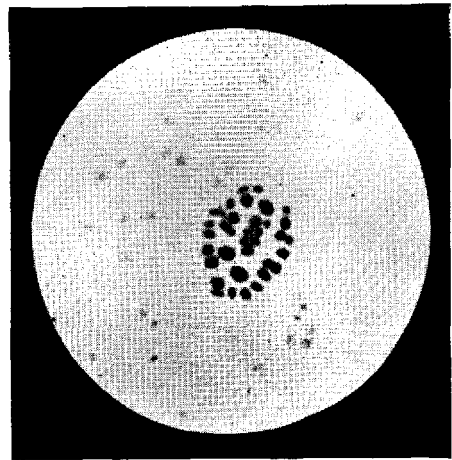


Fig. 4.

Fig. 1-3: normale celler i ammoniumsulfatopløsning. 6-8 d. 25° C.  
Fig. 4: opsvulmede celler, ammoniumsulfat-agar. 18 d. 25° C.  
Forst.  $\times 1000$ . Färvning med fenol-anilinblått + eddikesyre.

aktion, at nitrifikationen vanskeligt kom i gang og forblev svag. Hovedparten af forsøgene udførtes i reagensglas med 5 ml opløsning, der podedes med en dråbe af en kraftigt nitrificerende, 1–3 uger gammel kultur fortyndet med sterilt substrat i forholdet 1:10. Efter 1, 2, 3 og undertiden 4 ugers inkubation prøvedes kulturerne kvalitativt for nitrit med Gries' reagens (en øskenfuld kultur-opløsning + 6 dråber reagens på en porcelænsplade). Prøver med opløsninger af kendt nitritindhold viste følgende tilnærmelsesvise farveskala:

1) Netop synlig rød farve.....	0.1 $\mu$ /ml $\text{NO}_2\text{-N}$ .
2) Svag, men tydelig » .....	1— 2 » »
3) Stærk » .....	10— 20 » »
4) Meget stærk » .....	50—100 » »
5) do. efterfulgt af brun misfarvning.....	> 100 » »

En reaktion af farvestyrke (1) er ikke signifikant, da sådanne små nitritmængder ofte kan findes som urenhed eller overføres med podematerialet. I andre forsøg udførtes kvantitative nitritbestemmelser efter Gries-Ilosvay (*Snell*, 1945); hertil anvendtes 25 ml opløsning i 250-cc mælkeflasker med samme mængde podemateriale som i reagensglasforsøgene. Der undersøgte stedse to parallelkulturer, i nogle tilfælde flere. Inkubationstemperaturen var 25° C, hvor andet ikke er angivet.

Temperaturforhold. Kvalitative forsøg viste, at nitritdannelsen var noget svagere ved 35° C end ved 25° C, yderst svag ved 40° C og helt standset ved 42° C. Resultaterne af et kvantitativt forsøg over et videre temperaturinterval er gengivet i tabel 1, som viser, at optimum ligger ved ca. 30° C, medens 5° C og 38° C øjensynlig er meget nær henholdsvis minimum og maximum.

Reaktion. En bestemmelse af den maximale syretolerans udførtes ved periodisk bestemmelse af pH (kinhydronelektrode) og nitrit i substrat uden calciumcarbonat, men med 0.05 pct. calciumklorid. Resultaterne (tabel 2) viser, at når substratet har nået pH 5.4–5.7, forøges hverken nitritmængden eller brintionkoncentrationen yderligere. Surhedsgrænsen synes således at ligge ved pH ca. 5.5, hvilket er betydeligt lavere end i den af *Meyerhof* (1917) studerede stamme. Den øvre grænse synes at ligge lidt over pH 9 (opløsning med magnesiumcarbonat).

Tabel 1. Nitritdannelse ved forskellig temperatur.  
(Nitrite-formation at different temperature).

Temperatur	NO <sub>2</sub> -N, γ/ml, efter			
	7 dage	14 dage	32 dage	45 dage
5—8° C	(0)	0.2	0.7	24
	(0)	0.2	0.7	24
13—17° C	4.0	12	180	—
	4.0	80	180	—
25° C	80	160	—	—
	80	160	—	—
30—31° C	160	160	—	—
	160	160	—	—
37—38° C	2.4	0.6	—	—
	4.4	6.0	—	—

Tabel 2. Reaktionsændring og nitritdannelse i CaCO<sub>3</sub>-fri opløsning.  
(Change of reaction and nitrite-formation in CaCO<sub>3</sub>-free solution).

Inkubationstid dage. (Incubation days)	Antal fælleskulturer (No. of replicates)	pH	NO <sub>2</sub> -N, γ/ml (Gennemsnit) (Mean)
0	3	6.7—7.1	0.5
5	4	6.2—6.5	7.0
10	4	5.7—6.0	15.0
14	4	5.5—5.6	20.0
18	4	5.6—5.7	18.0
21	3	5.4—5.6	20.0
24	2	5.4—5.7	20.0

Organiske stoffers indflydelse prøvedes for en lang række forbindelsers vedkommende kvalitativt, i en del tilfælde tillige kvantitativt. De fleste stoffer sattes direkte til substratet og steriliseredes sammen med dette ved autoklavering. De mere ubestandige eller flygtige forbindelser steriliseredes ved filtrering (Ber-

kefeld-filter N) af en stamopløsning, som derefter sættes aseptisk til det autoklaverede grundsubstrat. Resultaterne af de kvalitative forsøg med kvælstoffrie stoffer findes i tabel 3. Det må hertil bemærkes, at »hemning kendelig« i mange tilfælde kun betyder, at den kvalitative reaktion efter 1 uge var lidt svagere end i kontrolkulturerne.

Tabel 3. Hemningsvirkning af kvælstoffrie organiske stoffer over for *Nitrosomonas*  
(Inhibitory effect of non-nitrogenous compounds towards *Nitrosomonas*)

Forbindelse (Compound)	Hemning kendelig (Inhibition visible)		Højeste konc. tilladende nitrifikation (Highest conc. that permits nitrification)		Fuldstændig hemning (Complete inhibition)	
	pct.	mol.	pct.	mol.	pct.	mol.
Methylalkohol*)	0.01	0.0031	0.025	0.0078	0.05	0.016
Æthylalkohol*)	0.40	0.087	1.00	0.22	1.25	0.27
Butylalkohol	0.02	0.0027	0.20	0.027	0.40	0.054
Amylalkohol	0.01	0.0011	0.10	0.011	0.25	0.028
Glycerin	1.00	0.11	5.00	0.56	6.00	0.67
Na-formiat	0.10	0.015	2.50	0.37	3.00	0.44
Na-acetat, 3H <sub>2</sub> O	1.50	0.11	6.00	0.44	8.00	0.59
Na-propionat	0.20	0.021	3.50	0.37	4.00	0.42
Na-butytrat, H <sub>2</sub> O	0.20	0.016	2.00	0.16	2.50	0.20
Na-lactat	0.20	0.028	0.80	0.071	1.20	0.11
Na-pyruvat	1.50	0.14	> 1.50	> 0.14		
Na-succinat, 6H <sub>2</sub> O	4.00	0.15	8.00	0.30	10.00	0.37
Na-citrat, 5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1.50	0.042	2.50	0.070	3.00	0.084
Xylose*)	0.40	0.027	0.80	0.053	1.00	0.067
Glucose*)	8.00	0.44	10.00	0.56	12.00	0.67
Lævulose*)	< 4.00	< 0.22	4.00	0.22	5.00	0.28
Mannose*)	0.10	0.0056	0.20	0.011	0.40	0.022
Saccharose	2.50	0.073	20.00	0.58	25.00	0.73
Na-thioglycolat*)	0.002	0.00017	?		?	

\*) Steriliseret ved filtrering (sterilized by filtration).

De monovalente alkoholer er med undtagelse af æthylalkohol særdeles giftige (sml. *Meyerhof*, 1917), medens glycerin er påfaldende uskadeligt. Ligeledes har formiat (til trods for sine reducerende egenskaber), acetat og propionat kun ringe hemningsvirkning, butytrat noget mere. Lactat virker ret stærkt hemmende, ejendommeligt nok mere end pyruvat, uagtet det sidste ligesom formiat har reducerende egenskaber. Succinat tåles i omtrent samme mo-

lære koncentration som formiat og acetat, hvorimod citrat ligesom butyrat og lactat har en vis specifik hemningsvirkning.

Af sukkerarterne er xylose ret stærkt hemmende, og det samme gælder i endnu højere grad om mannose. Derimod tåles lævulose i en koncentration på 4 pct., og glucose og saccharose endog i koncentrationer på henholdsvis 10 og 20 pct. Det er interessant at lægge mærke til, at glycerin, glucose og saccharose standser nitrifikationen i omtrent samme molære koncentration, og denne er så høj, at det synes at dreje sig om en simpel osmotisk effekt.

I modsætning til sterilfiltreret glucose var glucose steriliseret ved autoklivering (20 min. 120° C, særskilt eller sammen med substratet) langt mere skadeligt, idet den standsede nitrifikationen i en koncentration på 1.5–2.5 pct., noget varierende i forskellige forsøg. Denne hemningsvirkning ophævedes ikke ved behandling af den autoklaverede glucoseopløsning med aktivt benkul og påfølgende sterilfiltrering og skyldes således ikke de ved ophedningen dannede karamelstoffer, der absorberedes fuldstændigt af benkul, men sandsynligvis en delvis omlejring af glucosen til den mere skadelige mannose (*de Bruyn & van Ekenstein*, 1895). Endelig ses natriumthioglycolat at have en meget stærk giftvirkning, som dog kun er forbigående, sandsynligvis på grund af gradvis iltning.

Resultaterne af de kvantitative forsøg ses i tabel 4–6 og stemmer ganske overens med de foregående. I koncentrationer op til 5 pct. synes filtreret glucose overhovedet ikke at hemme nitrifikationen, og i forsøget med 10 pct. glucose stiger nitritdannelsen meget stærkt fra 10 til 21 dage; der må således her være sket en stærk formering af bakterierne og ikke blot respiration af podematerialet, som måske har foranlediget den ganske svage nitrifikation i opløsning med 12 pct. glucose. Til sammenligning kan anføres, at *Meyerhof* (1917) i kortvarige respirationsforsøg fandt ret stærk nitrifikation i 0.6 mol (10.8 pct.) glucose (sterilisationsmetode ikke angivet), og at *Boltjes* (1934) fandt både nitrifikation og formering af bakterierne i 4 pct. glucoseopløsning, når der anvendtes rigeligt podemateriale (2 rumfangsprocent af moderkulturen), medens 0.05 mol (0.9 pct.) glucose hemmede nitrifikationen fuldstændigt, når der kun anvendtes et podemateriale på 0.2 pct. I de nærværende forsøg svarede mængden af podemateriale kun til ca. 0.02



pet. af moderkulturen (1 dråbe kultur, fortyndet 1:10, pr. 25 ml substrat). Endvidere ses, at autoklaving ved pH 6.0 giver noget mindre hemning end ved pH 7.5. Overhovedet minder glucosens forhold over for *Nitrosomonas* om det tilsvarende hos cellulose-sønderdelende bakterier (*Cytophaga*), der også hemmes stærkere af autoklaveret end af filtreret glucose, især hvis autoklavingen sker i alkalisk opløsning (Stanier, 1942; Sijpesteijn og Fåhræus, 1949).

Tabel 4. Hemningsvirkning af organiske syrer.  
(Inhibitory effect of organic acids).

Ca-lactat pct.	NO <sub>2</sub> -N, γ/ml, efter		Na-succinat pct.	NO <sub>2</sub> -N, γ/ml, efter		Na-citrat pct.	NO <sub>2</sub> -N, γ/ml, efter	
	14 d.	24 d.		14 d.	24 d.		14 d.	28 d.
0	180 180	180 180	0	80 80	160 160	0	120 120	180 180
0.10	160 160	160 160	2.0	80 80	60 *)	0.50	160 160	200 200
0.20	100 100	130 120	4.0	70 70	70 70	1.00	160 160	150 150
0.40	10 10	30 40	5.0	80 80	80 80	1.50	160 160	160 160
0.60	0.14 0.16	7 0.2	6.0	80 80	80 70	2.00	120 80	140 140
0.80	0.12 0.12	30 0.1	7.0	70 70	80 70	2.50	60 50	100 100
			8.0	60 60	70 70	3.00	0.4 0.4	0.3 0.7

\*) Svampeforurening (fungal contamination).

Der anstilledes et forsøg i ammoniumsulfat-opløsning med 0.2 pct. sterilfiltreret glucose, som bestemtes kvantitativt efter Stiles o. a. (1926) efter 14 dages inkubation. Glucoseforbrug kunne ikke med sikkerhed påvises, idet glucoseindholdet i kulturer af *Nitrosomonas* kun var ca. 5 pct. lavere end i tilsvarende steril op-

Tabel 5. Hemningsvirkning af glucose.  
(Inhibitory effect of glucose).

Glucose, steril-filtreret pct.	NO <sub>2</sub> -N $\gamma$ /ml, efter		Glucose, auto-klaveret, pct.	NO <sub>2</sub> -N $\gamma$ /ml, efter		Glucose, steril-filtreret, pct.	NO <sub>2</sub> -N $\gamma$ /ml, efter	
	11 d.	20 d.		11 d.	20 d.		10 d.	24 d.
0	160 160	160 160	0	160 160	160 160	0	100 100	100 100
1.0	140 120	160 160	1.0	60 60	140 140	10.0	30 0.2	100 100
2.0	140 60	140 120	2.0	4 *)	10 0.4	12.0	0.3 0.3	0.6 *)
3.0	140 140	140 140	3.0	0.05 0.05	0.05 0.05	15.0	0.05 0.05	0.05 0.05
4.0	120 *)	150 150	4.0	0.05 0.05	0.05 0.05			
5.0	120 120	160 160	5.0	0.05 0.05	0.05 0.05			

\*) Svampeforurening (fungal contamination).

Tabel 6. Hemningsvirkning af glucose efter autoklavering ved forskellig pH.  
(Inhibitory effect of glucose after autoclaving at different pH).

Glucose pct.	Sterilisation af glucosen	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml efter	
		7 d.	15 d.
0	—	36 36	140 140
2.5	Filtrering	36 36	140 140
2.5	Autoklavering ved pH 6.0	0.15 0.25	10 80
2.5	Autoklavering ved pH 7.5	0.05 0.05	0.04 0.04
2.5	Autoklavering ved pH 7.5, absorption med benkul, filtrering.	0.12 0.12	3 3

løsning. Det må overlades til senere undersøgelser at afgøre, hvorvidt denne ubetydelige forskel skyldes aktiv glucosenedbrydning eller andre årsager.

Resultaterne af forsøgene med kvælstofholdige stoffer ses i tabel 7—9. Monocarboxyl- og dicarboxylaminosyrerne udviser en påfaldende forskel, idet alanin og især glycin er stærkt hemmende, medens asparaginsyre og glutaminsyre tåles i påfaldende høje koncentrationer. I modsætning til asparaginsyre udøver asparagin en hemningsvirkning af samme størrelsesorden som glycin og alanin; amid-gruppen i asparaginmolekylet synes således at forøge dets giftighed ganske betydeligt. Urinstof er påfaldende uskadeligt, idet det først standser nitrifikationen i en lignende molær koncentration som glycerin, glucose og saccharose. Hvis man sammenligner de molære koncentrationer af amino-kvælstof svarende til de højeste koncentrationer af de forskellige forbindelser, der endnu tillader nitrifikation, finder man:

	mol NH <sub>2</sub>
Glycin.....	0.0067
Alanin.....	0.034
Asparagin.....	0.040
Asparaginsyre.....	0.11
Glutaminsyre.....	0.17
Urinstof.....	1.33

Hemmingsvirkningen afhænger således ikke af koncentrationen af NH<sub>2</sub>-grupper i og for sig, men helt og holdent af det kulstofskelet, hvortil disse grupper er knyttede. Det kan forøvrigt her bemærkes, at hverken urinstof, asparaginsyre eller glutaminsyre undergik nogen påviselig nitrifikation i grundopløsning uden ammoniumsulfat.

Pepton tåles i væsentlig højere koncentration end af de fleste andre stammer af *Nitrosomonas* (se senere); kun den af Nelson (1931) isolerede stamme udviser et lignende forhold. Her må dog erindres, at pepton ikke er et kemisk definerbart produkt, og at forskellige præparater sikkert har forskellig virkning (sml. Boltjes, 1934).

Cystein udviser et højst ejendommeligt forhold, idet ganske små koncentrationer hemmede væksten fuldstændigt, men ved stigende koncentration forsvandt hemningen for senere at optræde

Tabel 7. Hemningsvirkning af kvælstofholdige stoffer på *Nitrosomonas*.  
(Inhibitory effect of nitrogenous compounds on *Nitrosomonas*).

Forbindelse (Compound)	Hemming kendelig (Visible inhibition)		Højeste koncentration tilladende nitrifikation (Highest concentration permitting nitrification)		Fuldständig hemning (Complete inhibition)	
	pct.	mol.	pct.	mol.	pct.	mol.
Glycin.....	0.02	0.0027	0.05	0.0067	0.10	0.013
Alanin.....	0.20	0.022	0.30	0.034	0.40	0.048
Asparaginsyre..... (aspartic acid)	0.60	0.042	1.50	0.11	2.00	0.15
Glutaminsyre..... (glutamic acid)	1.50	0.10	2.50	0.17	3.00	0.20
Asparagin (H <sub>2</sub> O).....	0.10	0.0067	0.30	0.020	0.40	0.027
Urinstof*) (urea).....	1.50	0.25	4.0	0.67	5.0	0.83
Pepton (Bacto).....	0.05	—	0.4—0.75	—	0.5—0.8	—
Cystein - HCl*).....	0.003	0.00037	a) 0.02 b) 0.10	0.0027 0.0063	a) 0.05 b) 0.10	0.0032 (0.0063)

\*) Steriliseret ved filtrering.

igen ved endnu højere koncentration. En forklaring kunne muligvis tænkes at ligge deri, at selve cysteinet ved lav koncentration virker hemmende i kraft af sine reducerende egenskaber, der skyldes dets SH-gruppe. I opløsning er imidlertid cystein tilbøjeligt til under iltning at kondenseres til det ikke-reducerende cystin ( $2\text{CH}_2\text{SH} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH} \rightarrow \text{COOH} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CH}_2\text{S} \cdot \text{SCH}_2 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$ ), hvilken proces må ventes at fremskyndes ved stigende cysteinkoncentration; den sekundære hemning skyldes da sandsynligvis cystinets  $\text{NH}_2$ -grupper. Virkningen af cystein på *Nitrosomonas* synes hidtil kun undersøgt af Nelson (1931), som fandt, at det i koncentrationer under 0.001 pct. ikke udøvede nogen påviselig hemning, hvilket han tilskrev dets omdannelse til cystin.

I det store og hele synes den foreliggende stamme af *Nitrosomonas* således langt mere tolerant over for mange organiske stoffer end de hidtil beskrevne, selv når der tages hensyn til, at der i tidligere undersøgelser synes at være anvendt autoklaveret glucose. En sammenligning med forskellige andre stammer ses i tabel 10, hvortil yderligere kan tilføjes, at Heubült's (1929) stamme hem-

Tabel 8. Hemningsvirkning af glutaminsyre, urinstof og pepton.  
(Inhibitory effect of glutamic acid, urea, and peptone).

Glutaminsyre pct.	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml, efter		Urin- stof pct.	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml, efter		Pepton pct.	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml, efter	
	12 d.	24 d.		14 d.	28 d.		14 d.	28 d.
0	140 140	160 160	0	100 100	160 160	0	100 120	160 160
0.10	120 120	140 140	1.0	40 50	90 90	0.10	110 100	160 160
0.20	130 130	140 180	2.0	20 20	45 45	0.20	10 *)	120 120
0.40	140 140	160 180	2.5	10 10	40 40	0.30	60 *)	60 80
0.80	100 100	160 160	3.0	4 4	5 6	0.50	0.4 0.4	70 100
1.20	100 100	160 180				0.60	0.9 2.4	30 (0)
1.60	80 70	160 *)				0.80	0.4 7.2	0.3 1.6
2.00	1.0 0.6	30 20						

\*) Bakteriefurening (bacterial contamination).

medes meget stærkt af 0.3 pct. glucose, 0.5 pct. natriumbutyrate, 0.3 pct. urinstof og 0.2 pct. pepton, og *Rubentschick's* (1929) fuldstændigt af 0.25 pct. glucose og 0.2 pct. pepton. I denne forbindelse må det erindres, at den foreliggende stamme var isoleret fra staldgødning, et habitat, som i kraft af sit høje indhold af opløselige organiske stoffer nødvendigvis må virke selektivt på de i denne henseende mest modstandsdygtige stammer af *Nitrosomonas*. Et dyrkningsforsøg i udpresset, sterilfiltreret saft af velopbevaret og stærkt omsat staldgødning viste ingen nitritdannelse, ligesom gødningssaften virkede stærkt hemmende på nitrifikationen af ammoniumsulfat (svag nitritdannelse i opløsning med 5 pct. gødningssaft, ingen ved højere koncentration). Denne hemningsvirkning

Tabel 9. Hemningsvirkning af cystein.  
(Inhibitory effect of cysteine).

Cystein-HCl, pct.	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml, efter		Cystein-HCl, pct.	NO <sub>2</sub> -N, $\gamma$ /ml, efter	
	10 d.	20 d.		10 d.	21 d.
0	100 100	180 180	0	120 120	160 160
0.002	100 100	160 160			
0.005	0.2 40	0.1 0.1			
0.010	0.1 0.1	0.1 0.1	0.010	0.1 0.1	0.1 0.1
0.020	0.1 0.1	0.1 1.4	0.020	0.1 0.1	0.1* 0.2*
0.050	32 36	90 100	0.050	0.1 0.1	4 80
0.10	20 20	60 60	0.10	20 20	80 80
			0.20	0.6 1.0	20 30

\*) Svampeforurening (fungal contamination).

skyldes næppe gødningens høje indhold af organisk stof i og for sig, men sikkert også dens stærkt alkaliske reaktion grundet på det høje ammoniakindhold samt specifikke stoffer dannede ved anaerobe gæringsprocesser, såsom aminer, butylalkohol, cystein eller andre SH-forbindelser. I gødning under luftadgang, hvor disse forbindelser kan iltes og ammoniakken delvis fordampe, vil der sandsynligvis være betingelser for nitritdannelse og følgelig også for kvælstoftab ved denitrifikation. Herover vil nærmere undersøgelser blive udført.

Hydroxylamin og oximkvælstof. Vort kendskab til selve nitrifikationsprocessens biokemi er endnu meget ufuldkomment. *Kluyver & Donker* (1926) har hypotetisk forklaret iltningen af am-

Tabel 10. Vækststandsende koncentration (pct.) af organiske stoffer overfor forskellige stammer af *Nitrosomonas*.

(Concentration of organic compounds causing complete inhibition of various strains of *Nitrosomonas*).

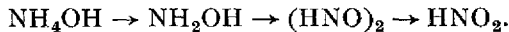
Forbindelse (Compound)	Wino- gradsky & Omeliamsky (1899)	Boltjes (1934)	Nelson (1931)	Nær- værende (Present)
Na-formiat...	> 1.5	1.36		3.00
Na-acetat...	> 1.5	> 2.72		8.00
Na-butyrat...		2.20		2.50
Na-lactat...		2.24		1.20
Na-succinat...			(1.00)	10.00
Na-citrat...		3.57		3.00
Glycerin.....		> 1.84	2.00	6.00
Xylose.....	0.20		0.50	1.00
Glucose.....		1.00*	1.00	12.00
Lævulose....			(1.00)	5.00
Mannose....			(1.00)	0.40
Saccharose...			(1.00)	25.00
Glycin.....		0.37 (0.037)		0.10
Asparagin...	0.30	0.75 (0.075)		0.40
Urinstof.....	?	(0.30)		5.00
Pepton.....	0.20		> 0.50 < 1.00	0.5—0.8

Tal i parentes angiver meget stærk, men ufuldstændig eller variabel hemning.

(Figures in brackets indicate very strong but incomplete or inconstant inhibition).

\*) I kulturer med ringe mængde podemateriale.  
(In cultures with small inoculum).

moniak som en successiv dehydrogenation forløbende over hydroxylamin og hyponitrit til nitrit efter skemaet:



Forsøg på at påvise hydroxylamin og hyponitrit som mellemprodukter har imidlertid givet usikre resultater (*Corbet's* (1935) forsøg, hvor anselige mængder hyponitrit kunne påvises, var ikke udførte med renkulturer), og hydroxylamin er stedse fundet unitrificerbart (*Boullanger & Massol*, 1904; *Meyerhof*, 1917; *Nelson*, 1931). Også den foreliggende stamme viste sig ude af stand til at

nitrificere hydroxylamin, der endog var særdeles giftigt, idet allerede 0.001 pct. hydroxylaminhydroklorid virkede meget stærkt og 0.002 pct. fuldstændigt hemmende på nitrifikationen af ammoniumsulfat (sml. *Meyerhof*, 1917).

I nitrifikationsforsøg med jord efter en særlig teknik (gennemstrømning af jorden med næringsstofopløsning) fandt *Lees* og *Quastel* (1946), at hydroxylamin ikke kunne nitrificeres og undertrykte nitrifikationen af ammoniumsulfat, hvorimod det undergik hurtig nitrifikation, når der samtidig tilsattes en ækvivalent mængde natriumpyruvat, hvorved hydroxylaminet bindes som pyrodruesyreoxim ( $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3 \cdot \text{CNOH} \cdot \text{COOH}$ ). Nitrifikationskurvens forløb tydede på, at oximet nitrificeredes uden forudgående omdannelse til ammoniak. I et ganske nyt arbejde har *Quastel* og *Scholefield* (1949) fremdraget omstændigheder, der tyder på, at oximkvælstoffets nitrifikation ikke skyldes de alminde-

Tabel 11. Nitritdannelse i opløsning med pyrodruesyreoxim.  
(Nitrite formation in solution containing pyruvic acid oxime).

Tilsætning til grundsubstratet (Addition to basal medium)			NO <sub>2</sub> -N, γ/ml, efter	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pct.	Na-pyruvat mol.	Hydroxylamin mol.	14 d.	24 d.
0.10			140. 140	140 140
0.10	0.010	0.002 (oxim)	80 30	
0.10		0.002	0.2 0.2	0.3 0.3
0.10	0.020		60 30	
	0.020	0.004 (oxim)	0 0	0 0
		0.002*)		0.3 0.2

\*) Steril kontrolopløsning (sterile control solution).



lige salpeterbakterier, men andre, sandsynligvis heterotrofe, organismer, hvorover nærmere undersøgelser stilles i udsigt.

I overensstemmelse hermed viste *Nitrosomonas* sig ganske ude af stand til at nitrificere pyrodruesyreoxim, der fremstillede ved i opløsning af pH 7.5–8.0 at blande hydroxylaminhydroklorid og 4–8 ækvivalenter natriumpyruvat; et betydeligt overskud af pyruvat er nødvendigt for at opnå fuldstændig binding af det giftige hydroxylamin (sml. *Novak & Wilson, 1948*). Oximopløsningen steriliseredes ved filtrering og sattes aseptisk til grundsubstrat med og uden ammoniumsulfat. Et eksempel ses i tabel 11, der viser, at oximet ligesom det frie hydroxylamin ikke alene er unitrificerbart, men også hemmer nitrifikationen af ammoniumsulfat (hvilken virkning dog formodentlig tildels skyldes overskuddet af pyruvat).

### Resumé.

Fra staldgødning isoleredes en nitritdannende bakterie, der morfologisk og kulturelt synes identisk med *Nitrosomonas europaea* Winogradsky, men var betydeligt mindre følsom over for mange organiske stoffer. Monovalente alkoholer med undtagelse af æthylalkohol var ret giftige, medens glycerin tålte i en koncentration på 0.56 mol. Natriumformiat, -acetat og -propionat tålte i koncentrationer på 0.3–0.4 mol; butyrat, citrat og navnlig lactat var noget stærkere hemmende. Af sukkerarterne var xylose og navnlig mannose ret skadelige, medens glucose og saccharose tålte i koncentrationer på 0.5–0.6 mol, glucosen dog kun i sterilfiltreret tilstand. Efter sterilisation ved autoklavering, især ved svagt alkalisk reaktion, virkede glucose ret stærkt hemmende, sandsynligvis på grund af delvis omlejring til den langt mere giftige mannose.

Alanin, asparagin og især glycin havde betydelig hemningsvirkning, medens asparaginsyre, glutaminsyre og især urinstof var ret uskadelige. Cystein viste to hemningszoner, en primær ved meget lav og en sekundær ved noget højere koncentration. Hverken frit hydroxylamin eller pyrodruesyreoxim kunne nitrificeres; det første var særdeles giftigt, og det andet virkede i nogen grad hemmende på nitrifikationen af ammoniumsulfat. Hydroxylamin synes således ikke at være et intermedært produkt i nitrifikationsprocessen.

Den fundne organisme vil under visse omstændigheder muligvis kunne være virksom i staldgødning og således give anledning til kvælstofab ved denitrifikation.

### Summary.

#### A Strain of *Nitrosomonas europaea* from Farmyard Manure.

A nitrite-producing organism was isolated from farmyard manure by alternating dilution and plating on ammonium sulphate agar. In most respects it agreed with *Nitrosomonas europaea* Winogradsky: non-sporeforming, oval rods, 0.6–1.0 × 0.8–2.4  $\mu$ , weakly gram-positive, motile by means of a single polar flagellum; definite zoogloea-formation was not observed; no growth took place in ordinary bacteriological media; nitrite was produced from ammonium salts but not from organic nitrogen compounds. The optimal temperature was 30–31° C, with minimum and maximum near 5° C and 40° C, respectively. The pH-limits seemed to lie near 5.5 and 9.0.

The organism showed greater tolerance towards many organic compounds than previously described strains of *Nitrosomonas*. Monovalent alcohols, with the exception of ethanol, were strongly toxic, but organic acids and sugars, with the exception of mannose, were tolerated in fairly high concentrations. The following figures show the highest molar concentrations at which nitrification took place:

Sodium formate . . . . .	0.37 mol	Ethanol . . . . .	0.22 mol
» acetate . . . . .	0.44 »	Glycerol . . . . .	0.56 »
» propionate . . . . .	0.37 »	Xylose . . . . .	0.053 »
» butyrate . . . . .	0.16 »	Glucose . . . . .	0.56 »
» lactate . . . . .	0.071 »	Levulose . . . . .	0.22 »
» succinate . . . . .	0.30 »	Mannose . . . . .	0.011 »
» citrate . . . . .	0.07 »	Sucrose . . . . .	0.58 »

Glucose sterilized by filtration showed hardly any inhibitory effect in concentration up to 5 per cent, but glucose sterilized by autoclaving suppressed nitrification in a concentration of 2.0–2.5 per cent; the inhibitory effect was not neutralized by treatment of the autoclaved glucose with active charcoal, was more pronounced after autoclaving at pH 7.5 than at pH 6.0, and was probably due to partial conversion of the glucose into the markedly toxic mannose.

Alanine, asparagine and particularly glycine were strongly inhibitory, but aspartic acid and glutamic acid were comparatively harmless, and urea was tolerated in concentrations as high as, or even higher than, those of glycerol, glucose and sucrose. Peptone suppressed nitrification in concentrations varying from 0.5 to 0.8 per cent. The following were the highest molar concentrations permitting nitrification:

	mol compound	mol NH <sub>2</sub>
Glycine . . . . .	0.0067	0.0067
Alanine . . . . .	0.034	0.034
Asparagine . . . . .	0.020	0.040
Aspartic acid . . . . .	0.11	0.11
Glutamic acid . . . . .	0.17	0.17
Urea . . . . .	0.67	1.33

The toxicity of the amino-compounds thus does not depend merely on the concentration of  $\text{NH}_2$ -groups, but on the constitution of the carbon skeleton to which these groups are attached.

Cystein showed two ranges of inhibition, a primary at very low (0.00053 mol) and a secondary at a considerably higher (0.003—0.006 mol) concentration; the phenomenon might conceivably be due to more rapid conversion into cystine with increasing concentration.

Neither free hydroxylamine nor the oxime of pyruvic acid underwent nitrification. The former was strongly toxic, and the latter inhibited the nitrification of ammonium sulphate to some extent. Hydroxylamine thus does not seem to be an intermediate product in the oxidation of ammonia by *Nitrosomonas*.

### Litteraturhenvísninger.

- Boltjes, T. Y. Kingma* (1934). — Onderzoekingen over nitrificerende bakterien. (Thesis, Delft).
- Bonazzi, A.* (1919). — On Nitrification. III. The Isolation and Description of the Nitrite Ferment. *Bot. Gaz.*, 68: 194—207.
- Boullanger, E., og Massol, L.* (1903). — Études sur les microbes nitrificateurs. *Ann. Inst. Pasteur*, 17: 492—515.
- Boullanger, E., og Massol, L.* (1904). — Études sur les microbes nitrificateurs. II. mémoire. *Ibidem*, 18: 181—196.
- Blom, J.* (1926). — Studier over Nitrat, Nitrit og Hydroxylamin. Beretn. om Nord. Jordbrugsf. Foren. Tredie Kongr. Oslo 1926: 465—471.
- de Bruyn, C. A. Lobry og van Ekenstein, W. A.* (1895). — Action des alkalis sur les sucres, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 14: 203—216.
- Bömeke, H.* (1939). — Beiträge zur Physiologie nitrifizierender Bakterien. *Arch. f. Mikrobiol.*, 10: 385—445.
- Cutler, D. W., og Mukerji, B. K.* (1931). — Nitrite Formation by Soil Bacteria other than *Nitrosomonas*. *Proc. Roy. Soc. London, B*, 108: 384—394.
- Corbet, A. S.* (1935). — The Formation of Hyponitrous Acid as an Intermediate Compound in the Biological or Photochemical Oxidation of Ammonia to Nitrous Acid. *Biochem. J.*, 29: 1086—1096.
- Engel, H., og Skallau, W.* (1938). — Die Reinkultur nitrifizierender Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, II, 97: 305—311.
- Gibbs, W. M.* (1919). — The Isolation and Study of Nitrifying Bacteria. *Soil Sci.*, 8: 427—481.
- Hanks, J. H., og Weintraub, F. L.*, (1936). — The Pure-culture Isolation of Ammonia-oxidizing Bacteria. *J. Bact.*, 32: 653—667.
- Hes, J. W.* (1937). — Zur Stoffwechselphysiologie von *Nitrosomonas*. *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, 34: 234—277.
- Heubült, J.* (1929). — Untersuchungen über Nitritbakterien. *Planta*, 9: 398—422.
- Kluyper, A. J., og Donker, H. J. L.* (1926). — Die Einheit in der Biochemie. *Chem. d. Zelle u. Gewebe*, 13: 134—190.
- Lees, H., og Quastel, J. H.* (1946). — Biochemistry of Nitrification in Soil. 3. Nitrification of Various Organic Nitrogen Compounds. *Biochem. J.*, 40: 824—828.

- Mukrinoff, J.* (1909). — Magnesia-Gipsplatten and Magnesia-Platten mit organischer Substanz als sehr geeignetes festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen. *Cent. f. Bakt.*, II, 24: 415—423.
- Meiklejohn, Jane* (1949). — Isolation of *Nitrosomonas* from Rothamsted Soil. *Nature*, 164: 667.
- Meyerhof, O.* (1917). — Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. III. Die Atmung des Nitritbildners. *Arch. f. d. Ges. Physiol.*, 166: 240—280.
- Nelson, D. H.* (1931). — Isolation and Characterization of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Cent. f. Bakt.*, II, 83: 280—311.
- Niklewski, B.* (1934). — Über die Verbreitung der Nitrifikationsbakterien in verschiedenen Stallmistsorten. *Ibidem*, II, 90: 193—212.
- Novak, Ruth, og Wilson, P. W.* (1948). The Utilization of Nitrogen in Hydroxylamine and Oximes by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bact.*, 55: 517—524.
- Quastel, J. H., og Scholefield, P. G.* (1949). — Influence of Organic Nitrogen Compounds on Nitrifications in Soil. *Nature*, 164: 1068—1072.
- Rubentschick, L.* (1929). — Zur Nitrifikation bei hohen Salzkonzentrationen. *Cent. f. Bakt.* II, 77: 1—18.
- Sijpesteijn, A. Kaars, og Fåhraeus, G.* (1949). — Adaptation of *Sporocytophaga myxococcoides* to Sugars. *J. Gen. Microbiol.*, 3: 224—235.
- Snell, F. D., og Snell, C. T.* (1945). — *Colorimetric Methods of Analysis.* (New York).
- Stanier, R. Y.* (1942). — The *Cytophaga* Group: A Contribution to the Biology of the Myxobacteria. *Bact. Rev.*, 6: 143—196.
- Stiles, H. R., Peterson, H. W., og Fred, E. B.* (1926). — A Rapid Method for the Determination of Sugars in Bacterial Cultures. *J. Bact.*, 12: 427—439.
- Winogradsky, S.* (1892). — Contribution à la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. Sci. Biol. (St. Pétersbourg)*, 1: 89—137.
- Winogradsky, S., og Omeliansky, V.* (1899). — Ueber den Einfluss der organischen Substanzen auf die Arbeit der nitrifizierenden Mikroben. *Cent. f. Bakt.*, II, 5: 329—343, 377—387, 429—440.