

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

UNTER MITWIRKUNG VON

CHR. BARTHEL - UPPSALA · W. BAVENDAMM - DRESDEN - THARANDT · F. BOAS -
MÜNCHEN · H. BORTELS - BERLIN · T. CASTELLI - PERUGIA · W. CUTLER - ROTHAMSTED
V. CZURDA - PRAG · D. FEHÉR - SOPRON · E. B. FRED - MADISON · F. FUHRMANN - GRAZ
C. GORINI - MAILAND · J. GROENEWEGE - KOETARADJA · A. GUILLIERMOND - PARIS
O. HAGEM - BERGEN · A. JANKE - WIEN · S. KRZEMIENIEWSKI - LEMBERG · PH. LASSEUR -
NANCY · E. MELIN - UPPSALA · A. PASCHER - PRAG · B. PEYRONEL - FLORENZ · O. RAHN -
ITHACA · GINO DE ROSSI - PERUGIA · K. SAITO - OSAKA · W. H. SCHOPFER - BERN
W. SCHWARTZ - KARLSRUHE · C. STAPP - BERLIN · H. TAMIYA - TOKIO · F. TOBLER
DRESDEN · S. WINOGRADSKY - PARIS

HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL

GÖTTINGEN

11. BAND. 2. HEFT

MIT 54 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 13. JUNI 1940)



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1940

Arch.
Mikrobiol.

Preis RM 15.60

Das

Archiv für Mikrobiologie

steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden sollen.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften; mit etwa 40 Bogen wird ein Band abgeschlossen.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle RM 30.— für eine Arbeit. Von der Schriftleitung angeforderte Referate werden mit RM 100.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 160 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum Bogennettopreise berechnet werden. Mit der Lieferung von Dissertationsexemplaren befaßt sich die Verlagsbuchhandlung nicht; sie stellt jedoch den Doktoranden den Satz zur Verfügung zwecks Dissertationsexemplare durch die Druckerei.

A)

den nachgenannten Herausgeber zu richten:

Albrechtstraße 6.

Verlagsbuchhandlung.

inis

2. Heft

	Seite
ere Torulaspora. Mit 3 Text-	119
ulopsis pulcherrima. Mit 3 Text-	126
ungen über Bakterienstrukturen. der Bakterienmembran und der	137
Molybdäns für stickstoffbindende	155
teriellen Sulfatreduktion. I. Mit	187
es sur la répartition de l'hétéro- ez les champignons. Mit 2 Text-	205
en, lang feucht bleibenden Trägern	215
ehrungsbegrenzende Faktoren bei abbildungen	219

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

(Dal Laboratorio di Microbiologia Agraria e Tecnica della Facoltà Agraria
della Regia Università di Perugia.)

Sulla validità del genere *Torulaspora*.

Per

Tommaso Castelli.

Con 3 figure nel testo.

(Eingegangen am 20. Februar 1940.)

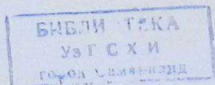
10997
In ricerche eseguite presso questo laboratorio sugli agenti della fermentazione vinaria nella regione umbra (1, 2) fu segnalato l'attivo intervento della *Torulaspora Rosei*. Su 379 culture ottenute nell'indagine di 87 mosti provenienti dalle diverse località umbre vennero isolati 21 stipiti di *Torulaspora Rosei* riscontrati in 11 mosti. I risultati ottenuti nelle ricerche eseguite nella regione umbra nel 1933, trovarono una valida conferma nelle indagini svolte nel 1936 nella regione del Chianti classico e zone limitrofe (3) e in quelle del 1937 sempre nella zona del Chianti classico (4). Nel 1936, su 93 mosti esaminati, la *Torulaspora Rosei* venne riscontrata presente in 18 mosti, mentre nelle indagini del 1937 detto blastomicete venne riscontrato in quattro, su 10 mosti presi in considerazione.

Sia per l'elevata percentuale di frequenza con la quale la *Torulaspora Rosei* si riscontra nei mosti naturalmente fermentanti, come per la non indifferente quantità di alcool che detta specie è capace di produrre si può ritenere che la presenza, nel processo fermentativo, della *Torulaspora Rosei*, non pregiudichi minimamente l'ottenimento di un vino coi normali caratteri organolettici (5). A questo riguardo credo necessario esporre le quantità di alcool che gli stipiti di minima e massima attività, isolati dalle varie località si sono dimostrati capaci di produrre.

Culture isolate nella regione umbra nel 1933; stipite di minima 7,34 % in peso (9,24 % in volume), stipite di massima 9,98 % in peso (12,58 % in volume). Culture isolate nel Chianti classico e zone limitrofe nel 1936; stipite di minima 7,86 % in peso (9,90 % in volume) stipite di massima 10,60 % in peso (13,35 % in volume).

Culture isolate nel Chianti classico nel 1937; stipite di minima 7 % in peso (8,82 % in volume), stipite di massima 10 % in peso (12,60 % in volume).

E senza dubbio particolarmente interessante, anche ai fini pratici, si presenta, l'indagine rivolta a stabilire quali sono, sia qualitativamente che quantitativamente, i prodotti, sia principali come secondari, della fermentazione operata nel mosto d'uva dalla *Torulaspora Rosei* e da altri blastomiceti che si rinvencono frequentemente nella microflora dei



mosti italiani. Alcune di queste indagini sono pertanto in corso di esecuzione in questo laboratorio.

La *Torulaspora Rosei* Guilliermond venne isolata da Rose da secrezioni mucose di alcune quercie e successivamente è stata riscontrata da altri ricercatori. In Italia ricordo una segnalazione di Verona e Luchetti (6) che hanno isolato la *Torulaspora Rosei* da un vino cotto della regione marchigiana ed una di Sacchetti (7) che ha trovato detto blastomicete su bacche di vischio. Il genere *Torulaspora* Lindner è attualmente riconosciuto, per quanto mi consta, dalla grande maggioranza dei ricercatori, esso è pertanto riferito nel sistema elaborato dalla Stelling-Dekker (8) ed è riportato anche in una abbastanza recente rassegna di Guilliermond (9). Il genere *Torulaspora* Lindner, che è molto prossimo e si può considerare intermedio tra il genere *Saccharomyces* Meyen e *Zygosaccharomyces* Barker, presenta cellule rotonde riunite anche a gruppi. Aschi formantisi per partenogenesi spesso in seguito a fatti pseudocopulativi. Ascospore rotonde a parete liscia generalmente in numero di 1—2 per asco e contenenti un globulo di grasso. Forme che vegetano sottoforma di deposito e che non danno velo o anello o li producono soltanto nelle vecchie culture. I blastomiceti che secondo la Stelling-Dekker si debbono riportare attualmente al genere *Torulaspora* sono i seguenti: *Torulaspora Delbrücki* Lindner (isolata da una birra inglese), *Torulaspora Rosei* Guilliermond (isolata da secrezioni mucose di quercie) e *Torulaspora fermentati* Saito (isolata da un mosto in fermentazione derivante dalla saccarificazione del sorgo).

Nel 1932 il Krumbholz (10) si è domandato se fosse legittimo conservare il genere *Torulaspora*. In base a confronti stabiliti tra la *Torulaspora Rosei* e lo *Zygosaccharomyces globiformis* (11) e avendo osservato che in ambedue le forme la produzione degli aschi derivava anche da fatti di copulazione, il Krumbholz ha stabilito l'identità delle due forme e ritiene non doversi più considerare valido il genere *Torulaspora*. In tal maniera *Torulaspora Rosei* cade in sinonimia con *Zygosaccharomyces globiformis* mentre per le altre due specie del genere *Torulaspora* vengono proposte le nuove combinazioni: *Zygosaccharomyces Delbrücki* (Lindner) Kr. e *Zygosaccharomyces fermentati* (Saito) Kr.

Sacchetti in base a prove di fermentazione su l'inulina e la destrina, eseguite parallelamente su *Torulaspora Rosei*-*Zygosaccharomyces globiformis* e su di una forma isolata da bacche di vischio, molto prossima a *Torulaspora Rosei*, pur riservandosi di trattare in altro luogo i risultati delle indagini citologiche sulle cellule vegetative e sugli aschi, è portato a ritenere perfettamente giustificata l'affermazione di Krumbholz.

Come è stato precedentemente accennato, in questo laboratorio sono state ottenute numerose culture di blastomiceti, isolate da mosti in fermentazione delle regioni Umbra e Toscana, da riportare a *Torulaspora Rosei*. Nei numerosissimi saggi di sporificazione di volta in volta eseguiti e nelle molteplici osservazioni fatte sulle cellule, sui prolungamenti che si producono precedentemente alla formazione degli aschi e sugli aschi medesimi, non ho potuto mai osservare che tra le cellule o i prolungamenti da esse emessi, vi fossero dei fatti di fusione onde l'asco formatosi fosse il risultato di una vera coniugazione e quindi detti blastomiceti fossero da riportare al genere *Zygosaccharomyces*.

È pur vero che, se in alcune specie del genere *Zygosaccharomyces* i fatti di coniugazione sono molto evidenti e gli aschi che derivano per partenogenesi sono scarissimi, ne esistono altre nelle quali il numero delle cellule che si trasforma in asco è molto esiguo e di questo numero soltanto una minima parte è il derivato di una tipica coniugazione. Un caratteristico esempio di quanto ho accennato si osserva nello *Zygosaccharomyces florentinus* da me riscontrato in un mosto dei colli fiorentini nelle indagini del 1936 (12), e che si può pertanto considerare una tipica forma di transizione tra i generi *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*. Trovandomi in possesso di un certo numero di stipiti di *Torulaspora Rosei* ho creduto opportuno eseguirne uno studio molto diligente ed accurato, e nello stesso tempo parallelamente alle mie culture e con le medesime modalità, ho sottoposto all'indagine anche una cultura di *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, avuta dal Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn.

Non credo necessario riportare la tecnica seguita nell'indagine, perchè essa si trova ampiamente descritta nelle mie note già citate e perchè corrisponde, sia pure con lievissime modificazioni, a quella adottata dalla *Stelling-Dekker*. Gli stipiti presi in considerazione, riportati con i loro numeri della collezione o del protocollo di esperienze, sono stati i seguenti 63, 64, 65, 66 isolati da vari mosti dell'Umbria nella vendemmia del 1933; 50, 75, 77, 175, 202, 223, 248, 250, 390, 426, 443, 463, 495, 499, 501, 509 isolati dai mosti del Chianti classico, colli senesi e colli fiorentini durante le vendemmie del 1936 e 1937, e lo *Zygosaccharomyces globiformis*. Tutte queste culture sono state mantenute in vita eseguendone circa ogni mese un passaggio, alternativamente su mosto d'uva e su agar di malto. Preferisco subito accennare che tutti gli stipiti sottoposti allo studio si sono dimostrati identici e le lievi diversità riscontrate non erano tali da permetterne una sufficiente differenziazione sia pure nell'ambito della varietà. I caratteri pertanto ottenuti per tutti gli stipiti si possono così riassumere.

La colonia su gelatina di mosto o su gelatina di malto dopo 5-6 giorni a 18° si presenta rotonda, gibbosa, liscia e a margini uniti, di colore bianco e di aspetto ceroso, non liquefacente.

Nelle giovani culture su mosto d'uva o su infuso di malto sviluppate a 25°, le cellule si presentano isolate o riunite a gruppetti di diversi elementi, globose o leggermente ovali. Negli aggruppamenti cellulari accanto a cellule normali si ne osservano spesso altre notevolmente più piccole. Le cellule sono generalmente gemmate, a volte plurigemmate. Le dimensioni del diametro variano da μ 2,8-3,5 fino a μ 5,5-6. Nell'invecchiamento si osservano cellule spesso molto più grandi e con globulo di grasso.

Nel mosto come nel malto si ha dapprima intorbidamento, indi fermentazione attiva e poi deposito; invecchiando la cultura si ha generalmente formazione di anello. Nelle culture per striscio in agar di malto, sia l'aspetto come la disposizione delle cellule non diversifica da quello notato per le

culture allestite sui substrati liquidi. Nelle vecchie culture di oltre venti giorni le cellule assumono forme e dimensioni notevolmente varie; accanto a cellule normali se ne notano altre di dimensioni molto maggiori, molte cellule presentano deformazioni svariatissime ma per lo più mostrano uno o più prolungamenti variamente lunghi e contorti di aspetto molto caratteristico (v. fig. 1). La patina in agar di malto si presenta umida, liscia in centro e scarsamente lobata ad i bordi, di colore bianco.

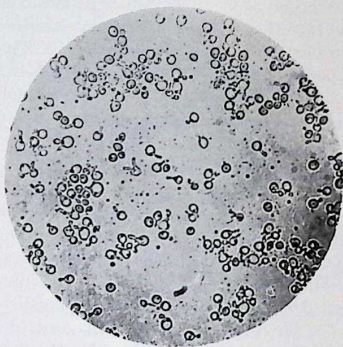


Fig. 1. *Torulaspora Rosei*.

Cellule che hanno emesso prolungamenti. (Ingrandimento circa 500.)

La colonia gigante in gelatina di mosto dopo due mesi a 18° si presenta rotonda con cratere centrale, occupante circa la metà della colonia, scarsamente profondo. Dal cratere, mediante variegature o grosse lobature si



Fig. 2. *Torulaspora Rosei*.

Colonie giganti su gelatina di mosto dopo 2 mesi a 18°. Da sinistra a destra e dall'alto in basso: stipite 64, 65, 66-Zygocach. globiformis forma tipica 223, 63, 509, 50, 501, 51, 202, 75, 442, 426. (3/4 Grand. naturale.)

va ad i bordi che si presentano lisci e lobati. Il colore è bianco, l'aspetto ceroso e la gelatina non mostra traccia di liquefazione o rammollimento (v. fig. 2). L'infissione su gelatina di mosto dopo 3 mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa screpolata e cresceita anche lungo il canale d'innesto. La gelatina non è fusa nè rammollita ma fortemente fessurata in seguito a sviluppo di gas.

La ricerca della sporificazione è stata eseguita su agar di malto, agar Gorodkova, sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa (13). La produzione di spore su agar di malto ed anche su agar Gorodkova è generalmente tardiva ed in ogni caso assai scarsa. Nella silice gelatinosa ma maggiormente sui blocchetti di gesso la sporificazione pur essendo relativamente scarsa, si manifesta, a 25°, asseconda degli stipiti, dopo

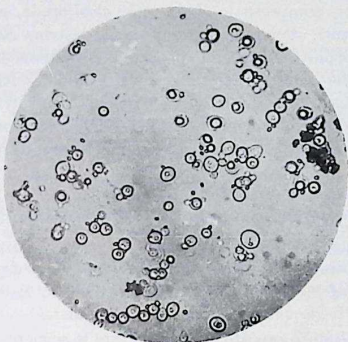


Fig. 3. *Torulasporea Rosei*.
Cultura sporificata (Ingrandimento circa 500).

3—5 giorni. Gli aschi sono sempre partenogenetici e contengono quasi sempre due, molto raramente tre spore, rotonde a parete liscia e con globulo oleoso centrale (v. fig. 3). Gli aschi si presentano quasi sempre ovali e le spore hanno un diametro di μ 2,6—2,8. Sia nella silice gelatinosa e nel gesso ma nell'agar di malto e particolarmente nell'agar Gorodkova la sporificazione è preceduta da emissione da parte delle cellule, di prolungamenti di numero vario e di dimensioni le più diverse. Detti prolungamenti a volte rimangono come tali, tal'altra due prolungamenti emessi da due cellule vicine sembrano toccarsi; in ogni modo non è stato mai osservato riassorbimento della membrana e quindi formazione di un vero canale di copulazione. Le osservazioni eseguite al riguardo sono state numerosissime, molto accurate e condotte con particolare pazienza. Mai, in nessuno stipite preso in esame, ho notato, nelle condizioni sperimentate, fatti da riportarsi ad una tipica coniugazione.

La fermentabilità degli zuccheri è stata eseguita, sia col sistema Durham come con le provette Einhorn, in brodo di carne col 2% dei rispettivi zuccheri. Tutti gli stipiti, senza eccezione, hanno dimostrato di fermentare glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio e raffiniosio per 1/3.

Nella nota citata *Sacchetti* riferisce di aver saggiato per *Torulaspora Rosei*, *Zygosacch. globiformis* ed altre specie la capacità a fermentare l'inulina e la destrina. Similmente a quanto ha osservato *Sacchetti*, anch'io ho trovato che tanto *Torulaspora Rosei* quanto *Zygosacch. globiformis* sono capaci di fermentare l'inulina ma non la destrina. Rispetto ai risultati ottenuti da *Sacchetti* sulla fermentazione dell'inulina, i miei stipiti hanno dimostrato una maggiore prontezza nella fermentazione; così produzione di gas col sistema Durham si è avuta dopo 2 giorni per molti stipiti, compreso lo *Zygosacch. globiformis*, e dopo 4 giorni per tutti gli stipiti. Per quanto riguarda la destrina *Sacchetti* riferisce che la fermentazione mentre non si osserva col sistema Durham si svela col metodo delle microfermentazioni di Lindner. Non ho creduto necessario verificare l'asserto di *Sacchetti* poichè i risultati che si ottengono col metodo delle microfermentazioni di Lindner sono fortemente maliscuri e pertanto detto sistema è oggi quasi universalmente non seguito.

L'assimilazione dei nitrati è risultata sempre negativa e lo sviluppo in presenza di alcool etilico è stato sempre molto scarso.

Il potere fermentativo, saggiato su mosto d'uva zuccherato sterilizzato alla pentola di Koch per 40 minuti, senza allontanarne le parti coagulate e precipitate, è risultata abbastanza notevole. Le quantità di alcool formate per gli stipiti di minima e massima attività sono state rispettivamente le seguenti: 7% in peso (8,82% in volume) e 10,60% in peso (13,35% in volume).

Da quanto è stato esposto si possono fare le seguenti considerazioni. La formazione degli aschi nella specie indicata come *Torulaspora Rosei* avviene sempre per partenogenesi e pertanto si ritiene che il genere *Torulaspora* debba essere conservato. Similmente a quanto hanno osservato *Krumbholz* e *Sacchetti* le forme indicate come *Torulaspora Rosei* e *Zygosaccharomyces globiformis* si debbono considerare come appartenenti alla medesima specie. I caratteri riferiti dalla *Stelling-Dekker* per *Torulaspora Rosei* si debbono considerare esatti; l'unica lieve differenza riscontrata riguarda la fluidificazione della gelatina, trovata positiva, sia pure tardivamente, dalla *Stelling-Dekker* mentre negli stipiti da me saggiati e così pure per quello riferito da *Verona* la fluidificazione della gelatina non è stata notata nemmeno nelle culture vecchie di tre mesi. Similmente a quanto ha riscontrato *Sacchetti* ed in contrasto con quanto riferisce *Verona* per la sua cultura, gli stipiti da me saggiati sono capaci di fermentare ed anche prontamente l'inulina.

Le mie ricerche portano pertanto alle seguenti conclusioni:

(1) Accurate e pazienti osservazioni sulla maniera di produzione degli aschi, eseguite su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed in uno stipite

di *Zygosaccharomyces globiformis*, hanno dimostrato che, nelle condizioni sperimentate, essa è sempre partenogenetica.

(2) Lo studio dei 20 stipiti in questione eseguito parallelamente a quello dello *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, ha dimostrato che tutte le culture saggiate si debbono considerare come appartenenti alle specie indicata da *Guilliermond* come *Torulaspora Rosei*.

(3) Si conferma il fatto della capacità a fermentare l'inulina da parte della *Torulaspora Rosei*, mentre in contrasto a quanto è stato da alcuni riscontrato e a conferma di quanto è stato da altri riferito, si nota che *Torulaspora Rosei* non possiede la capacità a fluidificare, sia pure tardivamente la gelatina.

Riassunto.

È stato eseguito uno studio su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed uno di *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, specialmente a riguardo della maniera di produzione delle spore. Nelle condizioni sperimentate si è notato che detta produzione è sempre partenogenetica e si conclude pertanto che il genere *Torulaspora* debba essere mantenuto.

Zusammenfassung.

Über die Gültigkeit der Gattung *Torulaspora*.

An 20 Stämmen von *Torulaspora Rosei* und 1 Stamm von *Zygosaccharomyces globiformis* forma typica wurde insbesondere die Sporenbildung untersucht. Da diese bei jenen immer parthenogenetisch erfolgt, muß die Gattung *Torulaspora* aufrecht erhalten werden.

Bibliografia.

- 1) *G. de' Rossi*, Rel. IV^o Cong. Intern. Vigna e Vino. Lausanne, Agosto 1935, p. 1. — 2) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. 14, 911, 1935. — 3) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 47, 1939. — 4) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 85, 1939. — 5) *F. Carpentieri*, Il Coltivatore e Gior. Vin. Ital. 85^o, 275, 1939. — 6) *O. Verona* e *G. Luchetti*, Boll. Ist. Sup. Agrario di Pisa 12, 236, 1936. — 7) *M. Sacchetti*, L'Industria Saccarifera Italiana 27, 49, 1934. — 8) *N. M. Stelling-Dekker*, Die Sporogenen Hefen-Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam, 1931. — 9) *A. Guilliermond*, Annales des Fermentations 2, 129, 257, 474 et 540, 1937. — 10) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. 4, 167, 1933. — 11) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. 2, 411, 1931. — 12) *T. Castelli*, diese Zeitschr. 9, 449, 1938. — 13) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. 14, 954, 1935.

(Dal Laboratorio di Microbiologia Agraria e Tecnica della Facoltà Agraria
della Regia Università di Perugia.)

Considerazioni sulla *Torulopsis pulcherrima*.

Per

Tommaso Castelli.

Con 3 figure nel testo.

(Eingegangen am 20. Februar 1940.)

Nelle indagini sui lieviti della fermentazione vinaria che si stanno eseguendo sistematicamente in questo laboratorio si è isolata, molte volte e spesso con un'elevata percentuale di frequenza, la *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo.

Non è compito della presente nota passare in rassegna tutti i lavori che trattano dell'argomento, ritengo però opportuno segnalare i più recenti ed importanti studi apparsi. La *Torulopsis pulcherrima* venne descritta da Lindner (1) che la isolò da vari materiali come susine ammostate, dal mosto d'uva e dagli escrementi di un parassita del melo. Anche Beijerinck (2) ha riscontrato la *Torulopsis pulcherrima* su vari materiali come mosto d'uva, nel miele, nel nettare dei fiori, nell'aria e negli insetti. La *Torula rubefaciens* descritta da Grosbüsch (3) e da questi isolata dalle bucce delle mele, si deve considerare del tutto identica a *Torulopsis pulcherrima*. Nel 1926 Pollacci e Nannizzi (4) hanno isolato da una lesione epidermica interdigitale un blastomicete che hanno descritto come *Cryptococcus interdigitalis*, però secondo Lodder (5) detta specie si deve considerare come una varietà della *Torulopsis pulcherrima* e stante le differenze sensibili che si notano nelle cellule è stata indicata come *Tor. pulcherrima* var. *variabilis*. Tra i blastomiceti che naturalmente fanno fermentare il succo di datteri Melliger (6) ha riscontrato anche la *Torulopsis pulcherrima*. Recentemente Porchet (7) nell'indagine dei lieviti che si riscontrano sulla pellicola di diverse frutta e bacche (ciliegie-fragole-prugne-pere-mele-uva) ha isolato diversi stipiti da riportarsi a *Torulopsis pulcherrima* dei quali ha eseguito un interessante ed accurato studio. Nelle ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nella regione umbra eseguite da Pulselli (8) durante le vendemmie del 1924-1925, della *Torulopsis pulcherrima* ne venne ottenute soltanto uno stipite. Nello studio eseguito nel 1933 da de' Rossi (9), al quale portai la mia attiva collaborazione, sempre sugli agenti della fermentazione vinaria nell'Umbria e nel quale vennero presi in considerazione 87 mosti provenienti da diverse località dell'Umbria, su 379 culture complessivamente isolate, 6, presenti in altrettanti mosti, risultarono appartenere a *Torulopsis pulcherrima*. In ricerche microbiologiche su alcuni vini ed uve delle Marche, Verona e Luchetti (10) hanno isolato 3 stipiti di *Torulopsis pulcherrima* presenti in

2 campioni su un complessivo di 28 esaminati. Un'ampia indagine sui lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe è stata da me eseguita nel 1936 (11); su 93 mosti esaminati e su 525 culture blastomicetiche complessivamente ottenute, la *Torulopsis pulcherrima* venne riscontrata in 16 campioni e cioè con una percentuale del 17,2%. In ricerche eseguite nel 1937 (12) ancora nella zona del Chianti classico e nelle quali furono presi in considerazione 10 campioni di mosto, già esaminati con le stesse modalità e finalità nel 1936, la *Torulopsis pulcherrima* venne riscontrata in 2 mosti. I reperti ottenuti da *de' Rossi* sui mosti dell'Umbria, di *Verona* e *Luchetti* sui vini ed uve della regione marchigiana, ma particolarmente i miei nei mosti del Chianti classico e zone limitrofe, dimostrano in modo inequivocabile che nel naturale processo fermentativo del mosto d'uva interviene con una frequenza non del tutto trascurabile la *Torulopsis pulcherrima*. Già per gli stipiti isolati nei mosti umbri nelle ricerche eseguite nel 1933 quanto per quelli isolati nella Toscana nelle ricerche fatte nel 1936—1937, ho notato delle differenze abbastanza sensibili specialmente a riguardo di alcuni caratteri. Così mentre lievi diversità sono state notate nell'aspetto dello striscio su agar di malto, queste erano abbastanza sensibili nelle infissioni in gelatina di mosto sia per quanto riguardava l'intensità della fluidificazione della gelatina medesima come del colore che prendeva il liquido, ma differenze anche più sensibili si sono ottenute nella determinazione del potere fermentativo. Già fin dal 1938, allorchè resi noto le ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe, a proposito della *Torulopsis pulcherrima* scrivevo che "lo studio degli stipiti isolati ha dimostrato che tra essi esistono differenze di una certa entità; si rende necessario pertanto sottoporli ad un più accurato e completo studio comparativo". Le ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti erano già terminate quando presi visione del ricordato lavoro di *Porchet*. Come già è stato accennato *Porchet* ha indagato su 10 stipiti isolati da diverse frutta ed eseguito ricerche sui caratteri morfologici, su alcuni caratteri culturali, sul potere fermentativo, liquefazione della gelatina, sulla produzione e sulla natura del pigmento ed altri caratteri fisiologici. I risultati delle ricerche della *Porchet* si possono così riassumere: 6 degli stipiti corrispondono esattamente alla diagnosi riportata dalla *Lodder* però contrariamente a quanto questa afferma la produzione di pigmento in *Torulopsis pulcherrima* non dipende dalla presenza di ferro nel substrato di cultura; gli altri 4 stipiti non si possono identificare con la *Torulopsis pulcherrima*, si debbono anzi riportare alle *Mycotoruleae* perchè si ha sviluppo di pseudomicelio e formazione di conidi all'estremità dei prolungamenti cellulari. In questi ultimi stipiti si noterebbero dei fatti di dissociazione e precisamente ogni stipite, proveniente da una cultura unicellulare, verrebbe dissociato nel seguenti due tipi: a) colonie rosse liquefacenti la gelatina, cellule allungate riunite a costituire un pseudomicelio e potere fermentativo più elevato che in b, b) colonie bianche non liquefacenti la gelatina, cellule tonde con grosso globulo di grasso, non si ha formazione di pseudomicelio.

Avendo a mia disposizione molte culture che ad uno studio abbastanza accurato dovevano riportarsi a *Torulopsis pulcherrima* ho creduto interessante sottoporli ad un indagine maggiormente completa e nello stesso tempo ho condotto alcune prove allo scopo di vedere se mi riusciva di ottenere fatti di dissociazione.

Credo opportuno elencare gli stipiti in questione riportandoli col loro numero di collezione e con le indicazioni relative alla data e alla località ove vennero prelevati i mosti dai quali essi furono isolati.

- 111 (1933) Orvieto (Umbria)
- 113 (1933) Orvieto (Umbria)
- 88 (1936) Passignano (Chianti classico-Toscana)
- 89 (1936) Passignano (Chianti classico-Toscana)
- 122 (1936) Mugnana (Chianti classico-Toscana)
- 148 (1936) Strada (Chianti classico-Toscana)
- 166 (1936) Colognole (Colli fiorentini-Toscana)
- 181 (1936) Colognole (Colli fiorentini-Toscana)
- 193 (1936) Colle d'Elsa (Colli senesi-Toscana)
- 213 (1936) Poggibonsi (Colli senesi-Toscana)
- 315 (1936) Castellina (Chianti classico-Toscana)
- 316 (1936) Castellina (Chianti classico-Toscana)
- 380 (1936) Meleto (Chianti classico-Toscana)
- 419 (1936) Colli di Brolio (Chianti classico-Toscana)
- 422 (1936) Colli di Brolio (Chianti classico-Toscana)
- 434 (1936) Villa a Sesta (Chianti classico-Toscana)
- 431 (1936) Villa a Sesta (Chianti classico-Toscana)
- 469 (1936) Montepulciano (Colli senesi-Toscana)
- 480 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
- 481b (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
- 487 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
- 489 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
- 60 (1937) Gaiole (Chianti classico-Toscana)

Lo studio dei riferiti stipiti è stato eseguito in serie e condotto nella maniera seguente:

L'aspetto delle colonie è stato dedotto da culture allestite in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 18°.

I caratteri morfologici (aspetto, dimensioni, aggruppamenti cellulari) sono stati dedotti da culture in mosto d'uva, in decotto di malto e in agar di malto rispettivamente di 24 ore e 3 giorni alla temperatura di 15°.

L'aspetto e la consistenza degli strisci sono stati dedotti da culture allestite in agar di malto, agar Sabouraud glucosato e agar Gorodkova.

La capacità di sporificazione è stata ricercata su agar Gorodkova, sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa (13).

La liquefazione della gelatina è stata ricercata su infissioni allestite in gelatina di mosto e su colonie giganti ottenute sul medesimo terreno di cultura. Il periodo d'incubazione è stato di 3 mesi e la temperatura 18°.

Circa il potere di coagulazione del latte sono state fatte culture in latte e mantenute alla temperatura di 25° per 20 giorni.

La capacità a fermentare gli zuccheri è stata ricercata ponendo nei tubi Einhorn e Durham del brodo comune di carne con l'aggiunta del 2% di uno dei seguenti zuccheri: glucosio-levulosio-mannosio-galattosio-saccarosio-maltosio-lattosio e raffinosisio, periodo di osservazione 10 giorni a temperatura di 25°.

Circa l'assimilazione delle sostanze azotate è stato seguito il metodo auxonografico di *Beijerinck* secondo le indicazioni riportate dalla *Lodder*.

Per lo sviluppo in presenza di alcool etilico sono state seguite le indicazioni della *Stelling-Dekker* (14).

Circa la produzione del pigmento sono stati allestiti terreni di cultura adatti allo sviluppo del blastomicete sia privi di ferro come con aggiunte di piccole quantità di detto elemento. Viene ritenuto generalmente che la produzione di pigmento in *Torulopsis pulcherrima*, come in altri microrganismi, sia legata alla presenza nel materiale di cultura di tracce di ferro; la *Porchet* invece avrebbe osservato che la produzione di pigmento nella *Torulopsis pulcherrima* non è minimamente influenzata dal ferro. Non è compito della presente nota l'indagine sulla natura del pigmento sia nei blastomiceti come nei batteri come la ricerca delle condizioni nelle quali la colorazione si produce (substrato di cultura-temperatura ecc) perchè a questo riguardo esistono numerosissimi ed interessanti lavori di *Lasseur* (15) e della sua scuola (16) come anche quello recente di *Kharasch*, *Conway* e *Bloom* (17). Per le ricerche in proposito mi sono limitato ad osservare l'influenza del ferro ed allo scopo ho preferito fare delle osservazioni su colonie giganti sviluppate nei seguenti agar e mantenute per due mesi alla temperatura di 18°; agar al mosto d'uva (preparato al momento dell'uso mescolando parti uguali di mosto d'uva sterile con agar acqua al 3 % di agar) con e senza il 0,1°/00 di solfato ferroso — agar di malto con e senza ferro — agar al seguente liquido (acqua 1000-zucchero del commercio 100-solfato ammonico 1-peptone Witte 1-cloruro di sodio 0,5-fosfato bipotassico 1-solfato di manganese 0,1) con e senza traccia di ferro.

Per quanto i risultati verranno riferiti successivamente posso già accennare che i saggi da me eseguiti mi portano alla conclusione che la presenza del ferro giuoca un ruolo predominante nella produzione del pigmento; così ad esempio, tolta una sola eccezione, tutti gli stipiti non hanno presentato pigmento nell'agar malto e nell'agar sintetico senza ferro mentre lo presentavano, più o meno intenso, negli stessi agar contenenti però tracce di solfato ferroso.

L'attività come il potere fermentativo sono stati determinati su 50 cm di mosto d'uva sterilizzato a 100° senza allontanarne le parti coagulate e precipitate. I 50 cm di mosto posti in un matraccino da 100 cm venivano seminati con alcune gocce di una cultura recente ed indi si sostituiva al tappo di cotone una comune valvola di Muller ad acido solforico e si pesava all'esattezza del centigrammo. Le pesate furono poi eseguite dopo 5 giorni ma successivamente di 3 giorni in 3 giorni fino a quando due valori risultarono identici e quindi il fatto fermentativo poteva considerarsi ultimato. La temperatura d'incubazione fu di 18° e la durata dell'esperimento di 30 giorni.

Come è già stato accennato *Porchet* avrebbe notato fenomeni di dissociazione in *Torulopsis pulcherrima* ed i caratteri che riferisce per

il tipo (b) corrispondono a quelli che si riportano per *Torulopsis pulcherrima* mentre quelli riferiti per il tipo (a) corrispondono a quelli che io ho ottenuto per due stipiti che ritengo siano di una forma da considerarsi come una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima*. Pur non negando che fatti di variazione in *Torulopsis pulcherrima* si possano verificare pur non di meno le prove da me eseguite, con le modalità che ora accenno, mi portano a fatti completamente negativi. Sia per gli stipiti da riportarsi alla tipica *Torulopsis pulcherrima* come per gli altri che considero come una nuova varietà, sono stati eseguiti ripetuti isolamenti sia adoperando quale substrato la gelatina di mosto (culture d'isolamento per disseminazione) come l'agar di malto (culture d'isolamento per spandimento). In tutte le numerose culture ottenute in tal maniera non ho potuto mai notare differenze sensibili con i caratteri che gli stipiti presentavano inizialmente. Dette ricerche sono state eseguite particolarmente su 3 stipiti e precisamente 111, 181 e 431. Così mentre lo stipite 431 è caratterizzato dalla mancanza assoluta di produzione di pigmento e di una lentissima capacità a liquefare la gelatina e di scarso potere fermentativo, lo stipite 181, che considero assieme al 434 come appartenente alla nuova varietà, è caratterizzato dal presentare un'intensa produzione di pigmento, una rapida liquefazione della gelatina ed un potere fermentativo maggiormente elevato; infine lo stipite 111 ha caratteristiche intermedie rispetto a 431 e 181.

In base ai risultati ottenuti nel presente studio gli stipiti passati in rassegna si possono riportare a due distinti gruppi e precisamente uno che presenta caratteri del tutto identici alla diagnosi stabilita da Lindner e in periodo del tutto recente da Lodder per *Torulopsis pulcherrima*, che comprende la grande maggioranza delle culture studiate*, e un altro al quale si debbono riportare i due stipiti 181 e 434 che vengono considerati come appartenenti ad una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima* e per la quale viene indicato il nome di „*rubra*“. Quanto per gli stipiti da identificarsi con la tipica *Torulopsis pulcherrima* come per quelli appartenenti alla varietà *rubra* si riporta lo studio eseguito iniziando col riferire i caratteri degli stipiti da ritenersi appartenenti alla tipica *Torula*.

Nelle giovani culture in mosto d'uva e nel decotto di malto si hanno, cellule di forma globosa-ovalare di μ 4–5 $\times$ 5–6, oppure leggermente allungate di μ 2,8–3,5 $\times$ 6–7. Si notano specialmente nell'invecchiamento della cultura cellule molto più grandi per lo più globose contenenti

* Lo stipite 431 per il quale nelle condizioni sperimentate si è notato mancanza della capacità a produrre pigmento e liquefazione molto lenta della gelatina, non può per le dette piccole diversità, differenziarsi dalla *Torulopsis pulcherrima*.

un grosso corpo centrale che spesso occupa quasi completamente la cellula. Le cellule sono isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, raramente le cellule sono riunite a costituire un inizio di pseudomicelio, un vero micelio non è stato mai notato. Le culture in mosto ed in malto presentano prima intorbidamento, poi fermentazione e deposito al fondo, invecchiando la cultura si nota un anello bianco sporco, mucoso, con traccia di velo che all'agitazione risale sulle pareti della provetta.

Nell'agar di malto e nell'agar Sabouraud glucosato dopo 3 giorni a 25° si notano cellule ovali allungate di μ 2,5—3 $\times$ 4,5—5,5 o cellule globose di μ 7—9 nel diametro con grosso corpo oleoso occupante quasi tutta la cellula (v. fot. 1).

Nel suddetti agar si hanno patine espanse mucose di colore bianco grigio.

La colonia su gelatina di mosto dopo 3 giorni a 18° si presenta rotonda espansa di colore grigio a volte tendente al roseo, al quarto-quinto giorno si ha l'inizio della liquefazione.

La colonia gigante su gelatina di mosto si presenta dopo 5 giorni a 18° come un incavo più o meno profondo ripieno di gelatina liquefatta, di colore bianco grigio con riflessi rosei. Nei singoli stipiti si è notata una lieve diversità nella rapidità di liquefazione.

La colonia gigante su agar mosto-agar malto e agar sintetico con o senza aggiunta di piccole quantità di ferro si presenta generalmente molto poco dimostrativa, è rotonda con lievissimo cratere e incavo centrale, la superficie è liscia in centro e così pure ai bordi che si presentano interi o grossolanamente lobati. Circa il colore, mentre lo stipite 431 non ha dato in alcuno dei terreni di cultura produzione di pigmento, tutti gli altri stipiti non hanno prodotto pigmento su agar malto e agar sintetico senza ferro, però sui detti terreni ma contenenti tracce di ferro e su agar mosto, sia con, come senza ferro si è avuta una colorazione rosea più o meno intensa. Il colore non invade mai completamente la colonia, si presenta generalmente in centro ma a volte si nota anche nella parte periferica ed in tal caso è disposto a settori o in maniera varia dando luogo ad aspetti fortemente caratteristici (v. fot. 2a—e).

L'infissione in gelatina di mosto a 18° si presenta dapprima come un chiodo di colore dal roseo al rosso granato; la fluidificazione che si

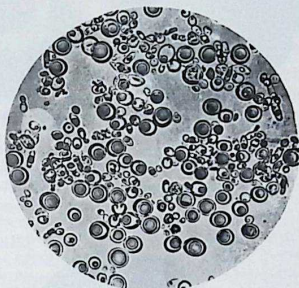


Fig. 1. *Torulopsis pulcherrima*.
(Ingrand. ca. 500.)

inizia generalmente dopo il quarto giorno è prima ad imbuto, varie volte anche a coppa, poi a cilindro. La liquefazione tende col tempo ad aumentare e dopo un mese mentre alcuni stipiti hanno liquefatto soltanto la metà del substrato altri hanno dato luogo a fluidificazione completa.

Il saggio di sporificazione eseguito diverse volte in tutti gli stipiti sull'agar di malto, sull'agar Gorodkowa, sull'agar Sabouraud glucosato,

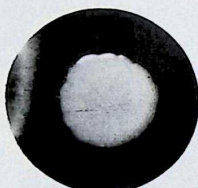


Fig. 2a.

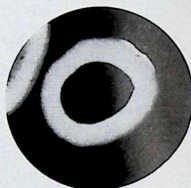


Fig. 2b.

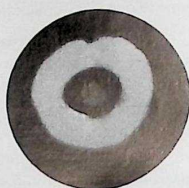


Fig. 2c.

Fig. 2a. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite 431.
Col gigante su agar malto con ferro ($\frac{3}{4}$ Grand. naturale).

Fig. 2b. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite 193.
Col gigante su agar malto con ferro ($\frac{3}{4}$ Grand. naturale).

Fig. 2c. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite 213.
Col gigante su agar malto con ferro ($\frac{3}{4}$ Grand. naturale).



Fig. 2d.

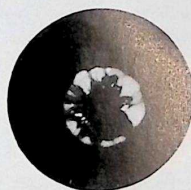


Fig. 2e.

Fig. 2d. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite 111.
Col gigante su agar malto con ferro ($\frac{3}{4}$ Grand. naturale).

Fig. 2e. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite 419.
Col gigante su agar malto con ferro ($\frac{3}{4}$ Grand. naturale).

sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa, ha dato sempre risultato nettamente negativo*.

* L'unica segnalazione, per quanto mi consta, di presenza di spore in *Torulopsis pulcherrima* è quella di *S. Windisch* (diese Zeitschr. 9, 551—554, 1938). Il lavoro di *Windisch* si riferisce ad un solo stipite isolato dalle ciliegie e che avrebbe la caratteristica di formare micelio e per il quale in una cultura non pura si sarebbe osservato produzione di spore in seguito a fatti di coniugazione eterogamica e dette spore erano capaci di germinare. Il risultato del lavoro di *Windisch* per il quale come riferisce *Guilliermond* (Boll. Inst. Pasteur 37, 1188, No. 22) l'A. non presenta alcuna fotografia che possa giustificare il suo veramente strano asserto, deve accettarsi, a mio parere, con molta scarsa fiducia di verità.

Le prove di fermentazione hanno dato risultato nettamente positivo e per tutti gli stipiti per i seguenti zuccheri: glucosio, levulosio, mannosio.

Le culture in latte non modificano minimamente il substrato.

L'assimilazione delle sostanze azotate ha fornito sempre il seguente risultato: buona assimilazione dell'asparagina, discreta per il solfato ammonico e il peptone, nulla per il nitrato di potassio e l'urea.

La crescita in presenza di alcol etilico è stata buona per tutti gli stipiti; dapprima si è notato intorbidamento indi deposito e poi traccia di velo sottile che si rende bene evidente all'agitazione per risalienza sulle pareti del matraccio.

Il potere fermentativo ha dato i seguenti risultati: stipite, 431, di minima produzione 1,84 % di alcol in peso (2,31 % in volume), stipite, 111, di massima produzione 3,26 % di alcol in peso (4,10 in volume).

La descrizione fatta permette, conformemente a quanto è stato detto, di riportare detti stipiti alla specie *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo. In confronto alla descrizione riportata dalla Lodder i miei stipiti presentano una maggiore rapidità nella liquefazione della gelatina ed una mancanza di assimilazione, tra le sostanze azotate, dell'urea.

La forma che indico come *Torulopsis pulcherrima* var. *rubra* e alla quale si debbono riportare gli stipiti 181 e 434, presenta i seguenti caratteri.

Nella disseminazione in gelatina di mosto dopo 48 ore a 18° si osservano colonie tonde, gibbose, lisce, umide a margini uniti di colore rosso; molte colonie si presentano già circondate di un alone di liquefazione. Osservate a piccolo ingrandimento l'aspetto è simile a quello descritto. Dopo 5 giorni nella prima e seconda piastra, molto ricche di colonie, la gelatina si presenta completamente fusa ed il liquido presenta un colore rosso intenso con riflessi violacei. Nella terza piastra, ove le colonie sono sufficientemente distanziate, si osservano colonie di colore rosso intenso, fondenti.

In mosto d'uva e nell'infuso di malto dopo 24 ore a 25° si osservano cellule globose ma per lo più allungate di μ 3-4,5 $\times$ 6-8, isolate o a gruppetti non formanti mai micelio. Si notano, ma molto raramente, cellule rotonde con globulo centrale non molto grande. Nell'invecchiamento non si riscontrano sensibili differenze. Dopo 3 giorni sia nel mosto come nel malto si osserva intorbidamento, il liquido tende a presentare dei riflessi rosei mentre in superficie si produce un anello mucoso e un velo sottile di colore roseo.

Nell'agar di malto e nell'agar Sabouraud glucosato dopo 3 giorni a 25° si hanno cellule generalmente di forma allungata delle dimensioni medie di μ 2,5-3 $\times$ 6-6,5. Si osservano cellule più grandi e globose, fino a 10 μ nel diametro, con globulo di grasso non molto grande. Nell'invecchiamento si osservano cellule ovali ellittiche, se ne notano però anche alcune molto grandi le quali contengono spesso due globuli di grasso piccoli, quando si osserva un solo globulo questo è più grande ma non tale da occupare quasi completamente la cellula come si verifica per la tipica *Torulopsis pulcherrima*. La colonia gigante in gelatina di mosto dopo 2 giorni a 18° si presenta come un incavo ripieno, per avvenuta liquefazione della gelatina, di un liquido torbido di colore rosso granato.

Le colonie giganti su agar mosto-agar malto e agar sintetico, sia con come senza ferro si presentano rotonde più o meno espanse, a volte con

piccolo ma poco incavato cratere centrale, la superficie è generalmente liscia e i bordi uniti e grossolanamente lobati. Il colore, meno che in agar malto e in agar sintetico ambedue senza tracce di ferro dove si presenta bianco, è rosso granato più o meno intenso, e a differenza di quanto si è detto per le colonie giganti della tipica *Torulopsis pulcherrima* esso invade tutta la colonia pur notandosi, a volte, una maggiore intensità della colorazione verso la parte centrale.

L'infissione in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 28° mostra già evidente fluidificazione ad imbuto ripiena di un liquido mucoso di colore rosso granato.

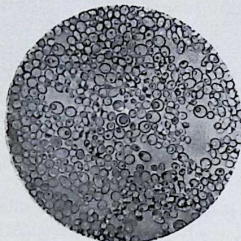


Fig. 3. *Torulopsis pulcherrima* var. *rubra*.
(Ingrand. ca. 450.)

Successivamente la fluidificazione diviene a cilindro e dopo 15 giorni già la metà della gelatina è fluidificata. Dopo 30 giorni la liquefazione è completa, si nota un liquido di colore rosso giallognolo, deposito rosso al fondo ed in superficie anello di colore rosso ed isolotti di velo mucoso roseo.

La ricerca della sporificazione ha dato risultato completamente negativo.

La fermentazione degli zuccheri ha dato costantemente risultato positivo per il glucosio, il levulosio e il mannosio.

La cultura in latte non ha mai mostrato sensibile modificazione del substrato. Il saggio di assimilazione delle sostanze azotate ha dimostrato che il germe uti-

lizza molto bene il solfato ammonico e l'asparagina, meno intensamente il peptone, affatto l'urea e il nitrato di potassio.

La cultura in presenza di alcol etilico mostra intorbidamento del liquido che diventa leggermente rossiccio, in fondo al matraccino si ha deposito mentre in superficie si ha una traccia di velo risaliente.

Il potere fermentativo è discreto, la produzione di alcol in peso è del 3,4 % (4,28 % in volume).

In confronto a gli stipiti precedentemente ricordati la cultura ora descritta presenta alcuni caratteri che la diversificano alquanto. Così le cellule mostrano per lo più forma allungata, presentano spesso due piccoli globuli di grasso e quanto ne hanno uno solo questo non invade quasi completamente la cellula. La liquefazione della gelatina è molto più rapida in confronto a quella prodotta dalla tipica *Torulopsis pulcherrima* e così pure il pigmento si presenta molto più intenso e diffuso e anche il potere fermentativo si dimostra maggiormente elevato. Rispetto all'assimilazione delle sostanze azotate non si notano differenze con gli altri stipiti, anche questa cultura non assimila l'urea. Anche per la detta cultura, alla stregua di quanto si è visto per gli stipiti da riportarsi alla tipica *Torulopsis pulcherrima*, sembra che la produzione di pigmento sia legata alla presenza, nel substrato di cultura, di tracce di ferro. Come è stato già accennato i tentativi di ottenere forme dissociate in questa cultura hanno dato risultati negativi in quanto chè non sono state osservate mai forme sostanzialmente differenziabili dallo stipite

iniziale. Le osservazioni fatte mi permettono di differenziare nettamente gli stipiti 181 e 434 da tutte le altre culture per una diversa forma delle cellule, per una maggiore rapidità di liquefazione della gelatina, per una maggiore intensità nella produzione del pigmento e per un più elevato potere fermentativo; detti stipiti vengono pertanto riportati ad una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima* per la quale si propone il nome di „*rubra*” e per la quale viene stabilita la seguente diagnosi:

Torulopsis pulcherrima var. *rubra* n. var.

cellule che nelle giovani culture in mosto d'uva e nell'infuso di malto si presentano ovali allungate, isolate o riunite a due o a gruppetti ma non formanti mai micelio, delle dimensioni di μ 3—4,5 $\times$ 6—8. In alcune cellule, specie nell'invecchiamento e particolarmente nei substrati di cultura agarizzati si osservano cellule rotonde con 1—2 globuli di grasso che non occupano mai completamente la cellula. Nel mosto d'uva si ha intorbidamento e il liquido tende a divenire leggermente roseo, sia nel mosto come nel malto si ha fermentazione attiva, anello mucoso e velo sottile di colore tenuamente roseo. Fermentazione del glucosio, levulosio e mannosio. Tra le sostanze azotate assimila molto bene il solfato ammonico e l'asparagina meno il peptone e affatto l'urea e il nitrato di potassio. Fluidifica molto rapidamente la gelatina. Sviluppa molto bene in presenza di alcol etilico. Nel substrati contenenti tracce di ferro si ha produzione di pigmento di colore rosso variamente intenso. Le colonie giganti sono poco dimostrative, presentano spesso un cratere centrale poco profondo e bordi grossolanamente lobati. Lo striscio in agar malto presenta patina mucosa, liscia, di colore grigio giallastro. Il potere fermentativo è discreto, la produzione di alcol riscontrata è stata del 3,4 % in peso (4,28 % in volume).

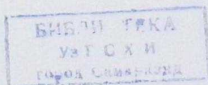
Riassunto.

E stata condotta un'indagine su 23 culture isolate dai mosti dell'Umbria e della Toscana, che dovevano considerarsi da riportare alla *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo. Dei 23 stipiti, mentre 21 si possono identificare con la specie sopranominata, gli altri due debbono ritenere appartenenti ad una nuova varietà che viene indicata come *Torulopsis pulcherrima* var. *rubra*.

Zusammenfassung.

Betrachtungen über *Torulopsis pulcherrima*.

Aus Mosten von Umbrien und Toscana wurden 23 zu *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo gehörige Stämme isoliert, von denen



21 als die typische Art zu identifizieren waren (Rötung der Kultur nur bei Gegenwart von Eisen), während 2 Stämme, als *var. rubra n. var.* bezeichnet, sich außer durch andere Eigenschaften auch durch intensivere Farbstoffbildung unterscheiden.

Bibliografia.

- 1) *P. Lindner*, Wochenschr. f. Brauerei 4, 853, 1887. — 2) *M. W. Beijerinck*, Verz. Geschriften 5, 259, 1921. — 3) *J. Grosbüsch*, Centralbl. f. Bakt. II, 42, 625, 1925. — 4) *G. Pollacci* e *A. Nannizzi*, I miceti patogeni dell'uomo e degli animali 5, No. 44, 1926 [v. 5], p. 144]. — 5) *J. Lodder*, Die Anaskosporogenen Hefen. N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1934. — 6) *R. Melliger*, Contribution à l'étude des ferments figurés et des fermentation de la datte. Thèse Université de Genève, 1931. — 7) *B. Porchet*, Annales dei fermentations 4, 385, 1938. — 8) *M. Pulselli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura VII, 530, 1927. — 9) *G. de' Rossi*, Rel. IV^o Cong. Int. della Vigna e del Vino. Lausanne 1935, p. 1. — 10) *O. Verona* e *M. Luchetti*, Boll. R. Ist. Sup. Agrario di Pisa 12, 256, 1936. — 11) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 47, 1939. — 12) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 85, 1939. — 13) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese 14, 954, 1935. — 14) *N. M. Stelling-Dekker*, Die sporogenen Hefen. Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam 1931. — 15) *Ph. Lasseur*, C. R. Soc. Biol. 74, 496, 1913. — 16) *P. Godfrin*, Contribution à l'étude des Bactéries bleues et violettes. Université de Nancy, 1934. — 17) *M. S. Kharasch*, *E. A. Conway* e *W. Bloom*, J. of Bact. 32, 533, 1936.

(Aus der Ersten Medizin. Universitätsklinik der Charité und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.-G., Berlin.)

Untersuchungen über Bakterienstrukturen, unter besonderer Berücksichtigung der Bakterien- membran und der Kapsel.

Von

E. Fröhbrodt und H. Ruska.

Mit 32 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. März 1940.)

I. Aufgabenstellung und Schrifttum.

In früheren Mitteilungen wurde gezeigt, daß es mittels der Übermikroskopie gelingt, sublichtmikroskopische Strukturen an Bakterien abzubilden. Insbesondere wurde die Frage der Nucleoide (*Piekarski*) untersucht und festgestellt, daß in der Massenverteilung der Zelle Gebilde zu finden sind, die in Übereinstimmung mit spezifischen lichtoptischen Untersuchungsergebnissen als Kernäquivalente anzusprechen sind [*G. Piekarski* und *H. Ruska* (33)]. Die Nachweisbarkeit der Nucleoide hat die weitere Erfahrung an den mit *Piekarski* bearbeiteten und anderen Bakterienstämmen immer wieder bestätigt, und es haben sich Kulturbedingungen finden lassen, unter denen sie besonders leicht zur Darstellung kommen. Andererseits aber sind sie — zum mindesten elektronenoptisch — nicht in jedem Zellzustand als besondere Zentren sichtbar, so daß man annehmen muß, daß mitunter erst eine Entmischung zu den wohlgeformten Körpern der Nucleoide führt [vgl. auch *K. Pietschmann* und *A. Rippel* (34)]. Bilder, die wahrscheinlich Stadien solcher Entmischungen darstellen, sind neuerdings von *Tuberkelbazillen* gezeigt worden [*A. Lembke*, *H. Ruska* und *J. Christophersen* (24)] und haben die Erfahrungen über den Bakterienbau wesentlich erweitert.

Mit dem Nachweis der Nucleoide war ein Schritt zu einer zytologischen Differenzierung der Bakterienzelle getan, der über die von *Zettnow* gegebene Unterscheidung von Entoplasma und Ektoplasma hinausging und sich bezüglich der Lokalisation der Träger des Vererbungsvorganges mehr einer Gliederung in Kern und Protoplasma nähert, wie sie andere pflanzliche Zellen aufweisen. Ein Entoplasma im Sinne von *Zettnow*, als Mischung von Kernsubstanz und Protoplasma, liegt in jenen Zellen vor, welchen eine morphologische Scheidung der thymonucleinsäurehaltigen Kernsubstanzen fehlt.

Von Differenzierungen des Ektoplasmas wurden vor den Ergebnissen über die Nucleoide bereits die Geißeln dargestellt (32). Die vor-

liegende Mitteilung soll über Versuche mit Kapselbakterien berichten und sich mit den Beziehungen der Kapsel zum Ektoplasma und zur Bakterienmembran, sowie mit ihrer Struktur befassen. In der umfangreichen Literatur auf Grund lichtoptischer Untersuchungen findet man folgende Anschauungen über diesen Gegenstand.

Nach den auch heute noch nicht als widerlegt geltenden [*T. Wohlfeil* (43)] Ausführungen von *Zettnow* (45) unterscheiden wir am Bakterium eine färberisch darstellbare Kernsubstanz (Chromatin) in Mischung mit Protoplasma, das Entoplasma, und eine nur durch besondere Präparationsmethoden sichtbar werdende äußere Hülle aus einem modifizierten, dichteren Protoplasma, das Ektoplasma. Dieses Ektoplasma ist entweder als Hülle (nicht Kapsel) oder auch in Form von Geißeln ausgebildet. Bei einzelnen *Proteus*-Arten schätzt *Zettnow* die Masse des Ektoplasmas mindestens auf die Hälfte des ganzen Zelleibes. Es soll eine wasserärmere und damit konzentriertere Substanz sein, die auch eine größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Färbungen, Plasmolyse usw. besitzt. Das Zurückweichen des Innenkörpers von dem Ektoplasma bei der Plasmolyse sei durch eine genügend feste innere Begrenzungsschicht des Ektoplasmas auf Grund seiner chemischen Differenzierung ermöglicht. *Schaudinn* (40) hat beim riesigen *Bac. Bütschlii* diese Grenzschicht als besondere, doppelt konturierte Zellmembran gefunden, die nach außen direkt in die ektoplasmatische Hülle übergeht. *A. Meyer* (25) gelang bei kleineren Bakterien die Darstellung eines äußeren Zellhäutchens durch Färbemethoden. Im übrigen scheint die Ausbildung einer Membran und einer sie bedeckenden Schleimschicht bei verschiedenen Bakterien sehr verschieden zu sein. *Heim* (18) konnte die Membran am *Bac. cyanogenes* als feine Kontur nachweisen. *Kruse* (23) fand das Auftreten sogenannter „Schatten“, d. h. leerer, scharfkonturierter Zellen in absterbenden Kulturen für eine Membran charakteristisch, aus der das Protoplasma ausgetreten war. *Emmerich* und *Suida* (11) brachten bei *Milzbrandbazillen*, die durch Pyocyanase aufgequollen waren, und *Pane* (31) bei der Autolyse in der Kälte Membranen zur Darstellung. *Gutstein* (16) zeigte durch Beizungs- und Färbeverfahren die isolierte Darstellung oder Kontrastdarstellung des Ektoplasmas. Nach *Gotschlich* (15) ist auch das Ektoplasma der Träger der Gramfestigkeit. Nach *Nakanishi* (28) ist bei *Milzbrandbazillen* und *Staphylokokken* die Membran besonders stark ausgebildet. Bei *Tuberkelbazillen* besteht sie aus ganz besonders widerstandsfähigem Material und enthält Fett und wachstartige Substanzen eingelagert [*Babes* (2), *Knoll* (22), *Bergel* (5)]. [Vgl. damit jedoch die Arbeit von *Lembke*, *Ruska* u. *Christophersen* (24).]

Bei einzelnen Bakterien treten deutliche, nur mit besonderen Verfahren färbbare, außerhalb der Membran liegende Kapseln auf. *Binaghi* (6) sieht in der Kapsel das Produkt einer biochemischen Tätigkeit des Bakteriums und glaubt, daß sie durch Anschwellung seiner äußeren Schicht entsteht. Auch nach *Gotschlich* (15), der wie einige andere Autoren die Membran mit dem Ektoplasma weitgehend identifiziert, ist die Kapsel durch Aufquellung des Ektoplasmas entstanden und sogar bei allen Bakterien vorhanden. Wenn sie bei bestimmten Arten quantitativ stärker hervortritt, insbesondere bei den sogenannten Kapselbakterien im infizierten Organismus, so ist dies als Schutzmaßnahme gegen die bakterienfeindlichen, zerstörenden Einflüsse (Alexine, Plakine, Leucine) zu erklären; denn es geht mit dieser aktiven Reaktion eine Steigerung der Virulenz und Serumfestigkeit einher

[Bakterienimmunität durch strukturelle Anpassung, *Sauerbeck* (39)]. Außerhalb des Tierkörpers kann die Kapselbildung durch Immuneserum, hohen Zuckergehalt, Arsenik usw. als Zusätze für Nährböden angeregt werden. Kapseln wurden nachgewiesen durch *Noetzel* (29) an *Staphylo-* und *Streptokokken* mit verdünnter Kalilauge; von *Babes* (1) am *Typhuserreger* durch *Löfflers* Geißelfärbung; durch *Zettnow* (46) am *Pestbazillus*; von *Bunge* (10) bei *Coli*, *Typhus* und *Proteus*; von *Unna* (42) bei den *Tuberkel-* und *Leprobazillen* als rote Hüllen mit Kernresten; von *Johne* (21) und vielen anderen beim *Milzbrand*. Mit der Frage der *Milzbrand-Kapsel* befaßten sich besonders eingehend *A. Fischer* (13) und auf Anregung von *v. Baumgarten* *W. Enderle* (12), auf deren Auffassungen noch zurückzukommen ist.

Fürst (14), *Heim* (19), *Töniessen* (41) unterscheiden an der Kapsel zwei Schichten: Die innere lebenswichtigere als Ektoplasmaanteil und die äußere als diffuses Sekretionsprodukt ohne eine scharfe äußere Kapselmembran. Nach *Bail* (3) erfolgt der Übergang des Bakteriums in die Kapselschicht fließend, d. h. ohne Membran, während *Woloschin* (44) an Hand der Beobachtung von Leerkapseln eine innere scharfe Begrenzung hervorhebt. *Baumgarten* (4) behauptet die Anwesenheit einer stark lichtbrechenden Zellhaut. Nach *Bail* (3) ist die Grenze der Kapseln gegen die Umgebung im lebenden Zustande der Bazillen immer eine scharfe, Fortsätze oder amöboide Auswüchse lassen sich nicht beobachten. Er findet im gefärbten Präparat bei langer Färbung mit verdünnten Lösungen keine äußere Grenzmembran, wohl aber bei brüskere Färbung. Bei Bakterien in eiweißhaltigen Flüssigkeiten findet er unter anderem auch Kapseln mit pseudopodienartigen, spitzen Fortsätzen versehen, hält diese aber für Kunstprodukte.

Fürst (14) unterscheidet die Kapseln als einen aus dem Zellplasma differenzierten Bakterienanteil und außerdem eine Hülle von umgebendem Nährmedium, die aus radiärer gestellten feinsten Körnchen bestehen soll. Die Kohäsion zwischen beiden ist so stark, daß ein mehrmaliges Waschen in physiologischer Kochsalzlösung ohne Schaden vertragen wird. *Woloschin* (44) behauptet, eine radiäre Streifung nachgewiesen zu haben. *Ottolenghi* (30) sah eine Netzstruktur, die er aber für eine unregelmäßige, künstliche Aufquellung des Ektoplasmas hält. *Babes* (1) findet beim *Friedländer-Bakterium* eine konzentrische Schichtung der Kapsel. *Hinterberger* (20) sah auf Grund versilberter Präparate radiäre Faltungen und geißelartige Fortsätze. Radiäre oder ungefähr radiäre Streifungen bildet auch *Töniessen* (41) ab. *Ottolenghi* (30) fand bei Safraninfärbung ebenfalls radiäre Lagerung. *Woloschin* (44) bildet außerdem unregelmäßige, grobe Wabennetze ab und sieht innerhalb der Kapseln sogar Vorstufen der Sporenbildung, wie er auch diese als eine Art Sporangium ansieht und die innerhalb der Kapsel vorkommenden Zerfallsprodukte des Entoplasmas als färbare Sporen oder deren Auskeimungen. *Hinterberger* (20) beschrieb in der Interzellularsubstanz eine ganz feine netzartige Struktur, die in der Nähe der Bakterienleiber Ähnlichkeit mit Geißelbildungen hat. *Migula* (26) hat Schleimfäden beobachtet, die von der quellenden Membran ausgehen. Ebenso konnten *Hinterberger* (20) und *Hamm* (17) bei gewissen Manipulationen Schleimfäden und Pseudogeißeln am Rande der Kapseln erhalten. Die Kapsel hat nach ihrer Meinung außen keine scharfe Grenzmembran.

Das Gesamtergebnis der zahlreichen lichtoptischen Untersuchungen ist uneinheitlich. Die Existenz einer Membran scheint manchen Autoren auch heute noch nicht mit Sicherheit erwiesen [*R. Müller* (27)]. Wesen

und Zugehörigkeit der Kapsel wird verschieden betrachtet, ihr Vorkommen, ihre Struktur, ihre innere und äußere Begrenzung werden verschieden beschrieben.

II. Material und Voruntersuchungen.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir als typische Vertreter kapselbildender Bakterien jeweils verschiedene Stämme von *Streptococcus lanceolatus* Typ I, II und III, *Bacillus pneumoniae* und *Bacillus anthracis*. Außerdem werden Beobachtungen an einigen anderen Keimen herangezogen.

Als Nährböden dienten Nährbouillon, Agar und Blutagar, für die Tierversuche weiße Mäuse, die wir meist intraperitoneal infizierten. Bei den aus Tierversuchen zur Gewinnung von Kapseln isolierten Bakterien wurde bakterienhaltiges Peritonealexsudat oder Blut sorgfältig in destilliertem Wasser fraktioniert zentrifugiert, bis die Bakterien von Salzen, Eiweiß, Blut- und Exsudatzellen befreit waren. Ebenso wurde mit Keimen aus Bouillon verfahren. Die Beobachtung und Abbildung unserer Präparate erfolgte lichtoptisch an ungefärbten Präparaten, nach Färbung mit Fuchsin, unter Anwendung der Kapselfärbung nach *Johns* und im Tusche- bzw. Kollargolpräparat. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens-Übermikroskop nach *E. Ruska* und *B. v. Borries* (9) angefertigt, wobei daran erinnert sei, daß die übermikroskopischen Bilder die Massenverteilung der Objekte wiedergeben (8). Die Kulturbakterien wurden in der früher beschriebenen Weise aus wässrigen Suspensionen auf Zaponlackfilmen aufgetrocknet (35, 33), die Bakterien aus dem Tierkörper nach der Reinigung. Welche Untersuchungsverfahren bei der Übermikroskopie in Frage kommen, haben wir an anderer Stelle ausführlich dargestellt (37). Die Bilder sind in Originalgröße reproduziert.

Zur Kritik unserer Methoden sei betont, daß die elektronenoptische Untersuchung der Bakterien ohne Färbung erfolgt. Dadurch entfallen Anlagerungen von Farbteilchen an der Bakterienoberfläche, die zu Täuschungen über die Außenkontur führen können. Andererseits kann möglicherweise das Waschen der Bakterien in destilliertem Wasser, das Auftrocknen auf dem Film, das Vakuum und die Elektronenbestrahlung Membran und Kapsel ändern. Nach *Fürst* (14) wird durch mehrfaches Waschen in physiologischer Kochsalzlösung die Kapsel nicht angegriffen. Bei unseren Versuchen blieb bei *Pneumokokken* und besonders bei *Pneumobazillen* auch beim Waschen mit destilliertem Wasser die Kapsel erhalten. Die Auftrocknung kann bei der Art unserer Untersuchung keine anderen Veränderungen hervorrufen als im lichtoptischen Präparat, es entfällt zudem beim übermikroskopischen Präparat die Fixierung. Veränderungen durch die Bestrahlung können auf dem Leuchtschirm sofort beobachtet werden, sie sind an der Kapsel von uns nicht gesehen worden, dagegen nach intensiver Bestrahlung an Nucleoiden, an den Granula der *Tuberkelbazillen* (24) und bei Untersuchungen

über die bakteriophage Lyse (36). Die auch bei schwacher Bestrahlung eintretende Abtötung der Bakterien erfolgt ohne sichtbare Strukturveränderungen.

Zu prüfen war noch der Einfluß des Vakuums auf Form, Größe und Lebensfähigkeit der Bakterien.

Zunächst wurde das Verhalten von Bakterien untersucht, die nach der üblichen Methode in einer Aufschwemmung mit Aq. dest. auf einem Deckglas aufgetrocknet wurden. Das Deckglas wurde dreimal durch die Flamme gezogen und mit der Bakteriensicht nach dem Innenraum einer Hochvakuumkammer gewendet vakuumdicht aufgesetzt. Der Druck betrug nach dem Auspumpen in der Regel 2 mm Hg, in einzelnen Fällen wurden die Keime auch 10^{-5} mm Hg ausgesetzt. Die Vakuumkammer ist ähnlich der Feuchtkammer des Mikromanipulators so konstruiert, daß sie die lichtmikroskopische Beobachtung des Objektes während der Herstellung und Aufrechterhaltung des Vakuums bei hohen Vergrößerungen ermöglicht. Während einer 5 Minuten andauernden Exponierung im Vakuum trat keine Änderung der Größe oder der Form der Bakterien ein. Derselbe Versuch wurde nun mit unfixierten Bakterien wiederholt. Bei der Beobachtung während des Auspumpens war keine plötzliche Größenänderung zu sehen, mitunter schienen jedoch nach 5 Minuten Einwirkung eine ganz minimale nicht sicher meßbare Verkleinerung feststellbar. In keinem Falle jedoch war die Schrumpfung größer als sie bei der Fixierung in der Flamme eintritt. Es besteht umrißmäßig nach der Vakuumbehandlung kein sichtbarer Unterschied zwischen fixierten und unfixierten Bakterien.

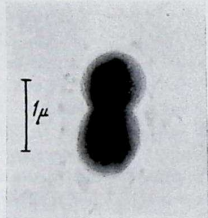
Es war aber noch die Frage zu beantworten, ob bei den unfixierten also noch lebenden Stämmen sich nicht Störungen in der Vermehrungsfähigkeit eingestellt hatten. Deshalb wurde auf die aufgetrockneten Bakterien nach der Vakuumbehandlung ein Tropfen steriler Nährbouillon aufgetragen und aus der Vakuumkammer eine feuchte Kammer hergestellt. Es zeigte sich danach ein absolut normales Wachstum des betreffenden Stammes. Bei *Sarcina tetragena* war das Wachstum sogar nach sechsständiger ununterbrochener Exponierung in der Vakuumkammer bei angeschlossener Pumpe noch erhalten. In einer anderen Versuchsfolge wurden Bakterienaufschwemmungen auf dünne Deckglas-Agarnährböden aufgetrocknet und für 5 bis 7 Stunden in das Vakuum eingebracht. Auch diese Kulturen gingen nachher in der feuchten Kammer an. Das Wachstum wurde lichtoptisch kontrolliert. Versuche, Bakterien in Nährbouillon aufzutrocknen und ebenso dem Vakuum auszusetzen, ergaben das gleiche Resultat. Damit erscheint ein tiefgehender Einfluß der Vakuumbehandlung, d. h. der Trocknung und Entquellung nicht nur auf die Struktur, sondern auch auf die Lebensfähigkeit ausgeschlossen.

III. Die übermikroskopischen Bilder.

Die untersuchten Bakterien: *Pneumokokken*, *Pneumobazillen* und *Milzbrandbazillen* bilden auf den üblichen Kulturnährböden in der Regel keine typischen Kapseln, wohl aber im parasitierenden Zustand im Tierkörper. Beide Formen werden in den folgenden Bildern verglichen.

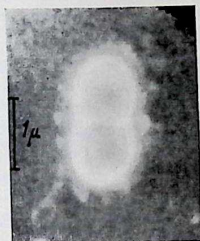
a) *Streptococcus lanceolatus*.

In Abb. 1 vom Typ I des *Streptococcus lanceolatus* läßt sich ein zentraler dunkler Teil erkennen, der sich nach dem Rande zu etwas



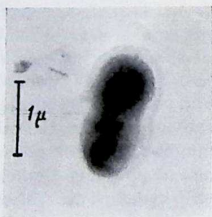
II 516/39

Abb. 1. *Streptococcus lanceolatus*, Typ I, 24stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000:1.



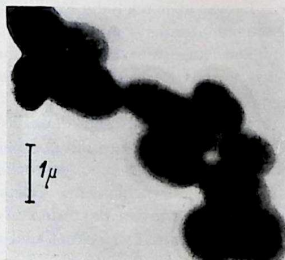
II 517/39

Abb. 2. Dunkelfeldaufnahme des gleichen Diplococcus wie Abb. 1, el. opt. 13000:1.



II 532/39

Abb. 3. *Streptococcus lanceolatus*, Typ I, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000:1.



II 541/39

Abb. 4. *Streptococcus lanceolatus*, Typ II, 8stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 10000:1.

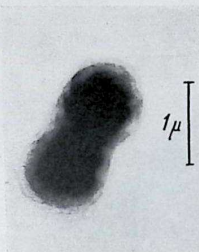
auffellt. Er ist dicht umschlossen von einer schmalen, dunklen, membranartigen Schicht, die sich nach außen schärfer als nach innen abhebt. Ihr folgt eine helle, breitere Zone, an deren Außenseite kleine Teilchen angelagert sind. Ähnlich erkennt man die Schichtung auch im Dunkel-

feld (Abb. 2). Dieses Bild einer mehrschichtigen Außenbegrenzung wiederholt sich mit wechselnder Breite der einzelnen Zonen bei allen Kulturpneumokokken immer wieder (Abb. 3, 4). Die membranartige Schicht sieht man besonders deutlich als schwarze Begrenzungslinie zwischen den zusammenstoßenden Diplokokkengruppen auf Abb. 4, Typ *II*. Sie fehlt jedoch an der Teilungslinie zwischen den Einzelkokken. Abb. 5, Typ *III* zeigt die membranartige Schicht auch zwischen den



II 541/39

Abb. 5. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 18stündige Kultur auf Blutagarplatte cl. opt. 13000 : 1.



II 450/39

Abb. 6. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte cl. opt. 15000 : 1.

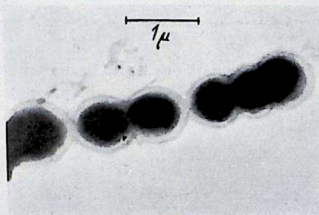


Abb. 7.

II 514/39

Streptococcus lanceolatus, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte cl. opt. 13000 : 1.

Einzelkokken sehr ausgeprägt. Die Aufhellung zwischen dem zentralen Teil und der „Membran“ ist hier und in Abb. 6 breiter und deutlicher als in Abb. 1, der Innenkörper etwas heller. Zum Teil sind diese Unterschiede abhängig vom Härtegrad des photographischen Abzugs, sie liegen aber auch zweifellos an den Bakterien selbst. Den größten Abstand zwischen Innenkörper und Membran zeigt Abb. 7; er kann andererseits auch sehr klein sein (Abb. 8, 9) oder völlig verschwinden (Abb. 10, 11). Um die Zellen der Abb. 8 bis 11 zeigt sich in verschiedener Ausprägung eine mehr oder weniger körnig-flockige Anlagerung außerhalb der Mem-

bran. Ihre Begrenzung nach außen ist unscharf und zeigt einen allmählichen Übergang zum strukturlosen Kollodiumfilm, der die Bakterien trägt. Die lichtoptische Vergleichsaufnahme des gleichen Stammes, des schleimig wachsenden Typus *III*, läßt die Zellen mit einem hellen Hof



Abb. 8.

II 657/39

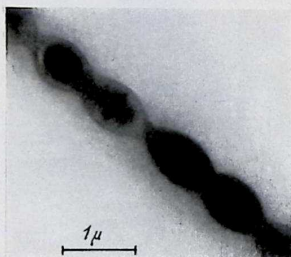


Abb. 9.

II 658/39

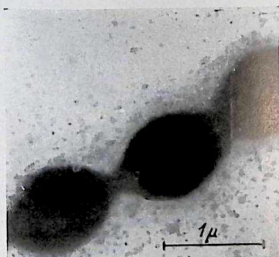
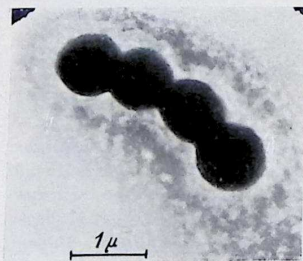


Abb. 10.

II 639/39

Abb. 8 bis 10. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 52stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000:1 und 18000:1.

erscheinen (Abb. 12). Außerhalb des Hofes liegen schleimige Substanzen, die sich auch zwischen den Kokkengruppen hinziehen. Sie sind elektronenoptisch (Abb. 11) und lichtoptisch (Abb. 12) in der gleichen La-



II 512/39

Abb. 11. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000:1.

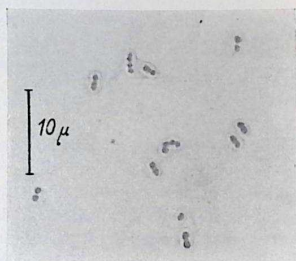


Abb. 12. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 72stündige Kultur auf Blutagarplatte, gefärbt mit alkoholisch-wässriger Fuchsinlösung, lichtoptisch 1500:1.

gerung um die Bakterien zu sehen. Der helle Hof erscheint lichtoptisch als eine in der Kultur gebildete „Kapsel“, elektronenoptisch als eine Zone, in der die Schleimsubstanzen sehr wasserreich sind und daher nach dem Auftrocknen die Bakteriengruppe besonders locker umgeben. Die aus Blut und Peritonealexsudat gewonnenen *Pneumokokken* zeigen ähnliche körnige Substanzen auf der Zelloberfläche (Abb. 13, 14). Der

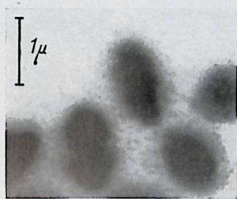


Abb. 13. *Streptococcus lanceolatus*, Typ II, aus Mäuseblut isoliert el. opt. 12000:1.

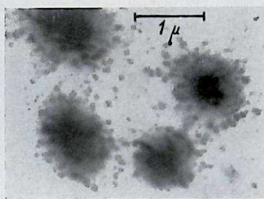


Abb. 14. *Streptococcus lanceolatus*, Typ II, aus Peritonealexsudat isoliert el. opt. 12000:1.

Zusammenhang zwischen den Kapselsubstanzen und der Bakterienzelle ist dabei überraschend locker, scheint oft sogar völlig zu fehlen. Trotzdem haften die Substanzen nach dreimaligem Waschen noch an den Zellen fest. An ihrer Zugehörigkeit zu den Bakterien könnte man zweifeln, wenn nicht entsprechende Versuche mit *Pneumobazillen* grundsätzlich ähnliche, jedoch bezüglich der Zugehörigkeit der Kapselsubstanzen zur Bakterienzelle viel deutlichere Bilder ergeben hätten.

b) *Bacillus pneumoniae*.

Die *Pneumobazillen* aus Agarkulturen zeigen die für *Pneumokokken* charakteristische mehrschichtige Außenbegrenzung nicht. Zellen aus



Abb. 15. *Bacillus pneumoniae*, 12tägige Kultur auf Agarplatte el. opt. 14000:1.

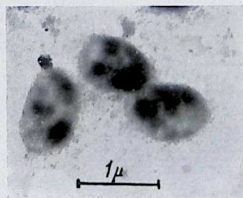
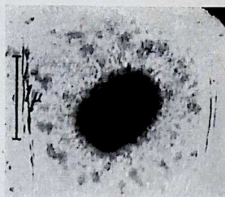


Abb. 16. *Bacillus pneumoniae*, 28tägige Kultur auf Agarplatte, el. opt. 14000:1.

jungen Kulturen erscheinen scharf begrenzt, häufig mit zentralen oder polaren Aufhellungen. In älteren Kulturen findet man daneben „Bakteriens Schatten“ (Abb. 15) und schließlich körnige Formen (Abb. 16). Nur selten fanden wir in Kulturen Formen, deren Außenzonen an die Schleim- und Kapselbildung der *Pneumokokken* erinnerte (Abb. 17).



II 731/39

Abb. 17. *Bacillus pneumoniae*, 26tägige Kultur auf Agarplatte, el. opt. 15000:1.

Die Struktur der aus dem Tierkörper gewonnenen *Pneumobazillen* ist eine völlig andere als die der Kulturbakterien (Abb. 18 bis 23). Die

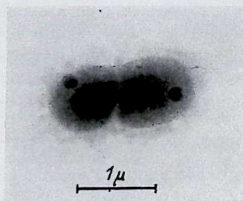


Abb. 18. II 817/39

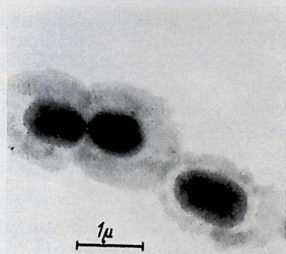


Abb. 19. II 819/39

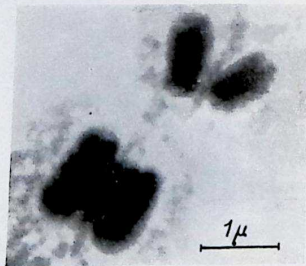


Abb. 20. II 830/39

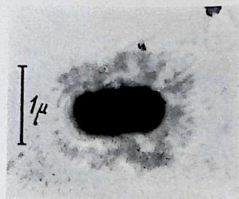


Abb. 21. II 829/39

Abb. 18 bis 21. *Bacillus pneumoniae* aus Mäuseblut isoliert el. opt. 14000:1 und 12000:1.

Zellen erscheinen untereinander gleichartiger und zeigen häufig einen oder während der Teilung zwei deutliche, durch ihre größere Dichte hervortretenden Inhaltskörper (Abb. 18, 19, 20). Diese liegen diagonal zur Längsachse der Bazillen oder Doppelbazillen. Die deutlichen Beziehungen zum Teilungsvorgang ermöglichen mit hoher Wahrscheinlichkeit sie als „Nucleoide“ anzusprechen. Um den Bakterienkörper sieht man in größerer oder geringerer Breite die Kapselsubstanz. Sie bricht nach außen unregelmäßig, ohne scharfe Begrenzung ab. Die Anordnung der krümeligen Masse ist häufig deutlich radiär-(Abb. 20, 21).

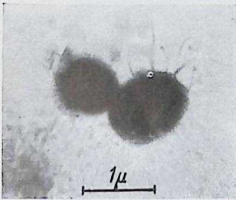


Abb. 22. II 825/39

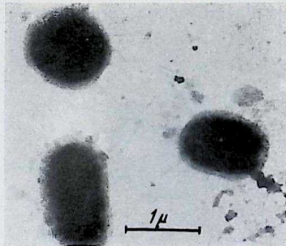


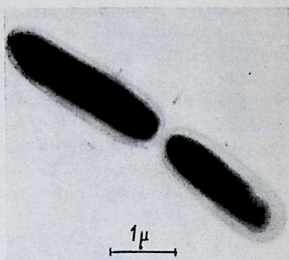
Abb. 23. II 823/39

Abb. 22 und 23. *Bacillus pneumoniae* aus Peritonealexsudat isoliert el. opt. 13000:1.

Wir deuten dies als Folge einer durch die Bakterienoberfläche erfolgenden allseitigen Abscheidung. Auch dann, wenn die Radiärstruktur erst durch die Auftrocknung zustande kommen sollte, zeigt sie doch eine vorgebildete Lagerung und Ausrichtung der Kapselsubstanzen an. Mitunter sind innerhalb der Kapsel beträchtliche Lücken. Man sieht dann die Bakterienoberfläche scharf konturiert vorliegen, keineswegs gequollen und keinen allmählichen Übergang zur Kapsel bildend. Sind die Kapseln durch Waschen der Bakterien völlig abgelöst (Abb. 22, 23), so ist ebenfalls die scharfe Zellbegrenzung deutlich, darüber hinaus sieht man einen feinen „Strahlenkranz“, wie er früher schon (33, Abb. 9 und 17b; 38) bei *B. prodigiosum* und *Sarcina alba* beschrieben wurde.

c) *Bacillus anthracis*.

Als Sporenbildner zeigt der Milzbrandbazillus in der Kultur eine von den bisher beschriebenen Keimen stark abweichende Morphologie. Vor der Sporenentwicklung, auf deren Probleme hier nicht ins Einzelne gehend eingegangen werden soll, ist eine deutlich abgesetzte Membran um einen dichten Bakterienkörper sichtbar (Abb. 24 u. 29). Der große Abstand zwischen dem Innenkörper und der Membran erinnert an Abb. 7 der *Pneumokokken*. Mit der Ausreifung der Sporen nimmt die



II 100/40

Abb. 24. *Bacillus anthracis*, 28tägige, bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur auf Agarplatte el. opt. 12000:1.

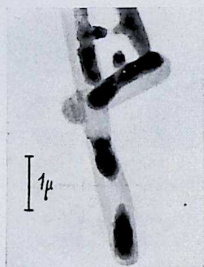


Abb. 25. II 93/40

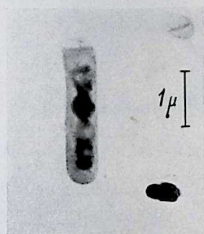


Abb. 26. II 91/40



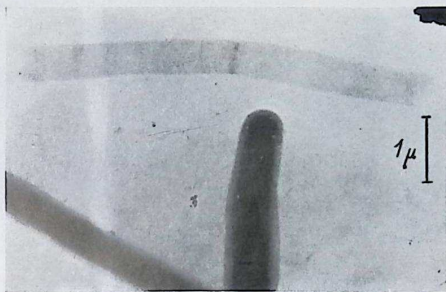
Abb. 27. II 84/40



Abb. 28. II 98/40

Abb. 25 bis 28. *Bacillus anthracis*, verschiedene Stadien der Sporenbildung in Kultur auf Agarplatte el. opt 10000:1.

Dichte und Ausdehnung der Innenkörper ab (Abb. 25, 26, 27), bis nach deren Freiwerden leere Membranen übrig bleiben (Abb. 28, 29). Dabei ist bemerkenswert, daß sich polar liegende, manchmal klappenartige Öffnungen in der Membran bilden, die offenbar die Spore austreten lassen (Abb. 25 bis 29). Lichtoptisch kann durch den Abstand zwischen Innenkörper und Membran eine Kapsel vorgetäuscht werden. Elektronenoptisch ist keine Kapsel sichtbar. Echte Kapseln sollte man auch beim *Milzbrandbazillus* im Tierversuch erwarten. Entsprechende Versuche mit einem mäusepathogenen Milzbrandstamm haben jedoch



II 95/40

Abb. 29. *Bacillus anthracis*, „leere Bakterienmembran“ el. opt. 12000:1.

immer nur gut begrenzte, kapsellose, meist homogen dichte Bakterienformen in Blut und Peritonealexsudat gezeigt. Es muß also bei der Waschprozedur die Kapselsubstanz entfernt worden sein, oder es fehlt dem *Milzbrandbazillus*, entgegen den herrschenden Anschauungen, die bei *Pneumoniebazillen* beschriebene echte Kapsel.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen an kapselbildenden Bakterien, und zwar an Kokken, nicht sporenbildenden und sporenbildenden Stäbchen, haben es ermöglicht, strittige Fragen über den cytologischen Feinbau dieser Keime zu klären und neuartige Befunde zu erheben. Im parasitierenden Zustand zeigen die *Pneumobazillen* in ihrem Cytoplasma wohl ausgebildete Nucleoide. Ihre Durchmesser betragen etwa 60 bis 160 μ , so daß sie nur mittels der Übermikroskopie genau nachweisbar sind. Die Einteilung des Bakteriencytoplasmas in Entoplasma und Ektoplasma (*Zettnow*) erscheint nicht streng durchführbar, zwischen beiden ist eine scharfe Grenze (*Schaudinn*) nicht nachweisbar. Die Vorstellung, daß die ektoplasmatische Zone dichter sei als das Entoplasma findet in

den elektronenoptischen Bildern keine Stütze, dies gilt höchstens von der außerordentlich dünnen Membran¹. An zahlreichen Bakterien (*Dysenterie*-, *Bang*-, *Coli*-, *Paratyphus*-, *Prodigiösus*-Bakterien u. a.) wurde schon früher (7, 32, 33) gezeigt, daß die äußeren Cytoplasmateile häufig eine geringere Dichte aufweisen als das Zellinnere. Die gleichen Befunde wurden zum Teil an *Pneumokokken* und *Pneumobazillen* (Abb. 7, 21) und mit großer Regelmäßigkeit an *Milzbrandbakterien* erhoben. Auch bei den Erregern der Tuberkulose (24) und Aktinomykose (Abb. 30) sieht man deutlich die geringere Dichte der äußeren Cytoplasmateile.

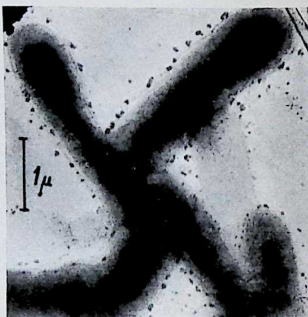


Abb. 30. II 509/39

Actinomyces boris, 20tägige anaerobe Kultur auf Fortner-Platte el. opt. 13000:1.

Während eine genaue Grenzziehung zwischen Entoplasma und Ektoplasma unmöglich erscheint, ist die Begrenzung des Bakterienkörpers, d. h. des Ektoplasmas nach außen immer scharf und erscheint häufig als konturartige Linie von etwa 8 bis 20 m μ Breite. Sie tritt besonders dann deutlich hervor, wenn zwischen dieser Linie und dem dichten Bakterieninnern ein breiterer, wenig massendichter Teil liegt. Wahrscheinlich handelt es sich bei manchen Bakterienformen dabei um Lücken, die durch Schrumpfung des Cytoplasmas zustande kommen. Die Beobachtungen sprechen jedenfalls für das Vorliegen einer Membran, deren Wandstärke so gering ist, daß sie der direkten lichtoptischen

¹ Anmerkung bei der Korrektur. A. Jakob u. H. Mahl (Jahrb. d. AEG-Forschung 7, 31, 1940), die sich bei ihren Untersuchungen des gleichen Verfahrens der Abbildung mittels Elektronenstrahlen bedienen, bezeichnen neuerdings die von ihnen entsprechend früheren Untersuchungen von G. Pickarski u. H. Ruska, gefundenen Bakterienmembranen als Kapseln. Wir halten eine strenge Trennung dieser beiden morphologisch verschiedenen Gebilde für erforderlich.

Beobachtung entgehen mußte. Wir möchten sie mit dem früheren Begriff des Ektoplasmas nicht identifizieren. Besonders erwiesen erscheint ihre Existenz, wenn aus der Umhüllungsmembran der Inhalt ausgetreten ist (*Kruses* „Bakteriens Schatten“, Abb. 29 u. 31), oder wenn sich sogar Falten in ihr nachweisen lassen (33, Abb. 13) (Abb. 32). Die Abb. 29 und 31 zeigen „Leermembranen“, keine „Leerkapseln“ (*Woloschin*). Reißt der die Bakterien tragende Kollodiumfilm bei der Beobachtung ein, und rollt er sich auf, so sieht man die aufgetrockneten Objekte von der Seite und erkennt, daß sie flach ausgebreitet auf der Unterlage haften.

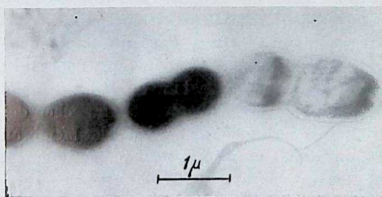


Abb. 31.

II 661/39

Streptococcus lanceolatus, „leere Bakterienmembran“,
52stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.

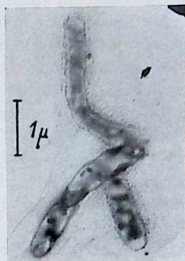


Abb. 32.

II 469/39

Keim aus der Mundhöhle
(unbestimmt) mit deutlicher
Faltenbildung el. opt. 10000 : 1.

Außerhalb der Membran und damit außerhalb der Bakterien liegen häufig körnige Elemente, sogenannte Begleitkörperchen, der Zelle an (Abb. 30). Sie sind für einzelne Bakterienarten so charakteristisch, daß sie als spezifische Zellprodukte betrachtet werden müssen. Schleim erscheint meist als strukturloser Schleier um die Bakterienzelle und läßt sich nach Versuchen, die wir mit *Coli*-Bazillen ausgeführt haben, leicht durch Waschen entfernen. In ähnlicher Weise umgeben auch die Kapselsubstanzen den Bakterienkörper, und zwar teils als krümelig, körnige Substanz und teils als Auflagerung mit deutlich radiärer Struktur. Wir haben danach in der Kapselbildung lediglich Sonderfälle des allgemein verbreiteten Vorganges der Ausscheidung unlöslicher Substanzen vor uns. Es handelt sich bei ihr nicht um Quellung (*Binaghi*, *Gotschlich* u. a.) der äußeren Zellschicht, diese liegt vielmehr völlig intakt unter der Kapsel vor (Abb. 21). Nach außen ist die Kapselbegrenzung dagegen unscharf und ohne Membran (*Hinterberger*, *Hamn*). Die Kapselbefunde mancher Autoren an *Staphylokokken*, *Streptokokken*, *Typhus*-, *Pest*-, *Coli*- und *Proteus*-Bazillen dürften, sofern es sich nicht um Kunstprodukte durch die zum Teil sehr eingreifenden Darstellungsmaßnahmen handelt, ebenfalls bakterielle Abscheidungen sein. Der

wesentliche Unterschied zwischen Schleim und Kapsel ist der Umstand, daß die Schleimsubstanzen zwischen den Bakteriengruppen zusammenfließen (Abb. 9, 10, 11), während echte Kapseln (Abb. 18 bis 21) die einzelnen Bakterien oder Diplokokken isoliert umgeben.

Wie weitgehend die lichtoptischen Untersuchungen zur Frage der Außenbegrenzung der Bakterien zu Trugschlüssen führen können, zeigte schon das Beispiel der Tuberkulose (24). Ähnlich scheinen die Verhältnisse beim Milzbrand zu liegen. Wie sich beim *Tuberkelbazillus* keine dicke, wachsartige Hülle nachweisen ließ, so beim Milzbrand keine echte Kapsel. Auch in lichtoptischen Untersuchungen an ungewaschenen Milzbrandbazillen konnten wir uns wie *A. Fischer* (13) und *W. Enderle* (12) von der Existenz einer Kapsel nicht überzeugen. Es wäre dagegen unrichtig, mit *A. Fischer* auch das Vorhandensein einer Kapsel bei *Pneumobazillen* zu bestreiten. Im ungefärbten Präparat kann lichtoptisch der Eindruck einer Kapsel bei echter Kapselbildung entstehen, aber auch wenn sich Lücken im Ausstrichmaterial um die Bakterienzelle bilden. Dabei ist zu beachten, daß solche Lücken sowohl zwischen der Bakterienmembran und der Umgebung als auch innerhalb der Membran (Milzbrand) zwischen dieser und dem Cytoplasma vorkommen können. Die unmittelbare Abbildung der durchstrahlten Masse durch das übermikroskopische Verfahren schließt Täuschungen über das Vorhandensein oder Fehlen einer Kapselsubstanz aus.

Für die Überlassung von Bakterienstämmen sind wir dem bakteriologischen Laboratorium des Rudolf Virchow-Krankenhauses (Prof. Dr. *T. Wohlfeil*) und dem Hygienischen Institut der Universität Berlin (Dr. *A. Vierthaler*) zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Die bisherigen Beobachtungen über die allgemeine Morphologie der Bakterien werden mit dem Siemens-Übermikroskop nach *E. Ruska* und *B. v. Borries* an kapselbildenden Bakterien erweitert.

Der Einfluß des Untersuchungsverfahrens auf Struktur und Lebensfähigkeit der Bakterien wird geprüft.

Die Deutung der gewonnenen Bilder erfolgt unter besonderer Berücksichtigung der Frage nach der Existenz und Struktur von Bakterienmembran und Kapsel.

An *Pneumokokken* läßt sich Membran und Kapsel oder Schleimschubstanz getrennt darstellen.

Die *Pneumobazillen* zeigen in parasitierendem Zustand außer Membran und Kapsel deutliche Inhaltkörper, die als Nucleoide angesprochen werden. Die Kapseln zeigen eine radiäre Ordnung ihres

Aufbaues. In der Kultur gewachsene *Pneumobazillen* zeigen keine Nucleoide.

Bei den *Milzbrandbazillen* ist die Membran in besonders schöner Ausbildung nachweisbar. Nach der Sporenreifung tritt die Spore durch eine polare Lücke in der Membran aus der Zelle aus. Kapseln sind bei *Milzbrandbazillen* nicht nachzuweisen gewesen.

Die Kapsel erscheint als Ausscheidungsprodukt des Bakteriums. Sie ist keine Aufquellung der äußeren Bakterienhülle. Diese läßt sich vielmehr völlig intakt unter der Kapsel nachweisen.

Literatur.

- 1) *Babes, V.*, Zeitschr. f. Hyg. 9, 323, 1890; 20, 420, 1895. — 2) *Derselbe*, C. r. Soc. Biol. Paris 68, 315, 1910. — 3) *Bail, O.*, Handb. d. mikrobiol. Techn. II, S. 1152, 1923. Verlag Urban-Schwarzenberg. — 4) *Baumgärtel, T.* Grundr. d. theor. Bakteriologie, S. 9. Berlin, Jul. Springer, 1924. — 5) *Bergel, S.*, Beitr. z. Klin. der Tuberkul. 38, 95, 1917. — 6) *Binaghi, R.*, Centralbl. f. Bakt. II, 4, 897, 1898. — 7) *v. Borries, B., E. u. H. Ruska*, Klin. Wochenschr. 17, 921, 1938. — 8) *v. Borries, B., u. E. Ruska*, Naturwiss. 27, 281, 1939. — 9) *Dieselben*, ebenda, S. 577; Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 56, 317, 1939. — 10) *Bunge, R.*, Fortschr. d. Med. 12, 462, 1894.
- 11) *Emmerich, R., u. Dr. Saida*, Centralbl. f. Bakt. I, 27, 776, 1900. — 12) *Enderle, W.*, Hat der Milzbrand eine Kapsel? Inaug.-Diss. Tübingen 1911. Leipzig, Verlag Hirzel.
- 13) *Fischer, A.*, Vorlesungen über Bakterien. Jena, Verlag G. Fischer, 1903. — 14) *Fürst, Th.*, Centralbl. f. Bakt. I, 56, 97, 1910.
- 15) *Gotschlich, E.*, Handb. d. path. Mikroorgan. 1, 75, 1929. — 16) *Gutstein, M.*, Centralbl. f. Bakt. I, 93, 233, 1924.
- 17) *Hamm, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, 43, 287, 1907; 46, 1, 1908. — 18) *Heim, L.*, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt 5, 520. — 19) *Derselbe*, Arch. f. Hyg. 40, 55, 1901; Münch. med. Wochenschr. Nr. 10, 1904. — 20) *Hinterberger, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, 30, 424, 1901; 45, 108, 1908.
- 21) *Johne, Deutsch.* Zeitschr. f. Tiermed. 19, 244, 1894.
- 22) *Knoll, W.*, Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. 15, 211, 1910. — 23) *Kruse, W.*, in *Flügge*, Mikroorganismen 1, 70, 1896.
- 24) *Lembke, A., H. Ruska u. J. Christophersen*, Klin. Wochenschr. 19, 217, 1940.
- 25) *Meyer, A.*, zitiert nach *Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie, S. 198, 1922. — 26) *Migula, W.*, Deutsch. tierärztl. Wochenschr. 1896, S. 28, System d. Bakterien, S. 125. Jena, G. Fischer, 1900. — 27) *Müller, R.*, Medizinische Mikrobiologie. Verlag Lehmann, 1939.
- 28) *Nakanishi, K.*, Münch. med. Wochenschr. 1900, S. 187. — 29) *Noetzel, W.*, Fortschr. d. Med. 14, 41, 1896.
- 30) *Ottolenghi, D.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 9, 769, 1911.

31) *Pane, N.*, Centralbl. f. Bakt. I, 58, 570, 1911. — 32) *Piekarski, G.* u. *H. Ruska*, Klin. Wochenschr. 18, 383, 1939. — 33) *Dieselben*, diese Zeitschr. 10, 302, 1939. — 34) *Pietschmann, K.*, u. *A. Rippel*, ebenda 3, 422, 1932.

35) *Ruska, H.*, Naturwiss. 27, 287, 1939. — 36) *Derselbe*, ebenda 28, 45, 1940. — 37) *Ruska, H.*, u. *E. Frühbrodt*, Der Biologe 9, 69, 1940. — 38) *Ruska, H.*, Verhandl. d. Dtsch. Zoolog. Gesellschaft 1939, S. 295.

39) *Sauerbeck, E.*, Centralbl. f. Bakt. I, 50, 572, 1909; Zeitschr. f. Hyg. 56, Nr. 9, 1909. — 40) *Schaudinn, F.*, Arch. f. Protistenkunde 1, 314, 1902; 2, 416, 1903.

41) *Töniessen, E.*, Centralbl. f. Bakt. I, 65, 23, 1911.

42) *Unna, P. G.*, ebenda 3, 97, 1888.

43) *Wohlfeil, T.*, in *C. Flüggés* Grundriß der Hygiene, S. 586, 11. Aufl., 1940. — 44) *Woloschin, A. D.*, Centralbl. f. Bakt. I, 72, 312, 1914.

45) *Zettnow, E.*, Zeitschr. f. Hyg. 24, 74, 1897. — 46) *Derselbe*, ebenda 21, 165, 1896; 86, 25, 1915.

(Aus der Mikrobiologisch-Chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

Über die Bedeutung des Molybdäns für stickstoffbindende Nostocaceen.

Von

H. Bortels.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. März 1940.)

Wenn es im Erdboden und im Wasser Algen gibt, die nicht nur kohlenstoffautotroph, sondern außerdem stickstoffautotroph leben, dann müssen diese als die ersten und wichtigsten Bildner organischer Substanz auf der Erde angesprochen werden. Denn die höheren grünen Pflanzen assimilieren zwar die Kohlensäure der Luft, sind aber auf gebundenen Stickstoff angewiesen, während umgekehrt die stickstoffbindenden Bakterien zwar den elementaren Stickstoff der Luft assimilieren können, dafür aber mit organisch gebundenem Kohlenstoff versorgt werden müssen. Nur stickstoffbindende und zugleich kohlenstoffautotrophe Organismen würden imstande sein, in rein mineralischem Substrat, das zunächst auch keinen Stickstoff in gebundener Form enthält, zu wachsen, sich zu vermehren, somit organische Materie zu bilden und gewissermaßen als Pioniere des Lebens den Boden für alle folgenden Organismen vorzubereiten.

Im weiteren Sinne könnten auch gewisse Mikrobengemeinschaften¹ hierher gerechnet werden, in erster Linie Algen, die in Symbiose mit stickstoffbindenden Bakterien zu leben vermögen. So entnahmen Wilfarth und Wimmer (30) ihren Versuchsergebnissen, daß Algen entweder allein oder in Gemeinschaft mit Bakterien Stickstoff binden und auf diese Weise zur Humusbildung und zur Erhaltung der sogenannten alten Kraft des Bodens beitragen. Über eine fördernde Beeinflussung des stickstoffbindenden *Azotobacter chroococcum* durch Algen hat Werner (28) berichtet, und Schröder (24) konnte *Chlorella* gemeinsam mit *Azotobacter* in stickstofffreier mineralischer Nährlösung zur Entwicklung bringen. Assimilation des elementaren Stickstoffs durch *Azotobacter* in Symbiose mit *Oscillatoria* und *Gloeocapsa* hat Menchikovsky (18) festgestellt.

Diese Lebensgemeinschaften werden jedoch kaum in dem Maße erste Pionierdienste geleistet haben wie solche Mikroorganismen, die

¹ Von der Symbiose hoch entwickelter Pflanzen wie der Leguminosen mit stickstoffbindenden Bakterien kann in diesem Zusammenhange nicht gesprochen werden.

allein Kohlenstoff wie Stickstoff aus der Luft entnehmen können. Algen mit dieser Eigenschaft sollen sich nach Ansicht vieler, auch älterer Autoren unter den *Cyanophyceen* befinden. *Beijerinck* (4) hat deshalb geäußert, daß solche *Cyanophyceen* die Urbewohner der Erde seien. Denn sie leben „beinahe gänzlich“ ohne gebundenen Stickstoff und siedeln sich als erste auf völlig sterilem Sand und auf vulkanischer Asche an (27).

Beijerinck war so vorsichtig, die untersuchten blaugrünen Algen als „oligonitrophil“ zu bezeichnen. Eine geringe Menge gebundenen Stickstoffs hielt er für unentbehrlich, obwohl Stickstoff gebunden würde. Der Streit darüber, ob diese Algen tatsächlich in der Lage sind, mit Luft als einziger Stickstoffquelle auszukommen, ist seit der Entdeckung von *Frank* (9), der als erster Stickstoffbindung bei Algen nachgewiesen hat, bis in die neuere Zeit niemals endgültig entschieden worden. Während es noch in keinem Falle gelungen ist, *Grünalgen* in Abwesenheit stickstoffbindender Bakterien in stickstofffreier Nährlösung zu züchten, geht aus den Arbeiten jener Jahre [siehe *Dreves* (7)] hervor, daß zwar bakterienhaltige *Nostocaceen*-Kulturen Stickstoff binden können, daß aber bezeichnenderweise unter den Begleitbakterien dieser Algen häufig, wenn auch nicht immer, *Azotobacter* nachgewiesen worden ist. Die Feststellungen bezüglich einer stickstoffautotrophen Lebensweise blaugrüner Algen in absoluter Reinkultur oder wenigstens frei von stickstoffbindenden Bakterien lauteten widersprechend. Z. B. konnte *Glade* (12) im Gegensatz zu den übereinstimmenden Feststellungen von *Beijerinck* (4) und *Heinze* (14), die beide *Nostocaceen* zur Assimilation des Luftstickstoffs für befähigt hielten, bei Arten der Gattung *Cylindrospermum* keine Spur von Stickstoffbindung nachweisen. Ebenso glaubte *Esmarch* (8), daß *Nostocaceen* nur durch Vermittlung von *Azotobacter* den Luftstickstoff ausnutzen könnten. *Dreves* (7) hat schließlich die Frage endgültig zu entscheiden versucht, indem er nach der Methode von *Beijerinck* (4) in stickstofffreier mineralischer Nährlösung Erdalgen anreicherte, diese dann rein züchtete und untersuchte. Es waren wieder nur *Nostocaceen*, mit denen in 50 bis 60 Tagen Stickstoffgewinne bis zu etwa 3 mg in 250 ccm Nährlösung erzielt wurden. Das ist jedoch so wenig, daß die stickstoffbindende Eigenschaft dieser Algen auch weiterhin angezweifelt werden konnte [*Gistl* (11)].

Allison und Mitarbeiter (1, 2, 3) haben nun in ausgedehnten Untersuchungen einen deutlicheren Beweis dafür geliefert, daß Reinkulturen von *Nostocaceen* tatsächlich den Luftstickstoff zu assimilieren vermögen. Die Reinzucht der Algen gelang ihnen in sehr einfacher Weise durch Bestrahlung artreiner Kulturen mit ultravioletem Licht, wodurch die Bakterien bei geeigneter Dosierung abgetötet, die Algen dagegen nicht geschädigt wurden. Die amerikanischen Autoren haben auch die von *Beijerinck* (4) schon getroffene Feststellung bestätigt, daß weder Grünalgen noch die ebenfalls sehr häufigen blaugrünen *Oscillatoria*-Arten die Fähigkeit zur Stickstoffbindung besitzen. Stets konnte diese Eigenschaft nur bei den *Nostocaceen* nachgewiesen werden. *Allison* und Mitarbeitern (1, 2, 3) ist dieser Nachweis durch Zugabe von Erdextrakt zur Nährlösung besonders deutlich gelungen. Durch diese Maßnahme erhöhte sich nämlich der Stickstoffgewinn in einem Zeitraum von 60 Tagen auf etwa 12 mg.

Allerdings kann nun wieder eingewendet werden, daß dem Nährmedium mit dem Erdextrakt auch Stickstoff zugeführt und damit nu

Beijerincks Anschauung von der Oligonitrophilie dieser Algen bestätigt wurde. Die amerikanischen Autoren erklären aber den auffallend fördernden Einfluß des Erdhumus mit dessen Gehalt an Eisen.

Erdhumus enthält jedoch außer Eisen noch andere wirksame Spurenelemente, von denen für stickstoffbindende Mikroorganismen vor allem das Molybdän in Frage kommt. Es schien deshalb geboten, Untersuchungen darüber anzustellen, ob auch *Nostocaceen* wie andere Stickstofffixierer durch Molybdän in ihrer Entwicklung gefördert werden, ob also auch bei diesen Organismen der Erdextrakt durch Molybdän ersetzt werden kann. Bejahendenfalls würde die allgemeine Bedeutung des Molybdäns für die biologische Stickstoffbindung und damit für die Fruchtbarkeit der Böden und Gewässer erneut unterstrichen. Denn *Nostocaceen* sind im Boden wie im Wasser weit verbreitet. Während ihre Beziehung zur Fruchtbarkeit des Bodens noch kaum untersucht worden ist — *Esmarch* (8) fand die Verbreitung der *Cyanophyceen* abhängig von Feuchtigkeit und Nährstoffmenge, *Gistl* (11) untersuchte den Einfluß der Anionen und *v. Schelhorn* (23) denjenigen der Reaktion —, gilt z. B. die Gattung *Aphanizomenon* geradezu als Leitform für besonders fruchtbare Fischteiche (32). Eine Bejahung der aufgeworfenen Frage würde ferner bedeuten, daß die *Nostocaceen* tatsächlich genau so wie etwa *Azotobacter* imstande sind, mit dem elementaren Stickstoff der Luft als einziger Stickstoffquelle zu leben, und daß nur deshalb die Stickstoffbindung teilweise nicht festgestellt werden konnte, weil den verwendeten Nährmedien Molybdän fehlte. Gleichzeitig mußte es sich erweisen, ob im Boden noch andere Algen außer den *Nostocaceen* bei Gegenwart von Molybdän stickstoffautotroph leben können. Eine besondere Anregung zur Untersuchung dieser Fragen lag in den Analysen von *Ter Meulen* (25, 26), die einen auffallend hohen Molybdängehalt anabaenahaltiger *Azolla*-Pflanzen aufwiesen und die dadurch schon andeuteten, daß Molybdän für diese Algen die gleiche Bedeutung haben könnte wie für stickstoffbindende Bakterien.

I. Nostocaceen aus Teichwasser.

Die Versuche, deren wesentlichste Ergebnisse schon 1938 in einem Vortrage (5) auszugsweise mitgeteilt werden konnten, erstreckten sich zunächst auf das Verhalten einiger aus einem Wasserbecken des Botanischen Gartens in Berlin-Dahlem gezüchteten *Nostoc*- und *Anabaena*-Arten. Diese Kulturen waren zwar artrein, aber nicht bakterienfrei und dienten nur zu einer ersten Orientierung. Sie wurden ebenso wie die später aus Erde gezüchteten und teilweise in absoluter Reinkultur untersuchten Formen in folgender Grundnährlösung kultiviert:

H_2O 1000; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1; CaCO_3 0,5; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,5; K_2SO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,3; NaCl 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,005.

Nach der Zugabe von Ferrosulfat und Calciumcarbonat zum Wasser wurde dieses bis zur vollständigen Fällung von braunem Eisenhydroxyd geschüttelt. Erst dann wurde die Nährlösung mit den übrigen Salzen vervollständigt. Die schon von *Maertens* (16) erwähnte Lebensnotwendigkeit des Calciums ist eine von jenen bemerkenswerten Eigenschaften, die in gleicher Weise sowohl die *Nostocaceen* als auch das stickstoffbindende Bakterium *Azotobacter* auszeichnen.

Als Kulturgefäße dienten für die Algen bei Verwendung flüssigen Nährmediums teils 100 ccm fassende Erlenmeyerkolben (für 20 ccm Nährlösung) aus Jenaer Geräteglas Nr. 20, teils Reagensröhrchen und bei Benutzung von Agarnährböden Petrischalen. Die später zu erwähnende *Azolla* wurde in der gleichen Nährlösung, aber meistens in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt, seltener in solchen von 100 oder 750 ccm Inhalt oder anderen Gefäßen aus demselben Jenaer Glas in entsprechenden Nährlösungsmengen kultiviert.

Immer standen die Kulturen im Gewächshaus im diffusen Tageslicht, das in den Wintermonaten¹ nachts durch künstliche Beleuchtung ergänzt wurde, bei Temperaturen von 22 bis 28° C.

Die Stickstoffanalysen wurden nach *Kjeldahl* und im Falle, daß die Nährlösungen Nitrat enthielten, nach *Förster* ausgeführt, in beiden Fällen unter Verwendung von *Wieningers* Reaktionsgemisch. Jedoch wurde das Ammoniak in borsäurehaltiges Wasser überdestilliert und mit $\frac{1}{50}$ n Schwefelsäure titriert.

In erster Linie sollten Molybdän und Vanadium in ihrer Wirkung auf *Anabaena* und *Nostoc* geprüft und mit Erdextraktasche verglichen werden, die durch Veraschen eines wässrigen Auszuges von Mistbeeteerde gewonnen worden war. Da nach Verimpfung der Algen in für stickstoffbindende Bakterien geeignete stickstofffreie Nährmedien im Dunkeln bei 29° C keine Bakterienentwicklung festgestellt werden konnte, die Kulturen also offenbar keine stickstoffbindenden Bakterien enthielten, wurde außerdem versucht, das Algenwachstum durch zusätzliche Beimpfung mit drei verschiedenen Stämmen von *Azotobacter chroococcum* und einem von *Azotobacter vinelandii* zu fördern. In einer weiteren Versuchsreihe kamen *Anabaena* und *Nostoc* in Mischkulturen zur Untersuchung. Diese wurden nach etwa 4 Wochen der Stickstoffanalyse unterworfen, die beiden anderen Reihen mit *Nostoc* und *Anabaena* in artreiner Kultur 12 Tage später. In den Tabellen I und II sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle I. Wirkung verschiedener Zusätze auf eine bakterienhaltige Mischkultur von *Anabaena spec.* + *Nostoc spec.*

4. März bis 1. April 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm
Ohne Zusatz	2,0
+ 0,000 01 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4,1
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,5
+ Erdextraktasche	5,5
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + <i>Azotobacter</i>	5,1

¹ Mit Ausnahme der Wintermonate 1939/40.

Tabelle II. Wirkung verschiedener Zusätze auf bakterienhaltige, artreine Kulturen von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.*

4. März bis 13. April 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 cem	
	<i>Anabaena spec.</i>	<i>Nostoc spec.</i>
Ohne Zusatz	3,4	2,0
+ 0,00001 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4,6	4,0
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6,9	5,2
+ Erdextraktasche	7,5	5,6
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + <i>Azotobacter</i> ...	7,0	5,6

Schon aus diesen Ergebnissen der ersten einleitenden Versuche konnte geschlossen werden, daß mit nicht stickstoffbindenden Bakterien verunreinigte *Nostoc*- und *Anabaena*-Arten tatsächlich Stickstoff binden und in dieser Eigenschaft durch die Gegenwart verschiedener *Azotobacter*-Arten nicht einmal eine Unterstützung erfahren, wohl aber in gleicher Weise wie diese Bakterien durch Molybdän und andere Wirkstoffe. Von diesen letzteren dürfte in Erdextraktasche nichts vorliegen, was die Stickstoffbindung der Algen wie die der Bakterien stärker fördert als Molybdän.

Weitere Versuche mit den beiden aus Teichwasser isolierten *Nostocaceen*-Kulturen haben diese Erkenntnisse immer wieder bestätigt. Nachdem die Algen erst einige Male in molybdänfreie Nährlösung übergeimpft und auf diese Weise selbst wahrscheinlich molybdänärmer geworden waren, trat die fördernde Wirkung des Molybdäns noch deutlicher in Erscheinung (Tabelle III und IV). Auch ließ sich bei Berücksichtigung der langsameren Entwicklung der Algen im Vergleich mit derjenigen der Bakterien nach einer entsprechend langen Kultivierungszeit ein Stickstoffgewinn erzielen, der dem bei *Azotobacter* erreichten schon nahe kommt. Die Stickstoffbindung der *Nostocaceen* ist also unter künstlichen Bedingungen bei Gegenwart von Molybdän ganz beachtlich und wird unter den natürlichen Verhältnissen des Bodens und Wassers vielleicht noch größer sein.

Tabelle III. Wirkung von Vanadium, Molybdän und Erdextraktasche auf bakterienhaltige, artreine Kulturen von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.*

3. April bis 3. Mai 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 cem			
	<i>Anabaena spec.</i>		<i>Nostoc spec.</i>	
Ohne Zusatz	2,0	2,4	1,4	1,5
+ 0,00001 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4,5	4,5	2,9	2,9
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8,1	8,5	5,7	6,4
+ Erdextraktasche	7,8	7,3	5,9	5,9

Tabelle IV. Wirkung des Molybdäns auf eine bakterienhaltige, artreine Kultur von *Anabaena spec.*

7. Mai bis 21. Juli 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 cem	
Ohne Zusatz	4,0	5,5
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21,0	21,5

Schon rein äußerlich lassen sich in Abb. 1 die molybdänsfreien Kulturen des Versuchs der Tabelle IV als kümmerlich entwickelte, chlorotische Stickstoff-Hungerkulturen von den dunkel blaugrün gefärbten, kräftig entwickelten molybdänhaltigen Kulturen unterscheiden.

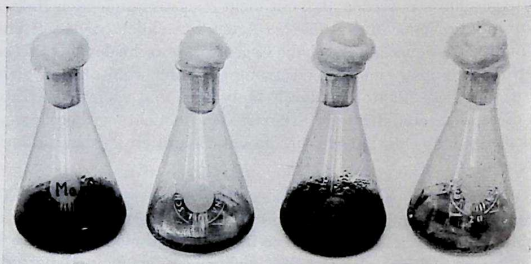


Abb. 1. Fördernder Einfluß des Molybdäns auf die Entwicklung von *Anabaena spec.* in stickstofffreier Nährlösung. 7. Mai bis 21. Juli 1937.

Der Versuch, eine *Aphanizomenon*-Art aus dem Wasser eines Fischteiches in Kultur zu nehmen, scheiterte. In der angegebenen synthetischen Nährlösung fand weder mit noch ohne Zugabe von Molybdat oder Nitrat Vermehrung statt. Die Alge scheint besondere Ansprüche zu stellen, die noch nicht bekannt sind¹.

II. Nostocaceen aus Ackerböden.

Nach diesen einleitenden Versuchen mit aus Wasser gezüchteten Algen wurde die eigentliche Aufgabe der Isolierung und Untersuchung bodenbewohnender stickstoffbindender Algen begonnen. Dazu standen sechs verschiedene Ackerböden² zur Verfügung, die durch die Angaben in Tabelle V kurz charakterisiert sind.

¹ Darauf wurde ich schon von Herrn Prof. Dr. Wunder, Breslau, aufmerksam gemacht, dem ich hierfür sowie für freundliche Zusendung des sichelalgenhaltigen Teichwassers bestens danken möchte.

² Den Einsendern der von außerhalb Berlins bezogenen Böden spreche ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

Tabelle V. Beschreibung der Versuchsböden.

Bezeichnung	Herkunft	pH	mg N in 5 g Erde			Physikalische Beschaffenheit	Frucht- barkeit
St	Stade	6,1	3,3	3,5		schwach anmooriger Geestsand	sehr gering
D	Berlin-Dahlem	7,0	2,4	2,7		humusarmer sandi- ger Lehm	mittel- mäßig
Gö	Göttingen	7,6	6,9	7,0		humusarmer Lehm	groß
R	Rosdorf bei Göttingen	7,2	8,6	9,0		humusreicher Lehm	groß
O	Gr. Ottersleben am Harz	7,5	9,9	10,6		humusreicher Lehm (Schwarzerde)	sehr groß
Gu	Guhrau i. Schlesien	8,0	7,2	7,3		humusreicher san- diger Lehm (Schwarzerde)	sehr groß

Diese Böden wurden volumenmäßig mit sterilem Leitungswasser im Verhältnis 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 und 1 : 1000000 verdünnt, und zwar kamen zunächst 12 cm auf 1 mm gesiebter und in das Meßgefäß fest eingepreßter, naturfeuchter Erde mit einem Wassergehalt von etwa 50 % des Fassungsvermögens in 1188 cm steriles Leitungswasser. Nach längerem, kräftigem Schütteln wurden hiervon 10 cm in 90 cm steriles Leitungswasser übertragen usf. bis zur Verdünnung von 1 : 1000000. Von jeder dieser 5 Verdünnungen wurde dann jeweils in fünffacher Wiederholung 1 cm in mit Wattestopfen verschlossene Reagensröhrchen mit 5 cm Nährlösung verimpft. Da aus den Böden nicht nur molybdänbedürftige, stickstoffbindende, sondern zum Vergleich auch andere, *grüne* und *blaugrüne Algen* sowie *Diatomeen* angereichert werden sollten, waren der Grundnährlösung außer 0,0005 % Natriummolybdat noch 0,05 % Kieselsäurehydrat und zur Hälfte auch 0,1 % Calciumnitrat zugesetzt worden. Die so beimpften Röhrchen lagen vom 7. Oktober bis 1. November 1937 im Gewächshaus auf einem Lattengerüst in schräger Stellung, so daß die Nährlösung eine größere Oberfläche bildete und besser durchlüftet wurde. Algenkulturen in Reagensröhrchen wurden stets in dieser schrägen Lage angezogen.

Am 1. November 1937 waren die Nährlösungen mehr oder weniger stark mit Algen bewachsen und wurden deshalb zunächst makroskopisch miteinander verglichen. Der Befund ist in Abb. 2 niedergelegt.

Auf der Ordinate sind die Verdünnungen I, II, III, IV entsprechend 1 : 100 bis 1 : 100000 und für jede Verdünnung außerdem die 5 Röhrchen aufgetragen. Auf der Abszisse finden sich die Böden hintereinander gereiht. Die Säulen geben dann ungefähr die quantitative Verteilung der 4 Algengruppen wieder. Die Angaben über *Diatomeen* sind allerdings sehr ungenau, da diese sicher häufig von *Grünalgen* und *Blualgen* überwuchert und darum nicht zu erkennen waren.

Da Zahl und Art der Algen eines Bodens noch von vielen anderen Faktoren abhängig sind, wie z. B. die Untersuchungen von *Esmarch* (8),

v. Schelhorn (23) und Gistl (11) lehren, ist es nicht verwunderlich, daß in Abb. 2 keine klare Beziehung zwischen der Fruchtbarkeit eines Bodens und seiner Algenflora zum Ausdruck kommt. Immerhin haben sich zwei Tatsachen ganz deutlich herausgestellt: In dem unfruchtbarsten der sechs untersuchten Böden wurden keine *Nostocaceen* aufgefunden, und diese sind aus den anderen Böden nur in der stickstofffreien Nährlösung angewachsen, jedenfalls bei Beginn der Versuchszeit. Es ist also

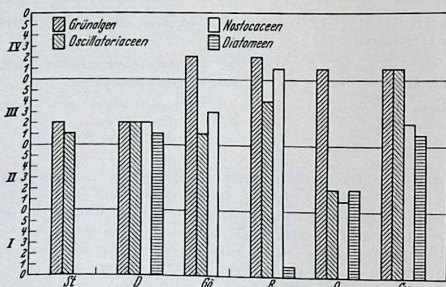


Abb. 2. Gehalt der Versuchsböden an verschiedenen Algengruppen.

wohl hieraus zu schließen, daß diese *Nostocaceen* irgendwie den Luftstickstoff auszunutzen imstande sind und ähnlich wie *Azotobacter* in fruchtbareren Böden zahlreicher vorkommen als in weniger fruchtbaren. Die ebenfalls blaugrünen *Oscillatoriaceen* wurden dagegen nur in der stickstoffhaltigen Nährlösung angetroffen. Sie sind ebenso wie die *Grünalgen* nach Überimpfung in stickstofffreie Nährlösung nicht angewachsen, sondern nur in stickstoffhaltiger Nährlösung. Damit findet eine Beobachtung ihre Bestätigung, die u. a. schon *Beijerinck* (4) angestellt hat, der in stickstofffreier Nährlösung auch nur *Nostocaceen* anreichern konnte.

Da also die bodenbewohnenden *Nostocaceen* auf Grund aller bisherigen Beobachtungen höchstwahrscheinlich selbst Stickstoff binden und sich demzufolge ähnlich verhalten wie *Azotobacter*, mußte ein Vergleich des *Nostocaceen*-Gehalts mit dem *Azotobacter*-Gehalt der verschiedenen Böden besonders aufschlußreich sein.

Die *Azotobacter*-Zahl wurde nach der *Winogradsky*schen Erdplattenmethode ermittelt. Zu einer Mischung von 30 g auf 1 mm gesiebter und sterilisierter Felderde, 1,5 g löslicher Stärke und 0,3 g Calciumcarbonat wurden 6,5 cm Flüssigkeit gegeben, bestehend aus 1 cm Bodenaufschwemmung und 5,5 cm folgender Nährlösung: H_2O 100, K_2HPO_4 0,1,

MgSO₄ · 7 H₂O 0,05, Na₂MoO₄ · 2 H₂O 0,023. Die Bodenaufschwemmung bestand aus 1 cem der zu untersuchenden auf 1 mm gesiebten, naturfeuchten Erde (Wassergehalt etwa 50 % des Fassungsvermögens) und 100 cem, im Falle der an *Azotobacter* verhältnismäßig armen Böden St und D 10 cem Wasser. Das Ganze wurde dann nach gründlichem Durchkneten in Petrischalen eingedrückt, oberflächlich glattgestrichen und in feuchter Kammer bei 28° C aufbewahrt.

Tabelle VI. *Azotobacter*-Gehalt der Versuchsböden.
12. bis 16. November 1937.

Verdünnung : Boden :	1 : 10		1 : 100			
	St	D	Go	R	O	Gu
Zahl der Kolonien auf einer Platte	0	15	3	1	1	25
	1	17	3	4	1	28
	1	18	3	7	2	37
	1	23	4	8	5	39
Summe:	3	73	13	20	9	129
Mittel:	0,8	18,3	3,3	5,0	2,3	32,3

Nach vier Tagen wurden die auf der Oberfläche der Platten gewachsenen *Azotobacter*-Kolonien gezählt. Aus dem in Tabelle VI aufgeführten Ergebnis ist eine gewisse Ähnlichkeit des *Azotobacter*-Gehalts mit dem *Nostocaceen*-Gehalt der verschiedenen Böden zu entnehmen. Vor allem enthält der magere Geestboden St nicht nur keine stickstoffbindenden Algen, sondern auch kaum *Azotobacter*, und der verhältnismäßig geringen Zahl von *Nostocaceen* wie auch anderer Algen in dem stickstoffreichsten Boden O entspricht auch eine verhältnismäßig kleine *Azotobacter*-Zahl. Bei weitem am meisten *Azotobacter* enthielt die Guhrauer Schwarzerde. Sie war aber auch am ausgiebigsten in der *Nostocaceen*-Anreicherung, was allerdings aus der ziemlich rohen und nur summarisch quantitativen Betrachtungsweise der Abb. 2 nicht hervorgeht. Nachdem aber die Anreicherungskulturen mikroskopisch durchgemustert worden waren, zeigte es sich doch, daß der Boden Gu die artenreichste *Nostocaceen*-Flora enthielt (siehe Tabelle VII, S. 165).

Um artreine Kulturen zu erhalten, wurden mit der Platinöse kleine Mengen der an der Röhrchenwandung in stickstofffreier Nährlösung angewachsenen blaugrünen Kolonien auf 2 %igen Agar von der Zusammensetzung der Grundnährlösung mit 0,001 % Natriummolybdat in Petrischalen übertragen. Vom Rand der sich hieraus entwickelnden Kolonien wurde abermals eine kleine Menge auf frischen Agarnährboden übergeimpft. Dieses auch schon von anderen benutzte Verfahren führte nach mehrmaliger Wiederholung zu artreinen und bakterienarmen Kulturen, die, wieder in Nährlösung in Röhrchen übertragen und hier gut angewachsen, zur Gewinnung absoluter Reinkulturen Verwendung fanden.

Die vollständige Reinzüchtung gelang bei einem Teil der Algen nach dem Verfahren von Allison und Mitarbeitern (3) durch Bestrahlung mit

ultravioletttem Licht in verhältnismäßig kurzer Zeit. Etwa eine Impföse voll des kräftig entwickelten Thallus einer Röhrenkultur wurde nach Übertragung in etwa 2 cm sterilen Leitungswassers im Quarzröhrchen und nach Zerkleinerung des Thallusstückchens durch kräftiges Schütteln der Bestrahlung ausgesetzt. Die Entfernung des fast horizontal liegenden Röhrchens vom Brenner einer Hanauer Analysenlampe betrug 20 cm, die Bestrahlungsdauer bei fortwährender kräftiger Ventilation und mehrfachem Umschütteln je nach Empfindlichkeit der Alge 8 bis 12 Minuten. Danach wurde möglichst wenig der bestrahlten Kultur in frische sterile Nährlösung übertragen. War die Abimpfung angewachsen, dann erfolgte die Untersuchung auf Reinheit, die nur bei einem Teil der Algenkulturen erreicht werden konnte. Zu den nicht völlig von Bakterien befreiten Kulturen zählten vor allem die in stark schleimigen Lagern wachsenden *Nostoc*-Arten. Vielleicht würde die Reinzucht nach mehrfacher Wiederholung der Bestrahlung auch bei diesen gelungen sein. Jedoch scheint das nicht erforderlich, da nicht angenommen werden konnte, daß sich diese Algen in Reinkultur hinsichtlich Stickstoffbindung und Molybdänbedürftigkeit anders verhalten würden. Im übrigen wurden in diesen Kulturen keine stickstoffbindenden Bakterien nachgewiesen, sondern *Bact. prodigiosum* und andere stickstoffheterotrophe Arten. Die Algen wurden als bakterienfrei angesehen, wenn sich in Bouillon nach kräftiger Beimpfung auch nach 1 bis 2 Wochen bei 26° C keine Bakterien entwickelten und im mit wässrigem Methylenblau gefärbten Ausstrich bei etwa 1300facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopisch keine Bakterien nachgewiesen werden konnten. In einigen dieser so rein gezüchteten Kulturen wurde später erneut bakterielle Spontaninfektion festgestellt.

Bei jeder Überimpfung, die etwa alle vier Wochen ausgeführt werden mußte, wurde jede Kultur sowohl in Nährlösung ohne Molybdänzusatz als auch in molybdänhaltige Nährlösung geimpft. Für Versuchszwecke kamen aber nur die jeweils jüngsten Kulturen in Nährlösung ohne Molybdänzusatz zur Verwendung, weil diese an Molybdän verarmte Algen enthielten, die bei Prüfung auf Molybdänbedürftigkeit deutlicher ansprachen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung und systematischen Einordnung nach *Geitler* und *Pascher* (10) ergab sich zunächst die Tatsache, daß nur drei Gattungen der *Nostocaceen* vertreten waren, nämlich *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum*. Da auch *Beijerinck* (4) sowie *Allison* und Mitarbeiter (3), wie schon erwähnt wurde, nur Vertreter dieser drei Gattungen aus Erde anreichern konnten, ist es unwahrscheinlich, daß noch Arten anderer als der aufgeführten Gattungen als Stickstofffixierer im Boden tätig sind.

Die nähere Bestimmung gestaltete sich im übrigen sehr schwierig, worauf auch *Geitler* und *Pascher* (10) in ihrem Buch selbst hinweisen. In vielen Fällen war es schon nicht leicht zu entscheiden, ob es sich um eine *Nostoc*- oder *Anabaena*-Art handelte. Deshalb wurde durchgehend jede Form, deren Trichome nicht deutlich in eine mehr oder weniger dicke Schleimhülle eingebettet waren, oder die nicht in mikroskopisch oder makroskopisch schleimigen, sondern in häutigen Lagern wuchs, zur Gattung *Anabaena* gestellt. Wenn hier schon bei Bestimmung der

Gattungszugehörigkeit die Schwierigkeiten zuweilen groß waren, so erschienen sie fast unüberwindlich bei Bestimmung der Art. Obwohl keine der isolierten Formen mit einer der beschriebenen Arten in jeder Beziehung vollständig übereinstimmte, habe ich mich doch nicht entschließen können, sie mit neuen Namen zu belegen, abgesehen von der einen Kultur O 3. Vielmehr haben sie die Bezeichnung derjenigen bekannten Art erhalten, der sie am nächsten stehen. Man wird auch wohl nicht fehlgehen in der Annahme, daß es sich in den meisten Fällen tatsächlich nur um Varianten dieser bekannten Arten handelt.

Im Rahmen des untersuchten Problems war es außerdem nicht so wichtig, über die Artzugehörigkeit der isolierten Kulturen endgültig zu entscheiden. Es würde sich aber lohnen, an umfangreicherem Material aus verschiedenen Böden eine genaue Bestimmung der Arten vorzunehmen und Vergleiche anzustellen zwischen Fruchtbarkeit, Molybdängehalt, *Azotobacter*- und *Nostocaceen*-Zahl verschiedener Böden, um so die Standortverhältnisse dieser so wichtigen Mikroorganismen weiter zu klären. Immerhin hat sich bei der vergleichenden morphologischen Untersuchung der insgesamt 38 isolierten Kulturen schon gezeigt, wie aus Tabelle VII zu entnehmen ist, daß der an *Azotobacter* reichste, sehr

Tabelle VII.

Die aus den Versuchsböden isolierten *Nostocaceen*-Arten.

Boden	Nr. der Kultur	Wahrscheinliche Artzugehörigkeit der Kultur
St	—	—
D	1	<i>Nostoc calcicola</i> Bréb.
D	2—5	„ <i>punctiforme</i> (Kütz.) Hariot.
D	6—7	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.
D	8	<i>Cylindrospermum maius</i> Kütz.
Gö	1	<i>Nostoc paludosum</i> Kütz.
Gö	2	„ <i>punctiforme</i> (Kütz.) Hariot.
Gö	3	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.
Gö	4	<i>Cylindrospermum licheniforme</i> (Bory) Kütz.
R	1—2	<i>Nostoc punctiforme</i> (Kütz.) Hariot.
R	3—4	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.
R	5	<i>Cylindrospermum maius</i> Kütz.
O	1—2	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.
O	3	„ <i>humicola</i> nov. spec.
O	4	<i>Cylindrospermum licheniforme</i> (Bory) Kütz.
Gu	1	<i>Nostoc muscorum</i> Kütz.
Gu	2—6	„ <i>punctiforme</i> (Kütz.) Hariot.
Gu	7—12	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.
Gu	13	„ <i>cylindrica</i> Lemm.
Gu	14	„ <i>torulosa</i> (Carm.) Lagerh.
Gu	15	„ <i>oscillarioides</i> Bory.
Gu	16	„ <i>Hallensis</i> (Jancz.) Born. et Flah.
Gu	17	<i>Cylindrospermum maius</i> Kütz.

fruchtbare Boden Gu auch am meisten großzellige, typische *Anabaena*-Arten enthielt. Von allen *Nostocaceen* scheinen demnach diese in ihren Ernährungsansprüchen dem in vieler Beziehung nahe verwandten *Azotobacter* am ähnlichsten zu sein.

Möglicherweise werden noch einige andere Arten in den Kulturen angewachsen sein, die nicht untersucht und bestimmt wurden. Dadurch dürfte aber das Gesamtbild kaum eine wesentliche Veränderung erfahren haben. Auffallend ist, daß in allen Böden nur wenig typische, auch in der Nährlösung in einzelnen großen, schleimigen Lagern wachsende *Nostoc*-Arten, dafür aber um so mehr *Nostoc* oder *Anabaena*

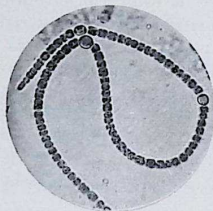


Abb. 3. *Anabaena humicola* nov. spec. in molybdänhaltiger, stickstofffreier Grundnährlösung, lebend, ungefärbt. Vergr. 380 mal.

aus den Formenkreisen *Nostoc punctiforme* und *Anabaena variabilis* aufgefunden wurden. Die weitaus meisten Isolierungen aus allen Böden stellten solche Formen dar. Außer *Anabaena variabilis* konnten besonders typische, großzellige *Anabaena*-Arten nur in den beiden sehr fruchtbaren Schwarzerden nachgewiesen werden, und zwar eine Form, die in keiner Weise mit den bisher beschriebenen Arten vergleichbar zu sein schien aus dem Boden O und mehrere andere aus dem Boden Gu. Geüllers und Paschers (10) Ansicht von der Artenarmut erdbewohnender Anabaenen — „auf

feuchter Erde leben nur wenige (*A. variabilis*, *A. gelatinicola*)“ — ist jedenfalls für besonders fruchtbare Schwarzerden in diesem Umfang nicht aufrechtzuerhalten.

Für die neue, in Abb. 3 dargestellte *Anabaena*-Art wird folgende kurze Diagnose gegeben:

Trichome gerade, ohne sichtbare Schleimhülle, parallel in blaugrünen Strängen wachsend.

Vegetative Zellen, 4,5 μ dick, 2,5 bis 4,5 μ lang.

Heterocysten, 5,5 bis 6,5 μ dick, 5,5 bis 7,5 μ lang.

Dauerzellen nicht erkennbar.

Die Gattung *Cylindrospermum* ist offenbar mit einigen wenigen Arten in jedem einigermaßen fruchtbaren Boden vertreten.

Mit je einer nicht näher untersuchten und auch noch bakterienhaltigen *Nostoc*- und *Anabaena*-Art aus der Guhrauer Schwarzerde wurde der erste Stickstoffbindungsversuch durchgeführt. Es sollte vor allem geprüft werden, ob eine aus diesem sehr fruchtbaren und den stickstoffbindenden Bakterien und *Nostocaceen* offenbar auch sehr zusagenden Boden gewonnene Erdextraktasche das Molybdän in seiner fördernden Wirkung vielleicht noch übertreffen würde. Die Analysen-

werte der Tabelle VIII lehren das Gegenteil. Es gibt anscheinend keinen Aschenbestandteil der Erde, der in der benutzten synthetischen Nährlösung die Entwicklung und Stickstoffbindung der blaugrünen Algen aus den drei erwähnten Gattungen stärker begünstigen könnte als Molybdän.

Tabelle VIII. Wirkung von Erdextraktasche und Molybdän auf eine bakterienhaltige, artreine Kultur von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.* aus Boden Gu.

2. September bis 9. Oktober 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm			
	<i>Anabaena spec.</i>		<i>Nostoc spec.</i>	
Ohne Zusatz	2,8	3,5	2,8	3,5
+ Erdextraktasche Gu	3,8	3,9	3,9	4,1
+ 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,0	9,7	8,5	9,2

Trotzdem wurde auch an den aus Erde isolierten Algen nochmals untersucht, ob nicht vielleicht Vanadium die Stickstoffbindung stärker fördert als Molybdän. An der mehr oder weniger dunklen Färbung der in Abb. 4 dargestellten drei Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum* ist zu erkennen, daß ihre Entwicklung vor allem durch Molybdän gefördert worden ist. Vanadium ist teilweise sogar von schwach hemmendem Einfluß gewesen. Nur einige Kulturen, darunter D 1 (*N. calcicola*), Gö 1 (*N. paludosum*) und D 8 (*C. maius*), haben auch auf die Vanadiumgabe mit etwas stärkerer Entwicklung gegenüber der Kontrolle angesprochen.

Im übrigen ist aus der Abbildung kein Unterschied im Verhalten der bakterienhaltigen und der absolut reinen Kulturen zu ersehen. Damit ist zur Genüge bewiesen, daß die Begleitbakterien, deren Unfähigkeit zur Stickstoffbindung in zuckerhaltiger Nährlösung schon vor der Reinzüchtung der Algen nachgewiesen werden konnte, auch symbiontisch an der Stickstoffbindung der *Nostocaceen* nicht beteiligt sind.

Schon im Verlauf dieses Versuchs war eine geringere Entwicklungsfreudigkeit auch in den molybdänhaltigen Nährlösungen im Vergleich mit früheren Kulturen aufgefallen, und zwar verhielten sich hierin ebenfalls die bakterienfreien Kulturen nicht anders als die bakterienhaltigen. Deshalb wurde die Nährlösung abermals verschiedentlich abgeändert, um auf diese Weise vielleicht doch noch ein Nährmedium zu finden, das dem natürlichen Standort mehr entsprach. Zunächst wurde in Anlehnung an die mit *Azotobacter* gesammelten Erfahrungen (6) ein Zusatz von Wolframat, Silikat oder Agar zur Nährlösung in seiner Wirkung auf die Entwicklung der Algen geprüft. Agar, zusätzlich zu Molybdän gegeben, hatte die Stickstoffbindung von *Azotobacter* besonders

dann gefördert, wenn die Bakterien unter dem Einfluß ungünstiger Wetterverhältnisse standen. Solche Wettereinflüsse konnten auch bei den Algen vorliegen. Jedoch blieb den Versuchen, die sich von November 1938 bis Mai 1939 hinzogen, diesmal der Erfolg versagt. Schließlich wurden den Nährlösungen auch noch eine Spur Jodkalium und 10 % unversaschter Erdextrakt zugefügt. Aber auch das änderte nichts.

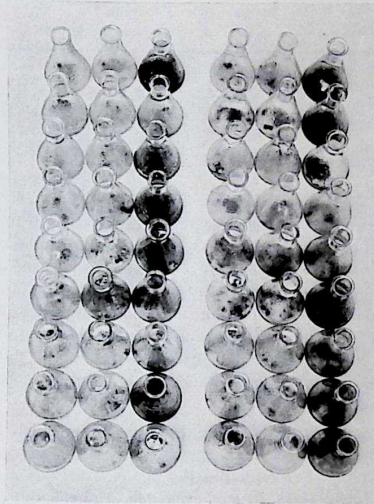


Abb. 4. Fördernder Einfluß des Molybdäns auf absolut reine und bakterienhaltige Kulturen der Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylandrosprium*.

Reihenfolge der Arten in zwei Säulen von oben nach unten:

Gu 10, rein (<i>A. variabilis</i>),	Gu 2, rein (<i>N. punctiforme</i>),
Gu 12 (<i>A. variabilis</i>),	R 2, rein (<i>N. punctiforme</i>),
O 3, rein (<i>A. humicola</i>),	Gu 16 (<i>A. Hallensis</i>),
O 2, rein (<i>A. variabilis</i>),	Gö 1, rein (<i>N. paludosum</i>),
D 2 (<i>N. punctiforme</i>),	D 8, rein (<i>C. maius</i>),
D 1 (<i>N. calcicola</i>),	Gu 6 (<i>N. punctiforme</i>),
D 6, rein (<i>A. variabilis</i>),	O 4, rein (<i>C. licheniforme</i>),
R 1 (<i>N. punctiforme</i>),	Gu 13, rein (<i>A. cylindrica</i>),
Gö 4, rein (<i>C. licheniforme</i>),	O 1, rein (<i>A. variabilis</i>).

Jeweils von links nach rechts: Ohne Zusatz, + V, + Mo. 7. Oktober bis 7. November 1938.

Etwas besser entwickelten sich die Algen wieder, nachdem die Kulturen nicht mehr wie bisher in Nährlösung ohne Molybdatzusatz fortgezüchtet wurden, sondern in diese Reihe Ende Mai 1939 Nährlösung mit 0,001 % Natriummolybdat eingeschaltet wurde. Schon die Ab-

impfungen hiervon in abermals molybdänhaltige Lösung wuchsen etwas kräftiger als entsprechende Kulturen, die aus molybdänfreier Lösung beimpft worden waren. Die ausschließliche Züchtung der Stammkulturen in molybdänhaltiger Nährlösung hatte allerdings den Nachteil, daß die für die Versuche benutzten Ausgangskulturen kein molybdänarmes Impfmateriel lieferten. Das ist an dem verhältnismäßig hohen Stickstoffgewinn in den Kontroll-Nährlösungen des folgenden Versuchs in Tabelle IX zu erkennen der die Frage beantworten sollte, ob unveraschter Erdextrakt, neben Molybdat verabreicht, die Stickstoffbindung etwa noch weiter fördern würde.

Tabelle IX. Wirkung von Molybdän und Erdextrakt auf *Nostocaceen*.
10. Juni bis 9. August 1939.

Grundnährlösung	mg N in 100 cem							
	D 4 (<i>N. calcicola</i>)		Gu 10 (<i>A. variabilis</i>) rein		Gu 14 (<i>A. torulosa</i>) rein		D 8 (<i>C. maius</i>) rein	
Ohne Zusatz	10,9	12,0	8,3	8,5	10,5	9,9	8,3	9,0
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	15,0	15,0	11,9	12,5	14,7	21,6*	9,9	12,0
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + Erdextrakt	15,7	16,2	13,6	14,1	13,7	14,8	10,4	10,8

* Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Erdextrakt selbst etwas Stickstoff enthält, muß aus den Analysen gefolgert werden, daß er die eindeutig fördernde Wirkung des Molybdäns nicht zu steigern vermag. Im ganzen gesehen, wurde auch in dieser verhältnismäßig langen Versuchszeit von 8 Wochen wenig Stickstoff gebunden¹. Da außerdem die Kontrollkulturen ohne Molybdänzusatz verhältnismäßig viel Stickstoff gebunden hatten, also wahrscheinlich mit den eingeimpften Algen aus molybdänhaltiger Kultur auch reichliche Mengen dieses Spurenelements übernommen worden waren, wurden die Stammkulturen künftig wieder in der unveränderten Grundnährlösung gezogen.

Wenn das Nachlassen in der Entwicklungsfreudigkeit der Algen, die im Sommer 1939 wieder etwas größer war, überhaupt allein auf eine Schwächung der Stickstoffbindung zurückzuführen war, dann hätte sich dieser Mangel durch eine geringe Gabe gebundenen Stickstoffs ausgleichen lassen müssen. In einem Versuch mit sieben verschiedenen Arten wurde diese Frage nochmals geprüft. Es ergab sich aber, daß sie alle durch die Nitratgabe ebenso wenig wie durch Erdextrakt in ihrer Entwicklung über das von Molybdän allein schon bewirkte Maß hinaus

¹ Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

gefördert wurden. Die Stickstoffwerte in Tabelle X liegen in den anfangs nitrathaltigen Lösungen durchschnittlich nicht höher als in den ursprünglich stickstofffreien, molybdänhaltigen Lösungen. Die seit Ende 1938 beobachtete Depression im Algenwachstum konnte also nicht durch Stickstoffmangel hervorgerufen sein.

Tabelle X. Wirkung von Molybdän, Erdextrakt und Nitrastickstoff auf *Nostocaceen*.

15. August bis 15. September 1939.

Bezeichnung der Algenkulturen	mg N in 100 ccm der Nährlösung							
	ohne Zusatz		+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Erdextrakt		+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,04 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	
D 1 (<i>N. calcicola</i>)	4,9	4,8	7,7	7,8	7,3	7,8	7,0	7,1
R 1 (<i>N. punctiforme</i>) . .	3,9	3,8	6,9	7,1	8,4	8,3	7,4	6,7
D 6 (<i>A. variabilis</i>) rein .	3,1	3,4	5,3	5,5	6,6	7,1	6,2	7,0
Gu 6 (<i>N. punctiforme</i>) .	6,3	5,3	7,8	8,1	7,6	6,7	6,9	7,1
Gu 16 (<i>A. Hallensis</i>) rein	4,5	5,0	7,3	7,6	7,0	7,3	5,2	7,4
O 3 (<i>A. humicola</i>) rein .	5,2	6,8	8,4	8,5	8,5	9,1	7,6	8,3
D 8 (<i>C. maius</i>) rein . . .	4,9	5,3	6,9	6,9	6,4	8,3	6,3	7,4

Das Nächstliegende, was danach noch als Ursache in Frage kam, war eine mangelhafte Kohlenstoffversorgung. Zwar mochte ungünstiges Wetter mitgewirkt haben, aber das konnte nicht die alleinige Ursache

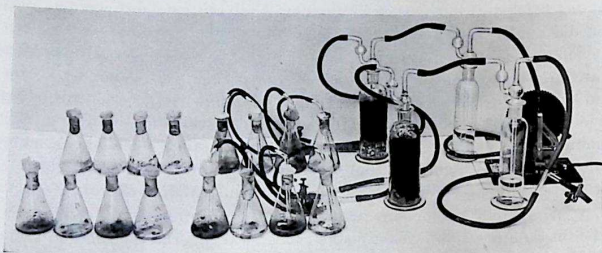


Abb. 5. Fördernder Einfluß einer Durchgasung mit Bodenluft auf O 3 (*A. humicola*) rein, hintere Reihe, und Gu 6 (*N. punctiforme*), vordere Reihe.

Von links nach rechts abwechselnd + und — Mo. 4. Oktober bis 1. November 1939.

sein. Allison und Mitarbeiter (2) haben schon den fördernden Einfluß einer Durchlüftung auf die Algenkulturen festgestellt. So war die Möglichkeit gegeben, daß im vorliegenden Falle vielleicht die Kohlensäure-Assimilation, vielleicht aber auch die Sauerstoff-Versorgung der Algen infolge mangelhafter Lüftung gehemmt war.

Um die künstliche Lüftung der Algenkulturen den natürlichen Standortbedingungen möglichst anzupassen, wurde die Luft von einer Kleinmotorpumpe zuerst durch eine Waschflasche mit Wasser, dann durch eine solche mit Mistbeeterde und anschließend durch sterile Wattefilter in die Nährlösungen der Kulturkölbchen gedrückt, wie aus Abb. 5 zu entnehmen ist. Schon nach 10 Tagen entwickelten sich die auf diese Weise gelüfteten Kulturen deutlich besser als die nicht mit Bodenluft durchgasten Vergleichskulturen, insbesondere wurde die fördernde Wirkung des Molybdäns durch die Lüftung noch verstärkt. Dieser aus dem äußeren Erscheinungsbild der Kulturen abgeleitete Befund konnte durch die in Tabelle XI beigefügten Stickstoffanalysen bestätigt werden, obwohl die Unterschiede zwischen den Parallelkulturen teilweise sehr groß sind.

Tabelle XI. Einfluß einer Durchgasung mit Bodenluft auf *Nostocaceen*.

4. Oktober bis 1. November 1939.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm			
	Gu 7 (<i>N. punctiforme</i>)		O 3 (<i>A. humicola</i>) rein	
Ohne Zusatz	2,9	3,8	2,4	2,4
+ 0.001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6,3	5,5	4,2	4,9
Ohne Zusatz, gelüftet	2,5	2,8	2,5	2,7
+ 0.001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, gelüftet	12,0	8,8	9,7	8,8

Da Allison und Mitarbeiter (2) schon festgestellt hatten, daß ihre *Nostocaceen* am besten gediehen, wenn sie mit einer an Kohlensäure etwas reicheren Luft versorgt wurden, so war auch im Falle des hier erwähnten Versuchs anzunehmen, daß die Bodenluft wegen ihres erhöhten Kohlensäuregehalts den Algen besonders zugesagt hatte. Um diese Frage zu beantworten, wurde am 18. November 1939 ein weiterer Versuch mit *A. humicola* in Reinkultur ausgeführt, wobei ein Gemisch von etwa 1 Teil gewaschener aus Marmor und Salzsäure dargestellter Kohlensäure und etwa 20 Teilen Luft¹ die Erlenmeyerkölbchen durchströmte.

Am 7. Dezember wurde die Durchlüftung eingestellt, da bis zu diesem Tage eine deutliche Hemmung der mit dem Gasgemisch versorgten Kulturen im Vergleich mit den nicht gelüfteten festgestellt wurde. In den gelüfteten molybdänsfreien Lösungen war die Alge sogar völlig verschwunden. Der Kohlensäuregehalt der Luft war offensichtlich zu hoch gewesen und hatte auf die molybdänsfreien Kulturen tödlich ge-

¹ Diese Mischung hat Pirson (21) mit bestem Erfolg bei seinen Untersuchungen an *Chlorella* verwandt.

wirkt. Bezeichnenderweise war diese Wirkung durch Molybdän so weit abgeschwächt worden, daß die eingepfropften Algen wenigstens am Leben blieben und sich sogar noch etwas vermehren konnten. Da Molybdän die Assimilation des Luftstickstoffs fördert, vermochte es wahrscheinlich durch Beschleunigung der Eiweißsynthese, also Bindung des großen Kohlenstoffüberschusses, die Kohlensäurevergiftung zu verhindern.

Klarer war diese Eigenschaft des Molybdäns in der Folgezeit zu erkennen, als die Kulturen keine zusätzliche Kohlensäure mehr erhielten, die Nährlösungen in den gelüfteten Kölbchen aber mit diesem Gas noch angereichert waren. Jetzt entwickelte sich hier die Alge in den molybdänhaltigen Lösungen sehr viel kräftiger als in den entsprechenden ehemals ungelüfteten Kölbchen. Nur in den durchgasten Lösungen ohne Molybdänzusatz blieb jede Entwicklung aus, da, wie bereits erwähnt, die eingepfropften Algen unter dem zu hohen Kohlensäuredruck abgestorben waren. Am 3. Januar 1940 wurden die Kulturen folgendermaßen begutachtet (Tabelle XII):

Tabelle XII. Einfluß einer Durchgasung mit kohlensäurereicher Luft auf *Anabaena humicola*.

18. November 1939 bis 3. Januar 1940.

Grundnährlösung	Algenwachstum	Grundnährlösung	Algenwachstum
Nicht gelüftet	×	Gelüftet	0
„ „ + Mo	××	„ + Mo	×××

0 = Lösungen algengfrei, × = sehr schwach, chlorotisch, ×× = schwach, blaugrün, ××× = sehr stark, dunkel blaugrün.

Wenn die Kulturen also überhaupt durch kohlensäurereiche Luft gefördert werden sollen, dann darf der Kohlensäuredruck auf keinen Fall sehr weit über dem durchschnittlichen Wert der atmosphärischen Luft liegen. Allison, Hoover und Morris (2) haben als günstigstes Gemisch eine Luft mit 1 % Kohlensäure verwendet. Demnach liegt die optimale

Tabelle XIII. Einfluß einer Belüftung mit Gewächshausluft und mit Bodenluft auf *Anabaena torulosa*.

17. Januar bis 16. Februar 1940.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm	
Ohne Zusatz	3,9	4,1
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,0	6,2
Ohne Zusatz, belüftet mit Gewächshausluft	4,6	5,9*
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, belüftet mit Gewächshausluft	11,1	11,2
Ohne Zusatz, belüftet mit Bodenluft	3,8	4,3
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, belüftet mit Bodenluft	11,3	12,9

* In diesen Kolben war infolge Störung der Pumpe verunreinigtes Wasser eingedrungen

Kohlensäurekonzentration für *Nostocaceen* niedriger als für die Grünalge *Chlorella* (21). Ein Versuch mit der Alge Gu 14 (*Anabaena torulosa*) zeigte dementsprechend, daß die Luft des Gewächshauses mit der im Versuch der Tabelle XI verwendeten Bodenluft annähernd gleichwertig war (Tabelle XIII). Der Versuch wurde im übrigen genau so ausgeführt wie in Abb. 5 angegeben, unter Fortlassung einer der beiden mit Erde gefüllten Flaschen.

Danach steht fest, daß *Nostocaceen* bei ausreichender Versorgung mit Wasser, mineralischen Nährstoffen einschließlich Molybdän, Licht und Luft beträchtliche Mengen Stickstoff zu binden imstande sind. Unter Ausnutzung der Energie des Sonnenlichtes bilden sie also organische Substanz unter ausschließlicher Verwendung der Luft als Kohlenstoff- und zugleich als Stickstoffquelle.

III. Symbiotische Nostocaceen (*Anabaena azollae*).

Gleichzeitig mit den vorstehend geschilderten Untersuchungen an frei im Boden und Wasser lebenden *Nostocaceen* sollte auch die von *Azolla* beherbergte *Anabaena* auf stickstoffbindende Fähigkeit und Molybdänbedürftigkeit untersucht werden. Zwar war schon von vornherein in Analogie zu den stickstoffbindenden Bakterien anzunehmen, daß auch die in höheren Pflanzen vorkommenden blaugrünen Algen den Luftstickstoff fixieren und dementsprechend diese Lebensgemeinschaften auch durch Molybdän in ihrer Entwicklung gefördert würden. Jedoch sind einige Autoren anderer Meinung gewesen, und die Frage, ob sich diese Lebensgemeinschaften stickstoffautotroph ernähren können oder nicht, ist bis heute nicht endgültig entschieden worden.

Zuerst haben *Oes* (20) und gleichzeitig *Mameli* und *Polacci* (17) festgestellt, daß die anabaenahaltige *Azolla* Stickstoff binde, und daß hierfür sehr wahrscheinlich die *Anabaena* verantwortlich zu machen sei. *Pringsheim* (22) hat dann aber diese Auffassung nicht bestätigt. Er konnte weder bei *Anabaena azollae* noch bei *Anabaena cycadeae* oder dem endophytischen *Nostoc punctiforme* Stickstoffbindung nachweisen. Was diese *Nostoc*-Art betrifft, so hat *Harder* (13) ein Jahr später sogar die Ansicht vertreten, daß die Alge ein „fakultativer Parasit“ und das Zusammenleben mit *Gunnera* eine „harmlose Erkrankung“ derselben sei. *Winter* (31) gelangte aber zu einer anderen Auffassung. Er konnte mit Reinkulturen von den Nostocaceen aus *Gunnera* und *Cycas* bei kohlenstoffheterotropher Ernährung der Algen Stickstoffgewinne erzielen, die allerdings nur gering waren. Die endophytische Lebensweise der Blaualgen wurde nicht als Parasitismus, sondern als Symbiose bezeichnet. Auch *Molisch* (19) hat gezeigt, daß *Nostoc sphaericum* in den Atemhöhlen der Lebermoose *Blasia pusilla* und *Cavicularia densa* den Luftstickstoff assimiliert. Andererseits sind aber *Huncke* (15) und *Wildemann* (29) wieder zu der Überzeugung gekommen, daß der Wasserfarn *Azolla* und sein Symbiont *Anabaena* zwar mit sehr wenig Stickstoff leben, aber die „Azollen trotz Symbiose mit *Anabaena* auf stickstofffreiem Nährboden nicht normal gedeihen können“. Stickstoffbindung wurde nicht

nachgewiesen, und das Zusammenleben der Alge mit dem Farn wird darum zum Teil immer noch als reiner Raumparasitismus aufgefaßt [Huneke (15), Wildemann (29), Geitler und Pascher (10)].

Nachdem die Bedeutung des Molybdäns für die biologische Stickstoffbindung erkannt worden war, schien jedoch auch hier die Möglichkeit gegeben, daß in all den Fällen, in denen keine Stickstoffbindung festgestellt werden konnte, die verwendeten Nährmedien nicht genügend Molybdän enthielten.

Um zunächst im Falle *Azolla* eine Klärung herbeizuführen, wurden einige Pflanzen von *Azolla caroliniana* aus einem Wasserbecken des Botanischen Gartens in Berlin-Dahlem entnommen, in 750 ccm fassende Erlenmeyerkolben auf je 200 ccm Grundnährlösung, zum Teil mit verschiedenen Zusätzen, verpflanzt und im Gewächshaus weiter gezüchtet. Die abgeänderten Grundnährlösungen enthielten teils 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, teils 0,0005 % $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und teils 0,000025 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Die Besetzung der Lösungen mit je einem kleinen Pflänzchen erfolgte am 13. August 1936. Am 7. November 1936 wurden die Nährlösungen erneuert unter Verwendung von nur 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,00005 % $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ bzw. 0,00001 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Denn bis dahin hatten sich die Kontrollpflanzen auf der Grundnährlösung ohne Zusatz fast noch besser entwickelt als die Pflanzen auf molybdän-, vanadium- oder wolframhaltiger Lösung. Wolfram hatte die Azollen sogar ungünstig beeinflusst. Am 7. Januar 1937 waren in dieser Lösung die meisten Pflanzen bereits abgestorben, weshalb vorläufig nur die Wirkung von Molybdän und Vanadium untersucht wurde.

Die am 2. Februar 1937 nach *Kjeldahl* ermittelten Stickstoffgehalte (Tabelle XIV) deuten zweifellos auf Stickstoffbindung und berechtigen trotz der geringen Unterschiede zu der Annahme, daß Vanadium und noch mehr Molybdän die Aufnahme des elementaren Stickstoffs gefördert haben. Denn ebenso wie bei den frei lebenden *Nostocaceen* mußte auch hier berücksichtigt werden, daß die erst vor kurzem ihrem natürlichen Standort, einem schlammigen Wasser, entnommenen Impfpflanzen wahrscheinlich noch reichlich Molybdän oder ähnlich wirkende Spurenelemente enthalten hatten, und daß deshalb die Molybdän- und Vanadiumgaben die Entwicklung nicht noch mehr fördern konnten.

Tabelle XIV. Wirkung von Vanadium und Molybdän auf anabaenahaltige *Azolla*.

13. August 1936 bis 2. Februar 1937.

Grundnährlösung	mg N in der gesamten Kultur	Grundnährlösung	mg N in der gesamten Kultur
Frisch beimpft (Kontrolle)	0,2	+ V	9,6
Ohne Zusatz	6,8	+ Mo	10,1

Darum wurde ein zweiter Versuch aus dem ersten in folgender Weise beimpft: Je ein sehr kleines aber grünes Pflänzchen wurde am 7. Januar 1937 übertragen

aus einer Grundnährlösung (—) in eine ebensolche (—),
 „ „ „ (—) in eine vanadiumhaltige Lösung (—V),
 „ „ „ (—) in eine molybdänhaltige Lösung (—Mo),
 „ „ vanadiumhaltigen Lösung (V) in eine Grundnährlösung (V—),
 „ „ „ „ (V) in eine vanadiumhaltige Lösung (VV),
 „ „ molybdänhaltigen Lösung (Mo) in eine Grundnährlösung (Mo—),
 „ „ „ „ (Mo) in eine molybdänhaltige Lösung (MoMo).

Die Molybdat- und Vanadatkonzentrationen waren diesmal 0,00005 bzw 0,00001 %. Am 30. März 1937 wurden die Kulturen folgendermaßen begutachtet:

- : Wenig *Azolla*, stark chlorotisch.
- V: Etwas mehr *Azolla*, stark chlorotisch, bläulich grüner Algenrasen am Glas.
- Mo: Noch mehr *Azolla*, aber auch chlorotisch. Bläulich grüner Algenrasen am Glas.
- V: Viel *Azolla*, grün, in der Nährlösung etwas *Anabaena*.
- VV: Weniger *Azolla*, grün, viel *Anabaena* in der Nährlösung.
- Mo: Wenig *Azolla*, grün, sehr viel *Anabaena* in der Nährlösung.
- MoMo: *Azolla* tot bis auf 1 bis 3 sehr kleine Pflänzchen, sehr viel *Anabaena* in der Nährlösung.

Die Kulturen Mo— und noch mehr MoMo erweckten den Eindruck, als seien die Azollen von den sehr dichten *Anabaena*-Watten erstickt worden. Denn die wenigen Pflanzen, die sich hatten entwickeln können, waren grün und sahen auch im übrigen gesund aus. Die reichliche Versorgung mit Vanadium und Molybdän hatte also die Alge so sehr in ihrem Wachstum begünstigt, daß sie der *Azolla* den Lebensraum streitig machen konnte. Beim mikroskopischen Vergleich dieser *Anabaena* mit der in den Blatthöhlen der *Azolla* lebenden ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede, so daß die Vermutung auftauchte, beide seien miteinander identisch, *Anabaena azollae* sei also aus den Blatthöhlen in die molybdän- oder vanadiumhaltigen Nährlösungen hineingewachsen.

Das konnte auch deshalb angenommen werden, weil die äußerlich algenfreien, aber trotzdem nur sehr schwach entwickelten und chlorotisch gefärbten Kulturen —, —V, und —Mo ausschließlich aus Pflanzen bestanden, die auch in den Blatthöhlen keine *Anabaena* enthielten. Vielleicht hatte deshalb keine freie Entwicklung von *Anabaena* stattfinden können, obwohl in einem Teil der beimpften Lösungen genügende Mengen des fördernden Spurenelements Molybdän zur Verfügung standen.

Das Fehlen eines solchen lästigen Konkurrenten in der Nährlösung hätte eigentlich die Entwicklung der Azollen mehr fördern müssen. Zumindest hätten sie auf der molybdänhaltigen Lösung kräftig wachsen müssen, wenn sie selbst den Stickstoff zu binden in der Lage wären. Jedoch wies die chlorotische Farbe der Pflanzen auf Stickstoffmangel hin. Sie waren aus Impfpflanzen hervorgegangen, die auf molybdänfreier Grundnährlösung gewachsen waren und hatten, wie später noch wiederholt bestätigt werden konnte, ihren Symbionten infolge Mangels an Molybdän verloren. Da *Huneke* (15) und *Wildemann* (29) anabaena-freie Azollen besonders leicht in Stickstoff-Hungerkulturen erhielten, ist die Wirkung des Molybdäns auf die *Azolla-Anabaena*-Gemeinschaft ähnlich derjenigen des Stickstoffs. Abimpfungen von den chlorotischen, völlig anabaena-freien Kulturen auf Grundnährlösung mit 0,0001 % Molybdat und zum Teil auch mit 0,05 % Natriumnitrat ergrünt auf den nitrathaltigen Lösungen und entwickelten sich hier normal, während sie auf den nitratfreien Lösungen sehr bald völlig eingingen, ohne sich nennenswert vermehrt zu haben. Hieraus kann geschlossen werden, daß ausschließlich *Anabaena azollae* und nicht *Azolla* selbst zur Stickstoffbindung befähigt ist.

Da *Anabaena* aus den Azollen in stickstofffreier Lösung nur dann leicht verschwindet, wenn gleichzeitig Molybdän fehlt, so muß dieses Element für die Stickstoffbindung der *Anabaena* notwendig sein. Welchen Schutz das Molybdän für eine stickstoffbindende Alge bei erhöhtem Kohlensäuredruck darstellen kann, wurde oben gezeigt. Es ist nahelegend, auch für den natürlichen Lebensraum der *Anabaena* in den Blatthöhlen der *Azolla* wenigstens zeitweilig höheren als den atmosphärischen Kohlensäuredruck anzunehmen. Das von *Huneke* (15) beobachtete Absterben der *Anabaena* in den stickstofffrei gezogenen Azollen besagt also nicht, wie diese folgerte, daß die Algen „keine Stickstofflieferanten für *Azolla* sein können“. Vielmehr konnte *Anabaena* den Stickstoff nicht binden, weil ihre Nährlösung kein Molybdän enthielt. Die Algen starben in den Blättern auf molybdänfreier Lösung vielleicht nur deshalb ab, weil sie von *Azolla* zunächst noch mit Kohlensäure sehr reichlich versorgt werden.

Wie aus den Ergebnissen der Versuche mit den frei lebenden *Nostocaceen* gefolgert werden muß, haben die blaugrünen Algenrasen in —V und —Mo Stickstoff gebunden, von dem auch die Azollen vermutlich geringe Spuren geliefert bekommen haben. So ist wahrscheinlich die unbedeutende Wachstumsförderung der Azollen in diesen Lösungen zu erklären.

Um zu prüfen, ob die in V—, VV, Mo— und MoMo außerhalb des Wasserfarns so kräftig entwickelte *Anabaena* tatsächlich mit *Anabaena azollae* identisch wäre, wurde die freilebende Form durch mehrfaches

Überimpfen auf festen Nährboden, bestehend aus Grundnährlösung mit 0,0001 % Molybdat und 2 % Agar artrein gezüchtet und dann in verschiedener Weise in verschiedenen Nährlösungen mit anabaenafreien Azollen in Berührung gebracht. Eine Neuinfektion derselben erfolgte jedoch ebenso wie in *Hunekes* und *Wildemanns* Versuchen in keinem einzigen Falle, so daß die in der Nährlösung angewachsene *Anabaena* trotz weitgehender morphologischer Übereinstimmung mit der von der *Azolla* in ihren Blättern beherbergten Form möglicherweise doch eine andere Art oder Varietät darstellte, die dem Wasserfarn nur äußerlich angehaftet hatte.

Bevor dieser Frage weiter nachgegangen wurde, schien es angebracht, die Wirkung des Molybdäns auf *Azolla* unter mehr natürlichen Verhältnissen zu untersuchen. Es galt erstens festzustellen, welche Molybdänkonzentration die Entwicklung der *Azolla* in stickstofffreier Nährlösung bei möglichst guter Lüftung am stärksten förderte, und zweitens wie sich die Pflanzen bei Anwesenheit der auch am natürlichen Standort im Teichwasser vorhandenen Kleinkrebse verhalten würden. Für diese bilden die *Nostocaceen* einen wesentlichen Bestandteil der Nahrung, so daß es vielleicht mit Hilfe einiger dieser Tiere möglich war, ein Überhandnehmen blaugrüner Algen in der Nährlösung zu verhindern.

Kultiviert wurde in 200 ccm fassenden Kalischalen aus Jenaer Geräteglas Nr. 20 in jeweils 150 ccm Grundnährlösung, zum Teil mit Zusätzen von 0,15 γ, 15 γ oder 1,5 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je Schale. In eine von den jeweils 2 Schalen wurden 4 *Ostracoden* und 4 *Daphnien* ausgesetzt. Die Beimpfung erfolgte dann gleichmäßig mit je einem kleinen grünen, anabaena-haltigen Pflänzchen einer Kultur, die nach der oben erläuterten Beschriftungsweise mit Mo — bezeichnet war. Diese Kultur machte im ganzen einen chlorotischen Eindruck.

Das Ergebnis des Versuchs in Tabelle XV lehrt, daß erstens die günstigste Molybdänkonzentration etwas niedriger liegt als bei den

Tabelle XV. Wirkung von Kleinkrebsen und verschiedenen Molybdänkonzentrationen auf *Azolla*.

13. September bis 27. Oktober 1937.

Grundnährlösung	mg N in		
	Nährlösung	<i>Azolla</i>	Gesamtkultur
Frisch beimpft (Kontrolle)	—	—	0,1
Ohne Zusatz	2,6	0,4	3,0
+ Kleinkrebse	0,6	2,9	3,5
+ 0,000 000 1 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,3	0,5	4,8
+ 0,000 000 1 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Kleinkrebse	0,4	7,1	7,5
+ 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,3	1,3	5,6
+ 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Kleinkrebse	0,5	7,9	8,4
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,0	1,0	5,0
+ 0,001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + Kleinkrebse ...	0,5	?*	etwa 7,0

* Bei der Analyse verunglückt.

frei lebenden *Nostocaceen*, nämlich etwa zwischen 0,00001 und 0,0001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, und zweitens unter dem Einfluß der Kleinkrebse die Stickstoffbindung der Azollen mit ihrer symbiontischen *Anabaena* noch weiter gefördert wird auf Kosten einer *Nostocaceen*-Entwicklung in der Nährlösung. Dabei ist der Stickstoffgewinn durch die *Azolla-Anabaena*-Symbiose bei Gegenwart der Kleinkrebse absolut größer als durch die in der Lösung wachsenden *Nostocaceen* mit der schwächer entwickelten *Azolla*. Daß die Kleinkrebse die freie Entfaltung der *Azolla* und dadurch einen größeren Stickstoffgewinn ermöglicht haben, ist aus

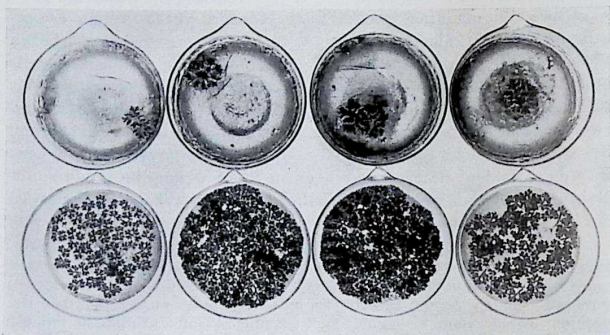


Abb. 6. Einfluß von Kleinkrebsen und steigenden Molybdängaben auf *Azolla*.
Obere Reihe ohne, untere mit Kleinkrebsen, jeweils von links nach rechts: Ohne Zusatz;
+ 0,0000001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; + 0,00001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; + 0,001 % Na_2MoO_4
 $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. 3. September bis 27. Oktober 1937.

Abb. 6 deutlich zu ersehen. Wahrscheinlich ist außerdem der Stickstoff der von den Tieren gefressenen *Nostocaceen* auf dem Umweg über die tierischen Exkremente und unter bakteriellem Einfluß mineralisiert und so den Azollen verfügbar geworden. Wie später noch gezeigt werden wird, wirkt eine kleine Stickstoffgabe fördernd auf die Stickstoffbindung der *Azolla-Anabaena*-Symbiose.

Um nun *Azolla* künftig auch ohne Mithilfe von Kleintieren von im Wasser wachsenden Blaualgen unbehelligt kultivieren zu können, wurde am 3. November 1937 jeweils eine kräftige Pflanze im Reagensglas in 50- bis 70%igem Alkohol eine bis mehrere Sekunden lang geschüttelt, dann in sterile molybdänhaltige Grundnährlösung übertragen, wo sie entweder so belassen oder mit einem abgeflammten Platinspatel zerdrückt wurde. Auf die Weise gelangte die Alge aus den Blatthöhlen in die Nährlösung.

Von sämtlichen so angelegten Röhrenkulturen sind nur zwei sterilisierte *Azolla*-Pflanzen lebendig geblieben und haben sich vermehrt. Sie wurden am 6. Dezember 1937 in je 100 cem sterile¹ molybdänhaltige Grundnährlösung in 300 cem fassenden Erlenmeyerkolben übertragen. In den mit zerdrückten Pflanzen beimpften Röhren haben sich auch nach Monaten keine Algen entwickelt.

Am 26. Februar 1938 konnte mit den sterilisierten Azollen ein vorläufiger Versuch durchgeführt werden, der in erster Linie zeigen sollte, wie sich die bis dahin mit Molybdän versorgten Pflanzen auf einfacher und auf molybdän-, vanadium- oder wolframhaltiger Grundnährlösung entwickeln würden.

Dem schon erwähnten ausgeprägten Speicherungsvermögen der *Azolla* für Molybdän entsprechend sind die Unterschiede in Entwicklung und Stickstoffbindung kaum bemerkbar (Tabelle XVI). Eine fördernde Wirkung kann höchstens Molybdän und Wolfram in ganz bescheidenem Maße zuerkannt werden.

Tabelle XVI. Wirkung von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf äußerlich algenfreie Azollen.

26. Februar bis 28. April 1938.

Grundnährlösung	mg N	
Ohne Zusatz	2,1	3,0
+ 0,000 001 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,4	2,6
+ 0,000 01 % $\text{NaWO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,3	3,7
+ 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,3	3,6
Filter* + Impfpflanze	0,1	

* Hier wie bei den folgenden Versuchen wurden die Pflanzen von der Nährlösung abfiltriert und im Falle, daß diese Nitrat enthielt, gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mitsamt dem Filter aufgeschlossen.

Im Gegensatz zu den Feststellungen bei früheren Versuchen mit nicht sterilisierter *Azolla* war während der ganzen Versuchszeit in keinem der Kulturkolben eine freie Entwicklung der Algen zu sehen. Auch in den noch folgenden Versuchen blieben die Nährlösungen stets algenfrei. Daraus muß abermals geschlossen werden, daß die oben genannte, durch Molybdän und Vanadium in ihrer Vermehrung so auffällig geförderte *Anabaena* doch nicht identisch war mit *Anabaena azollae*. Hierfür spricht ferner die Tatsache, daß auch zahllose weitere Bemühungen verschiedener Art, diese *Anabaena* außerhalb der Blatthöhlen des Wasserfarns in einer Nährlösung zu kultivieren, erfolglos blieben. Nicht nur

¹ Hier und bei allen folgenden Versuchen wurden nur noch im Autoklaven bei 120° C sterilisierte Nährlösungen in 300 cem fassenden Erlenmeyerkolben verwendet.

durch Zerdrücken der Pflanzen in Nährlösung, sondern auch durch Herauspräparieren der Algen in makroskopisch erkennbarer Menge und Übertragung derselben in verschiedene Nährlösungen wurde an das von anderen Autoren offenbar mühelos erreichte Ziel zu gelangen versucht. Hierzu wurden außer der Grundnährlösung mit und ohne Molybdän oder Calciumnitrat auch noch *Beijerincksche* Lösung, bestehend aus Leitungswasser und Dikaliumphosphat, sowie diese mit Molybdänzusatz verwendet. Die 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit 20 ccm Nährlösung standen teils in diffusem Tageslicht und Sonnenlicht unter Ölpapier, teils auch in einer grün gefärbten Flüssigkeit bis zum Hals eingetaucht, um so die Farbe des Blattgrüns zu ersetzen. Jedoch waren alle diese Maßnahmen vergeblich. Auch nach 3 Monaten war noch keine Spur von Algenentwicklung zu erkennen. Vielmehr war sogar das eingespumte Material völlig verschwunden. Das ist um so verwunderlicher, als die Isolierung symbiontischer Blaualgen anderen Untersuchern wiederholt gelungen ist.

So hat *Molisch* (19) *Nostoc sphaericum* aus Lebermoosen isolieren können, *Harder* (13) und *Pringsheim* (22) züchteten *Nostoc punctiforme* und *Anabaena cycadeae* aus *Gunnera*-Rhizomen bzw. aus *Zycas*-Wurzeln, und der letztere Autor hat außerdem ebenso wie *Huneke* (15) und *Wildemann* (29) *Anabaena azollae*, wenn auch teilweise aus einer anderen *Azolla*-Art, außerhalb des Farns kultiviert. Warum mir das gleiche mit *Anabaena* aus *Azolla caroliniana* nicht gelungen ist, vermag ich mit Sicherheit nicht zu sagen. Allerdings hat *Pringsheim* die Azollen vor dem Herauspräparieren der Algen nicht äußerlich sterilisiert, und *Huneke* und *Wildemann* haben dies zwar getan, jedoch vielleicht nicht genügend, indem sie die Pflanzen „durch Alkohol gezogen“ haben, „um die außen anhängenden Algen möglichst abzutöten“. Wenn sie in einer großen Zahl von Isolierungsversuchen immer dieselbe Alge gefunden haben, was mir bei den weniger zahlreichen Versuchen mit nicht sterilisierten Pflanzen nicht anders ergangen ist, so muß das nicht unbedingt für Identität dieser Alge mit *Anabaena azollae* sprechen. Es kann sich vielleicht auch um eine Art ektophytischen Symbionten der *Azolla* handeln. Da ebenfalls *Oes* (20) die freie Kultivierung der *Anabaena azollae* und ferner keinem der erwähnten Autoren die Wiedervereinigung der von ihm gezüchteten *Anabaena* mit algenfreier *Azolla* geglückt ist, darf auf Grund aller vorliegenden Versuchsergebnisse einschließlich der eigenen angenommen werden, daß die Symbiose zwischen *Azolla* und *Anabaena azollae* vielleicht derartig eng ist, daß sich diese Alge wenigstens nicht so leicht wie frei lebende *Nostocaceen* in Nährlösungen kultivieren läßt. Bei anderen endophytischen *Nostocaceen* mögen die Verhältnisse anders liegen. Z. B. muß *Nostoc punctiforme* immer wieder von außen in die *Gunnera*-Rhizome eindringen. Daß diese Alge noch nicht so sehr

auf die symbiontische Lebensweise angewiesen sein wird wie *Anabaena azollae*, die in den besonders für die Symbiose mit der Alge gestalteten Blatthöhlen auch schon am Vegetationspunkt des Farns vorhanden ist, leuchtet ein. Allerdings ist es möglich, daß sich der Farn, wenn auch weniger gut, ohne die Alge am Leben erhält. Unter natürlichen Bedingungen würde ihm ja dann auch Stickstoff in gelöster Form und durch Vermittlung ektophytischer *Nostocaceen* der Luftstickstoff zur Verfügung stehen. Außerdem soll hier nach Wildemann (29) Wiedervereinigung mit dem Symbionten vorkommen.

Unter künstlichen Laboratoriumsverhältnissen würde die isolierte Kultur der *Anabaena azollae* vielleicht doch möglich sein, wenn die in den Blatthöhlen vorliegenden Lebensbedingungen für *Anabaena* noch mehr nachgeahmt würden, als es geschehen ist. Dabei ist besonders an die Versorgung mit Kohlensäure oder auch mit organisch gebundenem Kohlenstoff zu denken. Denn nach Winter (31) sind die *Nostocaceen* aus *Gunnera* und *Cycas* bezüglich der Kohlenstoffernährung „heterotroph, fakultativ autotroph“. Stickstoff wird nur bei Gegenwart von Fructose gebunden. Derartige Versuche mit *Azolla* mußten aber vorläufig zurückgestellt werden.

Aus der Nachkommenschaft der äußerlich sterilisierten Azollen ließen sich bald wieder von einer auf Grundnährlösung ohne Zusatz gezogenen Kultur völlig algenfreie Pflanzen heranziehen, die in nitrat-haltiger Lösung zur Vermehrung gebracht wurden. Sie sollten nun in ihrem Verhalten gegenüber Wolfram, Vanadium, Molybdän und Nitratstickstoff mit den anabaenahaltigen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Nährlösungen am 28. April 1938 mit je einer grünen Pflanze der anabaenafreien bzw. einer anabaenahaltigen Kultur beimpft, die nach der anfänglichen Züchtung der äußerlich sterilisierten Pflanzen auf molybdänhaltiger Lösung zum ersten Male auf unveränderter Grundnährlösung gewachsen war.

Wenn dadurch auch die Pflanzen anscheinend noch nicht so weit vom Molybdän befreit worden waren, daß sie auf der Grundnährlösung überhaupt nicht mehr Stickstoff zu binden und zu wachsen vermocht hätten, so haben sie doch, wie aus Tabelle XVII zu ersehen ist, auf die Molybdängabe schon etwas deutlicher reagiert als im vorigen Versuch. Im ganzen aber war die Entwicklungsfreudigkeit aller Pflanzen ziemlich gering, und sie ist im folgenden noch geringer geworden. Offenbar sagten ihnen die mit Wattestopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben nicht besonders zu. Eine künstliche Lüftung würde wahrscheinlich die *Azolla*-Kulturen in ihrer Entwicklung genau so gefördert haben wie die Algenkulturen. Jedoch konnten solche Versuche nicht mehr ausgeführt werden.

Tabelle XVII. Wirkung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und Nitrat auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige und anabaenafreie Azollen.

28. April bis 30. Juni 1938.

Grundnährlösung	mg N je Kultur			
	anabaenahaltige <i>Azolla</i>		anabaenafreie <i>Azolla</i>	
Ohne Zusatz	2,2	2,6	0,1	0,1
+ 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,7	3,0	—	—
+ 0,000 001 % $\text{NaVO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,5	2,0	—	—
+ 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,9	4,9	0,1	0,1
+ 0,1 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	5,4	5,5	1,1	1,5
+ 0,1 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ + 0,000 01 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6,0	6,1	0,6	1,2

Im einzelnen geht aus Tabelle XVII noch hervor, daß Molybdän in seiner Wirkung auf anabaenahaltige *Azolla* vom Wolfram nicht ganz erreicht wurde, und daß Vanadium eher hemmenden als fördernden Einfluß gehabt hat. Noch besser als mit Molybdän konnten sich die Pflanzen mit Nitratstickstoff entwickeln und am besten, wenn ihnen beides zugleich geboten wurde.

Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die Pflanzen selbst ohne Mitwirkung der stickstoffbindenden *Anabaena* den gesamten Stickstoff aus dem Nitrat aufgenommen haben. Denn sonst hätten annähernd dieselben Werte bei den anabaenafreien Pflanzen gefunden werden müssen. Das ist aber nicht entfernt der Fall. Im übrigen haben diese Pflanzen jede Fähigkeit zur Stickstoffbindung eingebüßt, und Molybdän ist für sie gänzlich ohne Bedeutung. Also geht auch hieraus hervor, daß die Bindung des Luftstickstoffs lediglich der in den Blättern von *Azolla* lebenden Alge möglich ist, die für den Farn eine bessere Stickstoffquelle zu sein scheint als Nitrat in der Nährlösung.

Damit diese Fragen weiter geklärt würden, war es notwendig, nicht nur *Azolla*, sondern auch die abfiltrierte nitrathaltige Nährlösung der Analyse zu unterwerfen. Das ist im folgenden Versuch geschehen, der ebenso wie der vorige angesetzt, aber mit einmal mehr auf molybdänfreier Grundnährlösung gezogenen Pflanzen beimpft wurde. Die Vermehrung der Pflanzen war durchweg schwach. Erst nach 4 Monaten war so viel Pflanzenmasse gebildet, daß die Analysen durchgeführt werden konnten (Tabelle XVIII).

Sie lehren aber trotzdem eindeutig, daß nur die anabaenahaltigen Azollen Stickstoff binden, und zwar am besten, wenn ihnen zugleich Molybdän und Nitrat geboten wird. Nitrat wirkt also auf die Stickstoffbindung nicht etwa, wie man erwarten könnte, hemmend, sondern fördernd. Dabei wird nur verhältnismäßig wenig Stickstoff aus dem

Tabelle XVIII. Wirkung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und Nitrat auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige und anabaenafreie Azollen.

30. Juni bis 31. Oktober 1938.

Grundnährlösung	mg N					
	in der Nährlösung	aufgenommen aus der Nährlösung	in den Pflanzen	gebunden		
Frisch beimpft (Kontrolle)	0,3	—	—	—	—	—
+ 0,12 % Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O (Kontrolle)	14,4	—	—	—	—	—
Mit anabaenahaltiger <i>Azolla</i> .						
Ohne Zusatz	—	—	1,0	1,3	0,7	1,0
+ 0,000 01 % Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	—	—	0,6	1,2	0,3	0,9
+ 0,000 001 % NaVO ₃ · 4 H ₂ O	—	—	1,7	1,7	1,4	1,4
+ 0,000 01 % Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	—	—	2,4	2,6	2,1	2,3
+ 0,12 % Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O ..	12,0	12,0	3,3	3,4	0,9	1,0
+ 0,12 % Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O + 0,000 01 % Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	12,8	12,7	1,6	1,7	5,2	5,4
					3,6	3,7
Mit anabaenafreier <i>Azolla</i> .						
Ohne Zusatz	—	—	0,3	0,3	0,0	0,0
+ 0,000 01 % Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	—	—	0,4	0,3	0,1	0,0
+ 0,12 % Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	11,5	— *	2,6	—	0,0	—
+ 0,12 % Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O + 0,000 01 % Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	11,1	11,8	3,3	2,6	2,9	2,7
					0,0	0,1

* Die Parallelkultur ist durch einen Pilz vernichtet worden. Hüncke (15) hat schon berichtet, daß anabaenafreie Pflanzen leicht von Schimmelpilzen befallen und getötet werden.

Nitrat aufgenommen, gewissermaßen nur zusätzlich. Der Farn muß dadurch in seinem Stoffwechsel, etwa auch in der Kohlensäureproduktion, so gestärkt werden, daß infolgedessen die Alge zu intensiverer Stickstoffbindung angeregt wird und dann der Farn nicht mehr so viel Stickstoff aus dem Nitrat aufzunehmen braucht wie anfangs. Tatsächlich hat er ja auch ohne Molybdän mehr aufgenommen als mit Molybdän, weil im ersten Falle die Stickstoffbindung gehemmt ist. Auf anderem Wege ist Oes (20) ebenfalls zur Überzeugung gekommen, daß die *Azolla-Anabaena*-Lebensgemeinschaft neben dem elementaren Stickstoff auch noch solchen in gebundener Form aufnimmt. Es ist das ein Verhalten, das etwa demjenigen der Leguminosen mit ihren Knöllchenbakterien entspricht, die ebenso über eine anfängliche Stickstoffhungerperiode besser hinwegkommen, wenn ihnen etwas Stickstoff in gebundener Form zur Verfügung steht. Schließlich läuft natürlich dieser fördernde Anreiz durch den aufgenommenen Nitratstickstoff auf eine stärkere Vermehrung der *Azolla* und der in ihr enthaltenen *Anabaena* hinaus. So wird die üppige Entwicklung der *Azolla* auf Teich- oder Grabenwasser nicht zu-

letzt deren Gehalt an Stickstoff und Molybdän zu verdanken sein. Bei Zusatz von 10 % Teichwasser zur molybdänhaltigen Grundnährlösung konnte eine gleiche Wachstumssteigerung erreicht werden wie durch Nitratzusatz (Abb. 7).

Ohne *Anabaena* verhält sich *Azolla* nicht anders als eine stickstoff-heterotrophe grüne Pflanze. Stickstoff wird unter keinen Umständen gebunden, Nitratstickstoff auf jeden Fall stärker assimiliert, und ein Zusatz von Molybdän zur Nährlösung ist ohne jede Wirkung.

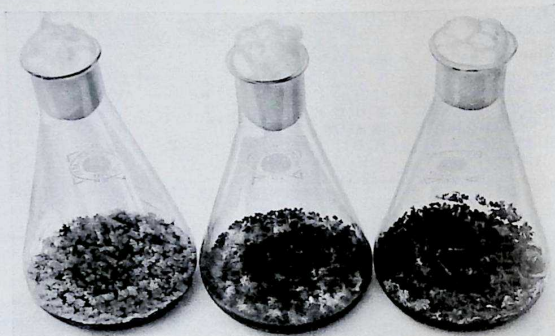


Abb. 7. Einfluß von Molybdän und Teichwasser auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige *Azolla*.

Von links nach rechts in sterilisierter Grundnährlösung: Ohne Zusatz; + 0,00001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; + 0,00001 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 10 % Teichwasser statt H_2O .
27. November 1938 bis 7. März 1939.

Damit dürfte die Bedeutung des Algensymbionten für den Wasserrfarn und zugleich dessen Molybdän-Speichungsvermögen eine zwanglose Erklärung gefunden haben. Der Farn nimmt aus dem Wasser, das am natürlichen Standort wohl niemals gänzlich stickstofffrei ist, geringe, jedoch längst nicht ausreichende Mengen gebundenen Stickstoffs auf, speichert Molybdän und stellt dieses neben Kohlensäure und anderen lebensnotwendigen Mineralien der *Anabaena* zur Verfügung, die ihrerseits mit Hilfe des katalytisch wirksamen Molybdäns Stickstoff bindet und an *Azolla* abgibt.

Zusammenfassung.

1. Wasser- und erdbewohnende *Nostocaceen* binden Luftstickstoff.
2. Hierfür ist es gleichgültig, ob sich die Algen in absoluter Reinkultur befinden oder ob sie mit Bakterien vergesellschaftet sind.

3. Bei ausreichender Belichtung, Belüftung und Versorgung mit den lebensnotwendigen Mineralsalzen wurden bei Anwesenheit einer Spur Molybdän in 4 Wochen und in 100 cem Nährlösung bei kohlenstoff-autotropher Lebensweise bis zu etwa 12 mg Stickstoff gebunden.

4. Ohne Zusatz von Molybdän zur Nährlösung wird nur sehr wenig Stickstoff gebunden, so daß die Notwendigkeit dieses Elementes für die Stickstoffbindung auch dieser Mikroorganismen angenommen werden muß.

5. Aus verschiedenen Ackerböden konnten in stickstofffreier, molybdänhaltiger Nährlösung nur Arten der Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum* isoliert werden. Andere bodenbewohnende Algen scheinen unter diesen Bedingungen keinen Stickstoff zu binden.

6. In besonders humusreichen und fruchtbaren Böden sind Arten der Gattung *Anabaena* ebenso wie *Azotobacter* zahlreicher vertreten als in weniger fruchtbaren Böden. Ein sehr unfruchtbarer Geestboden enthielt überhaupt keine stickstoffbindenden *Nostocaceen* und kaum *Azotobacter*.

7. Obwohl die symbiontisch in *Azolla* lebende *Anabaena*-Art nicht außerhalb des Wasserfarns kultiviert werden konnte, ließ sich doch beweisen, daß auch diese Alge ebenso wie die frei lebenden Arten den Luftstickstoff bindet und dabei auch von der Gegenwart des Molybdäns abhängig ist.

8. Die Symbiose zwischen *Azolla* und *Anabaena azollae* scheint so eng zu sein, daß diese Alge unter den angewandten Kulturbedingungen außerhalb des Wasserfarns nicht gedeiht.

9. Eine dieser endophytischen *Anabaena* sehr ähnliche und offenbar fast ebenso regelmäßige vorkommende ektophytische Form sowie andere den Azollen äußerlich anhaftende *Nostocaceen* wuchern in molybdänhaltiger, stickstofffreier Nährlösung so stark, daß sie der *Azolla* ihren Lebensraum mit Erfolg streitig machen, sofern keine Kleintiere zugegen sind, die sich von *Nostocaceen* ernähren.

10. In einer synthetischen Nährlösung, die den natürlichen Verhältnissen entsprechend außer Molybdän eine geringe Menge gebundenen Stickstoffs enthält, bindet die *Azolla-Anabaena*-Gemeinschaft mehr Stickstoff als in völlig stickstofffreier Nährlösung.

Literatur.

- 1) Allison, Fr. E. u. S. R. Hoover, 3. Intern. Congr. of Soil Sci. 1, 145—147, 1935. — 2) Allison, Fr. E., S. R. Hoover u. H. J. Morris, Bot. Gaz. 98, 433—463, 1937. — 3) Allison, Fr. E. u. H. J. Morris, 2. Intern. Congr. of Soil Sci. Comm. III, S. 24—28, 1930.
- 4) Beijerinck, M. W., Centralbl. f. Bakt. II, 7, 561—582, 1901. — 5) Bortels, H., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 56, 153—160, 1938. — 6) Derselbe, Centralbl. f. Bakt. II, 100, 373—393, 1939.

- 7) *Dreues, K.*, ebenda II, 76, 88—101, 1928.
- 8) *Esmarch, F.*, *Hedwigia* 55, 224—273, 1914.
- 9) *Frank, B.*, *Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.* 7, 34—42, 1889.
- 10) *Geitler, L.* u. *A. Pascher*, *Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz*, Heft 12. Jena 1925. — 11) *Gistl, R.*, *diese Zeitschr.* 4, 348—378, 1933. — 12) *Glade, R.*, *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen* 12, 295—346, 1914.
- 13) *Harder, R.*, *Zeitschr. f. Bot.* 9, 145—242, 1917. — 14) *Heinze, B.*, *Landw. Jahrb.* 35, 889—910, 1906. — 15) *Huneke, A.*, *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen* 20, 315—341, 1933.
- 16) *Maertens, H.*, ebenda 12, 439—496, 1914. — 17) *Mameli, E.* u. *G. Polacci*, *Atti Istit. Bot. Pavia* XV, 2, 159—257, 1911. Ref.: *Bot. Zentralbl.* 117, II, 427, 1911. — 18) *Menchikovsky, F.*, *Repr. Hadar* 6, 4, 1933. Ref.: *Mitt. Intern. Bodenk. Ges.* 11, 16, 1936. — 19) *Molisch, H.*, *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.*, IV. Ser., 1, 1926. Nach *Dreues* (7).
- 20) *Oes, A.*, *Zeitschr. f. Bot.* 5, 145—163, 1913.
- 21) *Pirson, A.*, *Die Ernährung der Pflanze* 36, 25—31, 1940. —
- 22) *Pringsheim, E.*, *Arch. f. Protistenk.* 38, 126—130, 1918.
- 23) *v. Schelhorn, M.*, *Naturw. u. Landw.*, Heft 18, 1—54, 1936. —
- 24) *Schröder, M.*, *Centralbl. f. Bakt.* II, 85, 177—212, 1932.
- 25) *Ter Meulen, H.*, *Rec. Trav. Chim. d. Pays-Bas* 51, 549—550, 1932.
- 26) *Derselbe*, *Nature* 130, 966, 1932. — 27) *Treub, M.*, *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg* 7, 213—223, 1888.
- 28) *Werner, A. P.*, *Vortr. Akad. Wissensch. U. d. S. S. R.* 4, 55—58, 1935. Ref.: *Centralbl. f. Bakt.* II, 97, 151, 1937. — 29) *Wildemann, L.*, *Diss. Münster* 1934. — 30) *Wilfahrt, H.* u. *G. Wimmer*, *Landw. Versuchsstat.* 67, 27—50, 1907. — 31) *Winter, G.*, *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen* 23, 295—335, 1935. — 32) *Wunder, W.*, *Der Biologe* 7, 209—216, 1938.

(Aus der biologischen Station in Lunz am See und aus dem Pflanzen-physiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Zur Kenntnis der bakteriellen Sulfatreduktion. I.

Von

Viktor Czurda.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. April 1940.)

Bei der Untersuchung der Ernährungsansprüche eigenartiger, aus Ferroverbindungen Ferrieisen fällender Bakterien der *Chromatium Weissei*-Gesellschaft vom Obersee in Lunz am See (Niederdonau) [siehe Ruttner (1937)] wie auch bei der Untersuchung anderer Schwefelbakteriengesellschaften wurde eine Mineralsalzlösung mit großen Ferro- und Kohlensäuremengen verwendet. In ihr wurde die im nachfolgenden geschilderte, für die geschaffenen Versuchsbedingungen unerwartete Erscheinung der Sulfatreduktion aufgefunden. Wenn auch die anschließenden Untersuchungen noch nicht alle Einzelheiten aufklären ließen, so rechtfertigen doch die Ergebnisse der qualitativen Bestimmung eine Mitteilung darüber.

Jeder der im folgenden behandelten Versuche geschah grundsätzlich in drei gleichzeitigen Ausführungen. Darüber hinaus hat jeder Versuch in verschiedenen Zeitabständen mehrfache Wiederholungen erfahren. Die gewonnenen Ergebnisse wurden dann als gesichert angesehen, wenn der Versuch nicht nur in der dreifachen Ausführung, sondern bei jeder der unternommenen Wiederholungen das gleiche qualitative Ergebnis gebracht hat.

Ausgangsversuch.

Der Versuch, welcher den Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen gebildet hat (Versuch 1) und welcher deshalb als „Ausgangsversuch“ bezeichnet werden soll, wird folgendermaßen vorgenommen:

Eine Mineralsalzlösung, bestehend aus 0,01 % NH_4Cl (= 33,6 mg/Liter NH_4), 0,001 % K_2HPO_4 , 0,001 % $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ (= 4 mg/Liter SO_4 = 1,4 mg/Liter H_2S), wird nach der Sterilisation mit einem Keimgemisch der genannten Biocoenose beimpft, hernach bis zu 0,1% mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 + 6 \text{H}_2\text{O}$ (= 46 mg/Liter NH_4 = 489 mg/Liter SO_4 = 173,4 mg/Liter H_2S) und bis zu 0,2% mit NaHCO_3 versetzt und schließlich nach gründlichem Evakuieren einem CO_2 -Druck von rund 100 mm (rund 13 Vol.%) ausgesetzt. Nach wenigen Tagen beginnt in allen mit dem obengenannten Keimgemisch beimpften Lösungen das beim Mischen der Lösungen entstandene, reichliche Eisensediment Schwärzung durch den entstehenden Schwefelwasserstoff zu zeigen.

Bei 22 bis 28° C ist in 6 bis 10 Tagen nicht nur das gesamte Eisen-sediment in Ferrosulfid umgewandelt, sondern auch das noch in Lösung befindliche Eisen als Sulfidüberzug an den Gefäßwänden ausgefällt. Bloß am Meniskus bleibt zunächst eine Ferrihydroxydhaut erhalten. Sie verschwindet erst, wenn sich auch im Gasraum eine gewisse H_2S -Menge angesammelt hat und eben mit Bleiacetatpapier nachweisbar wird. Die gebildete Schwefelwasserstoffmenge ist demnach eine beträchtliche.

Im Liter dieser Kulturlösung könnten theoretisch $1,4 + 173,4$ mg H_2S entstehen. Rund die Hälfte hiervon kann als FeS (224 mg) gebunden werden. Schon während der Bildung wird ein Teil des Schwefelwasserstoffs in der Lösung neben dem FeS und im Gasraum verteilt bleiben. Nach 12 Tage langer Kulturdauer ist kein Eisen in der Kulturlösung mehr kolorimetrisch nachweisbar. Es ist als FeS ausgefällt.

Der Versuch führt zum gleichen Ergebnis, wenn das reduzierende Keimgemisch der ersten Passage nach 12 bis 30 Tagen in weiteren Passagen durch Überimpfen eines oder zweier Tropfen fortgeführt wird. Die Reduktionsfähigkeit, welche in der zweiten und dritten Passage deutlich zunimmt, bleibt auch nach 17 Passagen in dieser Lösung erhalten. Vermutlich infolge der Anreicherung der Keime setzt sie von der zweiten Passage an bereits in der halben Zeit ein.

In den gleichzeitig und gleichartig vorbereiteten, also sterilisierten, aber unbeimpft bleibenden Röhrchen, die stets zur Kontrolle im gleichen Versuchsraum untergebracht werden (Versuch 2), unterbleibt die Erscheinung. Es liegt im vorigen also eine biologische Umsetzung vor. Der Eintritt der Sulfatreduktion unterbleibt ebenfalls, wenn die sterile Lösung mit anderen Keimgemischen, unter anderen mit solchen der Luft beimpft wird (Versuch 3a). Sie unterbleibt schließlich, wenn die unsterile Versuchslösung in unsterilen Röhrchen untergebracht den oben genannten übrigen Versuchsbedingungen ausgesetzt wird (Versuch 3b).

Anfänglich wurden bei jeder Vornahme des Ausgangsversuchs je drei Röhrchen als Kontrolle unbeimpft, sonst aber völlig gleich behandelt, im Versuchsraum (Exsikkator) untergebracht. Im Laufe der bisherigen Untersuchungen sind 26 Kulturen des Versuchs 2 und 79 Kontrollversuche mit nicht sterilisierter und unbeimpft gebliebener Lösung (Versuch 3b) durchgeführt worden. In allen etwa 100 Kontrollen ist ausnahmslos die Sulfatreduktion ausgeblieben. Die Beobachtungsdauer betrug wenigstens 28 Tage. In einigen Fällen waren die Röhrchen bis zu 1 Jahr ohne jedes Anzeichen eines Reduktionsbeginns stehengeblieben. Demnach fehlen die Erreger der Reduktion im Luftkeimgemisch der Stadt und des freien Landes, oder sie treten darin so vereinzelt auf, daß sie diesem Nachweisverfahren entgehen.

In Anbetracht des unerwarteten Ergebnisses des „Ausgangsversuchs“ und seiner vielen Ausführungen (etwa 220 Einzelversuche) seien zu seiner besseren Beurteilung noch folgende Einzelheiten der Durchführung, welche stets streng eingehalten wurde, wenn nichts Anderes vermerkt ist, zum oben Gesagten hinzugefügt.

Die mit einfach oder doppelt destilliertem Wasser bereitete Nährsalzlösung, die mit Rücksicht auf die später eintretende Verdünnung durch Zusätze eine um 20 % höhere Salzmenge erhält als oben angegeben ist, wird zu 8 cm in Röhrchen aus Jenaer Glas (16×160 mm) abgefüllt. Die zum Versuch bestimmten Röhrchen und Kolben werden mit verdünnter Salzsäure aufgekocht und mechanisch gereinigt. Sie sind restlos benetzbar.

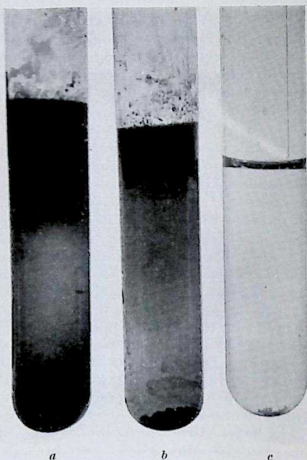
Die Lösung wird hierauf, zuvor in üblicher Weise entkeimt, mittels einer Öse mit einem Tropfen des geeigneten Keimgemisches beimpft. Dann wird in jedes Röhrchen 1 cm einer mittels Seitzfilter entkeimten 1 %igen Ferroammoniumsulfatlösung und 1 cm einer 2,1 %igen, unter dem Kipp mit Kohlensäure gesättigten NaHCO_3 -Lösung zugefügt, deren Bereitung und Entkeimung nach dem Vorgang von *Roe-lofsen* (1933) geschieht. Durch den Bicarbonatzusatz tritt zur Ferrihydroxydfällung noch die Ferri-carbonat-fällung als eine braune, milchige Trübung, die sich während der ersten 24 Stunden allmählich als Bodenkörper sammelt. Die soweit vorbereiteten Röhrchen werden in dicht schließenden Exsikkatoren oder anderen geeigneten Gefäßen zu 10 oder mehr Stück untergebracht und ihr Inhalt durch Aus-pumpen der Luft durch 3 bis 4 Minuten zum Sieden gebracht. Schließlich wird bis zu einem Druck von 100 mm Hg vom Sauerstoff nicht gereinigte Kippkohlen-säure durch eine Waschflasche mit Wasser eingeleitet und der übrige Unterdruck belassen. Die Dichtung der Exsikkatoren muß dabei sorgfältig geprüft werden, ob sie den belassenen Unterdruck hinreichend lange erhalten läßt. Die Kohlensäure wird aus Marmor und Schwefelsäure oder Salzsäure im Kipp gewonnen. Der zum Anzeigen der c_H in einzelnen Röhrchen zugesetzte Indikator (Bromthymolblau) läßt erkennen, daß nach einigen Tagen, nach Eintritt des Gleichgewichts zwischen den eingeschlossenen Lösungen und der sie umgebenden Atmosphäre, ihre Reaktion von p_H 7,6 bis 8,1 auf 6,85 bis 7,0 verschoben wird.

Die Reduktion des Sulfats tritt übrigens in dieser Lösung auch ein, wenn größere Flüssigkeitsmengen in Erlenmeyerköllchen (bis zu 0,5 Liter) angewendet werden.

Verlauf der Ferrosulfidabscheidung.

Die Abscheidung von Ferrosulfid beginnt mit der Entstehung von schwarzen Flecken im Innern des Sediments, die sich verbreitern und allmählich das ganze Sediment erfassen. In 6 bis 10 Tage alten Kulturen, deren fahlgelbes Eisensediment bereits völlig schwarz geworden ist, geht die Abscheidung von FeS auf Kosten des noch gelösten Eisens fort (s. Abb. 1a). Nicht nur am Grunde, sondern aufsteigend auch an den Vertikalwänden der Röhrchen wird andauernd Sulfid abgeschieden. Die Abscheidung an den Wänden tritt anfangs als eine wechselnde Menge verstreuter kleiner schwarzer Punkte auf, welche an Schwärzungs-grad und an Größe zunehmen. Dazwischen entstehen fortlaufend neue

FeS-Bildungs-herde, bis ein dichter, bisweilen undurchdringlicher schwarzer Belag an den Meniskus der Lösung heranreicht. Jeder der anfangs entstehenden Punkte stellt eine aus festgesetzten Keimen bestehende Kolonie dar, von der aus die H_2S -Abscheidung und damit die Ausbreitung des FeS-Niederschlags vor sich geht. Wie schon erwähnt

[illegible]

wird eingeatmet. Das Röhren c ist eines von sechs, die in das Vorhandene geschlossen waren und die eine heimpfte Versuchslösung gleich werden stöpseln ohne NaHCO_3 -Zusatz enthalten und somit nahezu das gesamte Gas abgeben, sondern auch die auf Kosten diffundierender H_2S vor sich gehen. (Zit. G.I., 100 mm Hg-Druck CO_2) gelöst aufweisen. In diesen ist Bleiac. d. h. die Aufnahme im durchfallenden Licht.

gebräunt oder geschwärzt wird. Selbst

sich soviel H_2S an, daß er auch in unbeimpft gebliebenen Röhrchen durch die Wattestöpsel hindurch von obenher FeS-Bildung bewirkt (siehe Abb. 1 b). Nach dieser weitgehenden Sulfatreduktion ist in der Lösung Eisen kolorimetrisch nur mehr in Spuren nachweisbar.

Über die Gärungserreger.

An der freien Oberfläche der Versuchslösung sammeln sich nach 10 Tagen Keime zu einer weißlichen, zähschleimigen Schicht, die anfangs von $Fe(OH)_3$, später von FeS verschieden stark durchsetzt ist. Die Lösung selbst erweist sich nach dem Abkratzen des brüchigen FeS-Niederschlags leicht trübe. Sie nimmt, an die Luft gebracht, rasch infolge der einsetzenden Fällung von $Fe(OH)_3$ an Trübung zu. Das nach mehrmaligem Überimpfen zur Ausbildung gelangende Oberflächenhäutchen besteht aus zahlreichen, in Schleim dicht liegenden Stäbchen. Dazwischen sind kurze Spirillen vereinzelt eingestreut. Auch vereinzelt dicke Spirillen mit den auch bei anderen Vertretern der Gattung auffindbaren Tröpfchen kommen vor.

Am Grunde, im Eisensulfidsediment, scheinen Stäbchen völlig zu fehlen. Es finden sich ausschließlich Spirillen von einem Schraubenumgang und ovalen Zellquerschnitt und lebhafter Bewegung vor. Die FeS-Krümeln sind von ihnen dicht besetzt und umschwärmt. Im üblichen Hängetropfenpräparat an der Luft sammeln sich die umher schwärmenden Zellen chemotaktisch um die Eisensulfidkrümeln. Schon aus dem Vorkommen und Verteilung in der Versuchslösung kann geschlossen werden, daß die Spirillen die eigentlichen Urheber der Sulfatreduktion sind und daß die Stäbchen Begleitorganismen darstellen. Bei der Trennung der beiden Organismen im Hochschicht- oder Plattenguß erweisen sich nur die Spirillen als die H_2S -Bildner. Die Stäbchen sind dazu nicht befähigt.

Werden Kulturen mit H_2S -Abscheidung unmittelbar nach der Herausnahme aus dem Versuchsraum mit einer etwa 1 cm hohen Paraffinschicht (Schmelzpunkt 40 bis 42° C) gegen Luft abgeschlossen (Versuch 4), so bleibt die Reduktionsfähigkeit der Keime solcher Kulturen bis zu 18 Monaten und mehr erhalten. Auch dann sogar, wenn in dieser langen Zeit der Paraffinverschluß undicht wird und die Reaktion infolge des CO_2 -Verlustes über p_H 8,0 hinaus verschoben worden ist und O_2 eindringt. Bereits Starkey (1938) hat an *Sporovibrio desulfuricans* solche Erfahrungen der Langlebigkeit der Keime gemacht.

Über das natürliche Vorkommen dieser Keime.

Die geschilderten sulfatreduzierenden Keime finden sich, wie mir nun aus den Untersuchungen früherer Jahre bekannt war, als Begleitkeime von *Chromatium Weissei* im Lunzer Obersee in einer Tiefe von

10 bis 11 m. Sie waren in den sogenannten Doppelschichtkulturen (siehe Czurda, 1936) ausgeführt mit einem sehr ähnlich zusammengesetzten Agarnährboden bei Einsaat der Chromatien nach 14 bis 21 Tagen zu FeS-fällenden Kolonien herangewachsen (Versuch 5).

Unter Doppelschichtkultur ist die Kulturausführung zu verstehen, bei der das besäte und in stehendem Röhrchen rasch zum Erstarren gebrachte Nährsubstrat („Kulturschicht“) von dem gleichen, aber unbeimpft bleibenden Nährsubstrat überschichtet wird. Die „Deckschicht“ wird ebenfalls rasch erstarren gelassen. Um den CO_2 -Verlust des Substrats und ein Eindringen des O_2 namentlich beim Natriumsulfidzusatz zu verhindern, wird Paraffin (Schmelzpunkt 40 bis 42°C) zu einer Schicht von rund 1 cm Höhe aufgegossen. Beim Erstarren vielleicht entstehende Undichtigkeiten werden durch ein gelindes Auftauen des Paraffinpfropfes beseitigt.

Auffallend war damals die zu gewissen Jahreszeiten regelmäßige Häufigkeit der aus einem bestimmten Volumen des Standortswassers zur Entwicklung gelangter Kolonien, die auf Grund der damaligen Erfahrungen dem *Sporovibrio* (*Microspira*) *desulfuricans* (Beij.) Starkey (siehe Starkey, 1938) zugeschrieben wurden. Die Zahl der zur Entwicklung gelangter Kolonien bewegte sich in den Sommermonaten 1936 bis 1938 (Juli bis August) zwischen 400 bis 600 je 1 ccm Standortswasser. Gezählt sind damit natürlich nur jene sulfatreduzierenden Keime und Keimklumpen, die sich in der beschriebenen Nährlösung entwickelt haben, von der allerdings nicht bekannt ist, ob sie so günstige Entwicklungsbedingungen schafft, daß sich alle zu dieser physiologischen Gruppe gehörenden Keime zu erkennbaren Kolonien vermehrt haben.

Schon nach dem Vorliegen der ersten Ergebnisse des Ausgangsversuchs wurde es aber klar, daß die im Agar zur Entwicklung gelangten Keime nicht völlig mit *Sporovibrio* (*Microspira*) *desulfuricans* übereinstimmen. Ist doch mit dem Versuch 1 gezeigt, daß der Prozeß auch ohne Zusatz von organischen Stoffen möglich ist. Übrigens soll nicht unerwähnt sein, daß diese Keime wiederholt mit den von van Delden (1904) und Baars (1930) angegebenen Nährböden in Hochschicht und bei langer Versuchszeit nicht nachgewiesen werden konnten. Nach den derzeitigen Kenntnissen (s. S. 195) hat dies seinen Grund in dem CO_2 -Mangel des Nährbodens.

Die mit dem Versuch 1 anreicherbaren und angereicherten Sulfatreduzierer der *Chromatium*-Gesellschaft wechseln ihre Häufigkeit im Laufe eines Jahres sehr stark, was offenkundig mit der jahreszeitlichen Wasserzirkulation des Sees in Zusammenhang steht (über diese siehe Ruttner, 1933, 1937, Müller, 1938). Außerhalb der eben angegebenen Jahreszeit war die Keimzahl in der angegebenen Tiefe so gering, daß sie mit dem Doppelschichtverfahren nicht mehr direkt nachgewiesen werden konnten. Vielfach blieben auch die Anreicherungsversuche, nach Art des Ausgangsversuchs vorgenommen, ergebnislos.

Eine beträchtliche Anreicherung gestatten auch die Versuchslösungen, die mit NaHCO_3 und Na_2S versehen (ohne die großen Eisenmengen) für die Kultur von schwefelführenden *Purpurbakterien* verwendet werden (*van Niel*, 1931, *Czurda*, 1935).

Über die sonstige Verbreitung der Biocoenose und ihrer einzelnen Komponenten in der Natur und über den Vergleich der vorliegenden Befunde mit den Ergebnissen von *Klein* und *Steiner* (1929) am Lunzer Untersee und mit den jüngsten ökologischen Beobachtungen anderer wird erst im Zusammenhang mit der Keimanalyse berichtet werden.

Grundversuch.

Im weiteren wurde geprüft, ob eine Sulfatreduktion auch dann eintritt, wenn an Stelle von 0,1 % Ferroammoniumsulfat 0,1 % des sekundären Natriumsulfats ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} = 298 \text{ mg/Liter SO}_4 = 105 \text{ mg/Liter H}_2\text{S}$), also vereinfachte Bedingungen, geboten werden (Versuch 6), alles andere aber an der Versuchsanordnung beibehalten wird. Da das in Form von 0,00001 % FeCl_3 eingetragene Eisen, das übrigens als Nährelement nicht gesondert zugesetzt werden muß (Jenaer Glas!), als Indikator für Schwefelwasserstoff nicht ausreichend sein konnte, wurde zur Sichtbarmachung des H_2S jedes Röhrchen mit Watte verschlossen und dabei ein Bleiacetatpapierstreifen mit in das Röhrchen eingeklemmt.

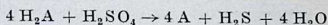
An der bei p_{H} von 7,0 schon am 5. und 6. Tag einsetzenden Bräunung des Papiers ist die H_2S -Abgabe der Versuchslösung erkennbar. In weiteren 2 bis 5 Tagen ist das Bleiacetatpapier völlig geschwärzt und eine beträchtliche Diffusion des H_2S durch den Wattestöpsel in den Gasraum nachweisbar.

Auch in dieser Versuchslösung können die Passagen ohne Zusatz von H-Spendern beliebig lange ohne Einbuße an Geschwindigkeit und Intensität der Reduktion fortgesetzt werden. Auch die Sicherheit des Eintritts der Erscheinung ist hier ebenso groß wie im Ausgangsversuch. Von 181 Röhrchen in 14 Passagen haben ausnahmslos alle am 6. bis 8. Tage das im Röhrchen befindliche Indikatorpapier geschwärzt, 38 mit sulfatreduzierenden Keimgemischen nicht beimpfte, in den gleichen Exsikkatoren befindliche, der Kontrolle dienende Röhrchen (Versuch 7) blieben trotz längerer Beobachtungszeit ohne jedes Anzeichen einer H_2S -Bildung.

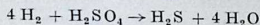
Die meist stärkere Trübung im Vergleich zum Ausgangsversuch zeigt im wesentlichen die gleiche Zusammensetzung, wie sie oben geschildert worden ist. Die starke Entwicklung der Oberflächenhaut fällt besonders auf.

Das Ergebnis des Grundversuchs zeigt, daß das zur Einstellung des Redoxpotentials und als Indikator für entstehenden H_2S zugesetzte Eisen für den Eintritt und das Stattfinden des Prozesses gar nicht notwendig ist.

Durch das Ergebnis der beiden Versuche (Versuche 1 und 6) ist das Vorliegen eines nach den bisherigen Erfahrungen über Sulfat-reduktion unerwarteten Prozesses aufgezeigt. Denn nach den Untersuchungen von *Beijerinck* (1895), *van Delden* (1904), *Elion* (1924), *Rubenschik* (1928) und vor allem aber die von *Baars* (1930) verlangt die Sulfatreduktion zu ihrem Ablauf geeignete organische Substanzen (Alkohole, Zucker, Fettsäuren), welche die notwendigen Wasserstoff- und Energiequelle nach dem Formelbild



darstellen. In diesem Formelbild bedeutet H_2A die als Wasserstoff-spender dienende organische Substanz. Auf Grund der Untersuchungen von *Stephenson* und *Stickland* (1931) kann, wie schon *Niklewski* (1914) vermutet hat, als Wasserstoffspender auch der molekulare Wasserstoff selbst treten, so daß die in allgemeinsten Form ausgedrückte Reaktionsgleichung in den nachstehenden Sonderfall



übergeht, wie dies nach der Theorie von *Kluyver* (1931) zu erwarten ist (*Bunker*, 1936).

Die Unwahrscheinlichkeit des vorliegenden Falles von Sulfatreduktion besteht darin, daß die Lösungen meiner Versuche keine Zusätze an irgendwelchen organischen Stoffen oder molekularen Wasserstoff erhalten oder enthalten, die als H-Donatoren dienen würden, soweit man dies nach dem bisher Gesagten beurteilen kann. Diese Tatsachen fordern zu einer gründlicheren Untersuchung der Erscheinung heraus.

Über die allgemeinen Bedingungen der Sulfatreduktion.

Die Wirkung der Außenbedingungen wurde durch Abänderung der beiden Versuchsanordnungen (Versuche 1 und 6) zu bestimmen gesucht.

Den Einzelheiten sei zunächst folgendes vorangestellt: Die anfangs und später an der biologischen Station in Lunz am See ausgeführten Versuche wurden in Prag (1938 und 1939) wiederholt, wo andere Gefäße (Exsikkatoren, Röhrchen), anderes Dichtungsfett (*Kahlbaumsches* Hahnfett, Kautschuk-Kolophonium-Vaseline-Kitt), andere Nährsalzpräparate (*Merck*), ein anderes Wasser, nämlich ein durch Quarzkühler über eine Tropfenfängereinrichtung (*Fitting-Mevius*) hergestelltes und doppeltdestilliertes Wasser und eine andere Kippkohlen säure verwendet worden ist. Dabei wurde die gleiche Ergebnissicherheit aller Versuche

festgestellt wie in Lunz. Es handelt sich also nicht um eine an bestimmte Apparaturen oder Versuchsumstände gebundene Erscheinung.

1. Für den Eintritt der H_2S -Bildung durch das vorliegende Bakterienngemisch ist die *Anwesenheit der Kohlensäure* unentbehrlich. Dies ist ein auffallender Unterschied gegenüber den bisher bekannten Prozessen. Wird nämlich bei der Ausführung des Ausgangs- sowie des Grundversuchs das Natriumbicarbonat und die Kohlensäure fortgelassen (Versuche 8 und 9), so unterbleibt die Erscheinung. Sie erfolgt auch dann nicht, wenn zwecks Ersatzes der Pufferwirkung des $NaHCO_3$ - CO_2 -Systems das Phosphatpuffergemisch mit der entsprechenden Reaktion von p_H 7,0 in Konzentrationen von 0,1, 0,05 oder 0,01 Mol/Liter zugesetzt wird (Versuche 10, 11 und 12). Da die Phosphatzusätze den Eintritt und den normalen Verlauf der Reduktion an sich nicht hindern oder verzögern, wie vermutet werden könnte, wenn gleichzeitig CO_2 zugesetzt wird (Versuche 13, 14 und 15), so erscheint hiermit die Notwendigkeit der Anwesenheit von CO_2 erwiesen zu sein.

2. Das *Licht* hat, nach den bisherigen Versuchen, keinen erkennbaren Einfluß auf das Stattfinden des Prozesses. Er tritt mit gleicher Geschwindigkeit und anscheinend auch mit dem gleichen Endergebnis im Dunkeln wie im Licht ein (Versuche 16 und 17).

3. Soweit es die qualitativen Versuche erkennen lassen, liegt das *Temperaturoptimum* über $28^\circ C$. Der Prozeß geht, allerdings sehr verlangsamt, auch noch bei einer Temperatur von 4 bis $5^\circ C$ vor sich. Dies ist übrigens die Temperatur, bei welcher die Keime am Fundort, in der Tiefe von 10 bis 11 m, vorkommen und H_2S bilden (Versuche 18, 19 und 20).

4. In den beiden Versuchsanordnungen geht die Sulfatreduktion bei einer *Reaktion* von p_H 6,85 bis 7,0 vor sich. Infolge der ausgiebigen Pufferung (0,21 % $NaHCO_3$ und CO_2 -Vorrat) bleibt sie bis zum Versuchsende unverändert, mag dabei eine sehr intensive oder unmerkliche Umsetzung stattfinden.

Um den Einfluß einer anderen Reaktion zu prüfen, wurde in dem Kohlensäure-Bicarbonatsystem an Stelle des Natriumsalzes das Calciumsalz eingeführt. Eine sterile $CaCO_3$ -Aufschwemmung in doppeltdestilliertem Wasser wird durch einige Tage mit CO_2 gesättigt, indem ein Kohlensäurestrom immer wieder durch sie geleitet und die Lösung zwischendurch unter dem Gasvorrat des Kipp aufbewahrt wird. Von dieser Vorratslösung wird wie von der Natriumbicarbonatlösung je 1 cm zur Versuchslösung in den Röhrchen (9 cm) hinzugefügt. Der Versuchslösung werden demnach nur 10 % der Salzmenge zugeführt, die sich unter einer CO_2 -Atmosphäre löst. Die für den Versuch fertige Lösung nimmt unter dem CO_2 -Druck von 11 bis 13 % (Volumen), wie er üblicherweise eingerichtet wird, eine Reaktion von p_H 5,6 an.

Wird die $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ - CO_2 -Lösung in Verbindung mit dem Ausgangsversuch (Versuch 21) angewendet, so kommt es infolge der höheren Azidität nur zu einer bescheidenen Eisenfällung bei dem Zusammenmischen der Lösungen. Auch in diesem Versuch erfolgt später Schwefelwasserstoffbildung. Infolge der höheren Azidität kommt es zu einer früheren Abgabe des H_2S an den Gasraum und damit naturgemäß zu einem früheren Nachweis mittels des Bleiacetatpapiers. Allmählich kann auch hier eine wenn auch mäßige FeS -Fällung am Grund der Röhrrchen einsetzen.

In Verbindung mit dem Natriumsulfat (Grundversuch) (Versuch 22) ist an der Verfärbung des Indikatorpapiers die gleiche Beschleunigung des Eintritts der H_2S -Abgabe an den Gasraum zu sehen wie im Ausgangsversuch. Der Begleitorganismus (Stäbchen) tritt in diesen Kulturen kaum sichtbar in Erscheinung.

Werden durch Verwendung von Gemischen der beiden Bicarbonatvorratslösungen Zwischenwerte der Reaktion (z. B. p_{H} 6,35) im Versuch eingerichtet (Versuch 23), so merkt man, daß mit der Annäherung des p_{H} -Wertes an 7,0 eine Zunahme der schließlich gebildeten FeS -Menge eintritt. Genauere Beziehungen werden erst quantitative Versuche ergeben. Bei Verwendung des NaHCO_3 gelingt die Einrichtung von p_{H} -Werten über 7,0 nur durch Herabsetzung der CO_2 -Tension. Wird die Versuchslösung nach dem üblichen Zusatz von NaHCO_3 (s. Ausgangsversuch) nicht einem auf 0 verminderten Luft- und einem stark erhöhten CO_2 -Druck ausgesetzt, sondern sogleich mit Paraffin gegen Luft abgeschlossen (Versuch 24), so zeigt die Lösung je nach der Größe des CO_2 -Verlustes während der Zubereitung eine Anfangsreaktion von p_{H} 7,6 bis 8,1. Auch in solchen Versuchen kommt es zu einem, wenn auch sehr verlangsamten und herabgesetzten Sulfatabbau. Soweit zur qualitativen Bestimmung durchgeführte Versuche Rückschlüsse zulassen, liegt somit die optimale c_{H} um p_{H} 7,0. Die letztgenannte Versuchsanordnung (Versuch 24) läßt allerdings nicht erkennen, ob nicht vielleicht der herabgesetzte CO_2 -Druck oder die stark geschwächte Pufferungsfähigkeit der Lösung die Ursache für die Verlingerung des Umsatzes ist.

5. Eine weitere Voraussetzung für den Eintritt der Erscheinung ist das *Fehlen des molekularen Sauerstoffs*. Wird im Ausgangs- oder Grundversuch die Luft und damit der Luftsauerstoff nicht durch gründliches Evakuieren des Versuchsraumes beseitigt, so unterbleibt bei sonst beibehaltener Versuchsanordnung der Eintritt der Reduktion. Das gilt vor allem vom Grundversuch, der keine reduzierenden Zusätze erhält. Wie das nach den Erfahrungen von *Sporovibrio (Microspira) desulfuricans* notwendige Redoxpotential zu Versuchsbeginn erreicht wird, ist augenblicklich nicht klar. Es schien, daß das Potential durch die in der Impfflüssigkeit enthaltene Menge an H_2S und Sulfiden herbei-

geführt wird. Die von *Baars* gemachten guten Erfahrungen mit einem anfänglich geringen Sulfidzusatz sind in meinem Falle nach dem Bisherigen jedoch bedeutungslos. Das Natriumsulfid wurde dabei in Form eines Tropfens (0,05 bis 0,03 ccm) einer 0,021- bis 0,21 %igen Lösung zugeführt. Im Ausgangsversuch scheint die zugesetzte Eisenlösung (Ferro) für die Schaffung der notwendigen Eintrittsbedingungen (s. bereits *Elion*, 1925) zu sorgen.

Besondere Bedingungen der Sulfatreduktion: Der beteiligte Wasserstoffspender.

Das Stattfinden der Sulfatreduktion setzt das Vorhandensein eines geeigneten Energie- und Wasserstoffspenders voraus. Einer der bekannten Wasserstoffspender wird der Versuchslösung nicht zugesetzt und ein solcher ist unter den genannten Lösungsbestandteilen als Beimengung ohne nähere Untersuchung nicht zu erkennen. Es kommen in Frage: 1. organische Stoffe, 2. molekularer Wasserstoff und 3. das zugesetzte Ammoniumsalz.

1. Die Mitwirkung *organischer Stoffe* kann aus folgenden Gründen nicht in Frage kommen:

Solche werden bei der Bereitung der Lösungen nicht nur nicht zugesetzt, sondern solche werden infolge der Verwendung von doppeltdestilliertem Wasser, von „pro analysi“-Präparaten auch unbewußt nicht den Lösungen zugeführt. Die darüber hinaus noch denkbaren Verunreinigungen durch solche Stoffe kommen schon mengenmäßig nicht als entscheidende Faktoren in Betracht. Wollte man annehmen, daß mit der Einimpfung des Tropfens Standortswassers organische Stoffe mit eingeführt werden, so kann ihre Menge keinesfalls für die beobachteten Sulfidmengen ausreichend sein. Sie müßte außerdem bald verbraucht sein und könnte nicht durch viele Passagen im Ausgangs- und Grundversuch den Prozeß aufrechterhalten.

Es ist ferner an das Vorkommen flüchtiger organischer Stoffe zu denken, welche das Vakuumfett, mit dem die Schiffe gedichtet sind, verdampfen läßt (s. oben). Abgesehen davon, daß ihre Menge zu gering erscheint, läßt der Versuch 24, in dem die Mitwirkung eines Dichtungsfettes fortfällt, erkennen, daß auch dann eine Reduktion eintritt. Daß nicht etwa auch aus dem Paraffin flüchtige Stoffe (Grenzkohlenwasserstoffe) beteiligt sind, ergibt der Versuch mit Keimeinsaat in hoher Agarschicht unter Paraffinverschluß, in der die Keime unten sowie oben, in unmittelbarer Nähe des Paraffins, in gleicher Stärke FeS bilden.

Bei Verwendung von Wattestöpseln könnte daran gedacht werden, daß ein Cellulose abbauendes Begleitbakterium auf Kosten der in die Lösung fallenden Faserbruchstücke den notwendigen H-Spender

liefere. Diese Möglichkeit entfällt, weil die Sulfatreduktion auch bei Verwendung von Glaskappenverschlüssen ungehemmt eintritt und abläuft. Solche Verschlüsse wurden anfangs durch viele Versuchsreihen hindurch verwendet. Erst später sind die Watteverschlüsse eingeführt worden.

2. Als Wasserstoff- und Energiespender kommt der *molekulare Wasserstoff* in Betracht, von dem *Stephenson* und *Stickland* gezeigt haben, daß er organische Stoffe vollkommen ersetzen kann. Ein Wasserstoff könnte in den bisherigen Versuchen insofern vielleicht vorkommen, als ein solcher im Kipp aus erzhaltigem Marmor neben CO_2 in gewissen Mengen entstehen könnte. Diese Möglichkeit wurde allerdings seitens der Chemiker als gänzlich unwahrscheinlich hingestellt.

Zwecks Entscheidung, ob dies in meinem Falle nicht doch zutrifft, wurde die zur Füllung des Exsikkators notwendige Menge von CO_2 aus dem Kipp langsam durch Schwefelsäure und durch ein mit glühendem Kupferoxyd gefülltes Verbrennungsrohr eingeleitet (Versuch 25a und 25b). Eingeschlossen waren in diesem Exsikkator sowie in den dazugehörigen Kontrollexsikkatoren der Ausgangs- und Grundversuch, beide in mehreren Ausführungen. Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Exsikkator aus der gleichen Kippfüllung bezogene, aber nicht gereinigte CO_2 untergebracht (Versuch 26a und 26b). Zur Auffüllung eines dritten Exsikkators wurde gereinigte CO_2 (100 mm Hg) mit Wasserstoff (50 mm Hg) benutzt (Versuch 27a und 27b). Ein vierter Exsikkator erhielt als Füllgas nur 100 mm Hg Wasserstoff (Versuch 28a und 28b). Die im letzten Exsikkator untergebrachten Kulturen blieben ohne Bicarbonatzusatz, um nicht eine zu alkalische Reaktion durch die CO_2 -Abgabe der Kulturlösung zu verursachen. Der verwendete Wasserstoff ist in einem Kipp mit *Merckschem* Zink und reinsten Schwefelsäure erzeugt und daraus zwecks Reinigung durch eine Silbernitratlösung entnommen worden.

Auch in den Versuchen 25 bis 28 wurden neben den Versuchsröhrchen solche ohne Beimpfung mit eingeschlossen. Nach 10 Tagen war in allen beimpften Röhrchen der Versuche 25, 26 und 27 mit Eisenammoniumsulfat (a) das Sediment tiefschwarz verfärbt. In allen Röhrchen mit Natriumsulfat der genannten Versuche 25 bis 27 (b) war das Bleiacetatpapier tiefbraun bis schwarz verfärbt. In den gleichzeitig mit untergebrachten unbeimpften Röhrchen war weder im ersten Falle noch im zweiten eine Veränderung zu sehen. Der vierte Exsikkator (Versuch 28) zeigte nach dieser Zeit an den beimpften Röhrchen mit Ferroammonium- (a) bzw. Natriumsulfat (b) nur eine schwach ausgeprägte Veränderung. Trotz beträchtlich verlängerter Versuchszeit ist der Unterschied nicht verwischt worden.

Aus dem Verhalten der beimpften Röhrchen der Versuche 25 bis 27 darf geschlossen werden, daß nicht der etwa als Beimengung der Kippkohensäure vorhandene Wasserstoff die Reduktion bewirkt. Wenn im Versuch 28a und 28b die Füllung mit Wasserstoff eine deutliche Verminderung hervorgerufen hat, so kann dies zwei Ursachen haben: Es kann die in den Lösungen und im Wasserstoffgas enthaltene Kohlensäure nicht ausgereicht haben oder es haben schädliche Beimengungen des Wasserstoffgases hemmend gewirkt oder aber es hat die Förderung irgendwelcher wasserstoffvergärenden Bakterien den Reduktionsprozeß ungünstig beeinflußt. Nach verschiedenen vorliegenden Erfahrungen hat die zweite der genannten Möglichkeiten die größte Wahrscheinlichkeit.

Um die Frage, ob nicht molekularer Wasserstoff die Rolle des Wasserstoffspenders spielt, noch sicherer zu entscheiden, wurde in weiteren Versuchen eine Kohlensäure verwendet, welche aus reiner Soda (pro analysi, *Merck*) und reiner Schwefelsäure (pro analysi, *Merck*) im Gasentwicklungsapparat entwickelt worden war (Versuch 29a und 29b). Dieser Versuch hatte das gleiche Ergebnis wie die bisherigen Grund- und Ausgangsversuche und wie die gleichzeitig vorgenommenen Kontrollversuche mit der gewöhnlichen Kippkohensäure.

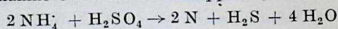
Übrigens hatte schon der Versuch 24, in welchem die Kulturlösung nach dem Zusatz des Bicarbonats mit Paraffin abgeschlossen worden ist, gezeigt, daß eine Mitwirkung des molekularen Wasserstoffs nicht in Betracht kommt.

Auch der Beginn der FeS-Bildung im Ausgangsversuch (s. S. 189) aus dem Innern des Ferriniederschlags und das allmähliche Aufsteigen des Prozesses im Sediment und der darüber befindlichen Lösung spricht dafür, daß der H-Spender nicht aus der Atmosphäre in die Versuchslösung eindringt, sondern im Sediment selbst zu suchen ist.

Wollte man annehmen, daß der erforderliche Wasserstoff erst in der Kulturlösung durch die Tätigkeit von Begleitbakterien entstehe, so stößt dieser Versuch auf die Schwierigkeit, daß für die Bildung von Wasserstoff oder einer H-spendenden organischen Substanz in der Kulturlösung keine hierzu erforderlichen Energiequellen bzw. Ausgangssubstanzen vorliegen. Wird nun unter den der Versuchslösung zugesetzten Mineralsalzen Umschau gehalten, welches von ihnen etwa in Frage kommen könnte, so ergibt sich eine Möglichkeit nur für das Ammoniumsalz $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ und $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

3. Da eine Veränderung der Ammoniumsalzkonzentration von 0,01 auf 0,1 % (Versuch 30) und auf 0,001 % (Versuch 31) im Ausgangsversuch keine Beziehung erkennen ließ, wurde das Schicksal der gebotenen Ammonmenge kolorimetrisch verfolgt.

Bei der Annahme einer Reaktionskoppelung etwa nach dem Bilde:



würde auf 100 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{H}_2\text{O}$ (in 100 ccm Versuchslösung) bei restloser Umsetzung ein NH_4^+ -Verbrauch von 11,3 mg (= 28,0 mg NH_4Cl) zu rechnen sein. Für einen NH_4^+ -Verbrauch stehen in der Lösung allerdings berechnungsmäßig nur 3,4 mg/100 ccm NH_4^+ zur Verfügung. Die Lösung des Ausgangsversuchs enthält in je 100 ccm 3,4 + 4,6 = 8,0 mg NH_4^+ . Zur Umsetzung des darin enthaltenen Sulfats, 48,9 mg/100 ccm SO_4^{2-} , wären 18,3 mg/100 ccm NH_4^+ erforderlich.

Zur Prüfung der Annahme wurden beimpfte und unbeimpfte Röhrchen des Ausgangsversuchs nach 12- bis 16tägiger Versuchsdauer in ihrem Ammongehalt mittels des *Nesslerschen* Reagens verglichen. Trotz wiederholter solcher Prüfungen konnte zunächst weder von mir noch von anderen¹ eine sichere Abnahme des NH_4^+ -Gehalts der Lösungen gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Zur Untersuchung gelangten solche Versuchsröhrchen, in denen bereits das gesamte Eisen als FeS aus der Lösung ausgeschieden war. Die unbeimpften Kontrollen waren im gleichen Anaerobenapparat mit untergebracht.

Die größte bisher beobachtete Abnahme des Ammons war die von durchschnittlich 25 %, was berechnungsmäßig einem absoluten Verbrauch von 2,0 mg NH_4^+ je 100 ccm Versuchslösung entsprechen würde. Da zu dieser Zeit aber bereits zwei Drittel des gebotenen Sulfats (= 36,5 mg/100 ccm SO_4^{2-}) umgesetzt waren, für die 13,8 mg NH_4^+ erforderlich gewesen wären, scheint auch die entwickelte Annahme unwahrscheinlich zu sein. Die Untersuchungen werden in dieser Richtung fortgesetzt.

Wirkung weiterer Versuchsabänderungen.

1. Der Ausgangsversuch wurde dahin abgeändert, daß das Ferroammoniumsulfat (0,1 %) durch 0,1 % Ferriammoniumsulfat (Versuch 33), 0,1 % Ferrosulfat (Versuch 34), 0,1 % Ferrisulfat (Versuch 35), Ferriphosphat (0,1 % Ferrosulfat + 0,2 % K_2HPO_4 , Versuch 36), Ferrihydroxyd (0,1 % Ferrosulfat + NaOH , Versuch 37, 0,1 % Ferrichlorid + NaOH , Versuch 38) ersetzt war. Die übrigen Bedingungen des Ausgangsversuchs sind in den Versuchen 33 bis 38 beibehalten worden.

In allen diesen Versuchen ist die Sulfatreduktion ebenso rasch und, soweit es sich nach solchen qualitativen Versuchen beurteilen läßt, mit dem gleichen Ergebnis abgelaufen; d. h. in den ersten 6 bis 10 Tagen ist eine Schwärzung des Sediments, in den nachfolgenden Tagen eine

¹ Herr Dr. *Franz Berger*, Assistent an der biologischen Station in Lunz am See und Herr Dr. *Karl Ondratschek*, Assistent am hiesigen Institut hatten die Freundlichkeit, solche Bestimmungen mit besonderer Genauigkeit auszuführen. Ich danke ihnen auch hier für ihre Hilfsbereitschaft.

FeS-Fällung aus dem als Ferrobicarbonat in Lösung befindlichen Eisen erfolgt.

Wo anfangs nur eine Ferrisalzlösung oder Ferrisalzfällung zugesetzt war, scheint das unter der Einwirkung der CO_2 entstehende FeCO_3 das notwendige Redoxpotential einzurichten, das im anderen Falle, bei Zufuhr von Ferrosalzen, von Anfang an schon gegeben ist. Demnach scheint der Schluß berechtigt zu sein, daß die Wertigkeit des anfangs zugesetzten Eisens unter den Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf den Ablauf der H_2S -Bildung besitzt.

2. Im Ausgangs- und Grundversuch haben sich das Ammonium und Natrium als brauchbare Sulfat-Kationen erwiesen. Bezüglich der Form des Eisens scheint die Frage zur Zeit noch nicht völlig klar zu sein. Bei der Ausführung des Grundversuchs läßt sich das Natrium durch Kalium (0,1 % K_2SO_4 , Versuch 39), durch Calcium (CaSO_4 , Versuch 40) und Magnesium (MgSO_4 , Versuch 41) mit Erfolg ersetzen. Die beiden letztgenannten Salze werden als Bodenkörper zugesetzt. Die H_2S -Bildung ist in den beiden letztgenannten Versuchen allerdings schwach.

3. Neben der Reduktionsfähigkeit der Sulfate wurde auch die des Natriumthiosulfats und des Natriumsulfits mit Erfolg geprüft¹. Beim Thiosulfat wird der Prozeß außerordentlich rasch eingeleitet.

4. Einige Versuche sollten auch den Einfluß organischer Stoffe auf den vorliegenden Prozeß der Schwefelwasserstoffbildung im Ausgangs- und Grundversuch zeigen. Die zu prüfenden Stoffe wurden zum Teil in abgestuften Mengen der Grundnährlösung vor der Sterilisation zugesetzt. Alles übrige der Versuchsanordnung und -durchführung wurde unverändert beibehalten. Geprüft und mit zusatzlosen Kontrollkulturen verglichen wurden:

Zugesetzte organische Substanz		Im Ausgangsversuch 0,1 % Ferroammonium- sulfat	Im Grundversuch 0,1 % Natriumsulfat
0,001, 0,01 und 0,01 und	0,1 % Natriumacetat.	Versuch 44	Versuch 55
	0,1 % Natriumtartrat	„ 45	„ 56
	0,1 % Äthylalkohol .	„ 46, 47, 48	„ 57, 58, 59
	0,1 % Saccharose . . .	„ 49	„ 60
	0,1 % Witte-Pepton . .	„ 50, 51	„ 61, 62
	0,1 % Natriumacetat.	„ 52	„ 63
	0,1 % Natriumformiat	„ 53	„ 64
	0,1 % Natriumcitrat .	„ 54	„ 65

Im *Ausgangsversuch* ist die Wirkung folgende: Eine Beschleunigung des Prozesses sowie seiner Einleitung zeigt nur das Pepton. Äthylalkohol ist in seinen beiden unteren Konzentrationen (Versuche 46 und 47)

¹ Bei Erfüllung gewisser Versuchsbedingungen setzt die H_2S -Bildung mit der gleichen Geschwindigkeit in der Sulfitablauge der Papierfabrikation ein.

wirkungslos. In der höchsten Konzentration (Versuch 48) verhindert er die Eisensulfidbildung. Auch eine Abgabe von H_2S an die umgebende Atmosphäre ist nicht nachweisbar. Acetat, Lactat, Formiat und Saccharose sind in der eingerichteten Konzentration ohne erkennbaren Einfluß auf den Eintritt und Fortgang der Reduktion. Das Tartrat und Citrat, die das Eisen vollständig in Lösung halten, unterdrücken bisweilen den Eintritt der Schwefelwasserstoffbildung.

Im *Grundversuch* verhindert nur ein Zusatz von 0,1 % Äthylalkohol (Versuch 59) die H_2S -Entstehung immer und vollständig. Saccharose (Versuch 60), Acetat (Versuch 55), Lactat (Versuch 63) und Formiat (Versuch 64) erweisen sich als indifferent, d. h. die Schwefelwasserstoffbildung verläuft ebenso wie in den entsprechenden Kontrollkulturen ohne Zusatz. Tartrat und Citrat hemmen stark. Die H_2S -Abgabe ist in diesen beiden Fällen mit Bleiacetatapier eben nachweisbar.

Aus den eben mitgeteilten Ergebnissen der Versuche mit organischen Zusätzen können zur Zeit selbstredend keinerlei Schlußfolgerungen gezogen werden, weil in den Lösungen noch ein Organismengemenge tätig ist und daher der Einfluß der Zusätze auf die Stoffwechselvorgänge der eigentlichen Sulfatreduzierer durch den Einfluß auf die anderen, unbekannten Prozesse überdeckt sein kann.

5. Von Interesse war ferner der Nitrateinfluß. Ein Kaliumnitrat-zusatz von 0,001 und 0,01 % (Versuche 66 und 67) ist im *Ausgangsversuch* (Eisenammoniumsulfat) ohne sicher erkennbare Wirkung. Ein solcher von 0,1 % (Versuch 68) hingegen verhindert anfangs die Reduktion vollständig. Die H_2S -Bildung setzt erst nach 12 bis 16 Tagen ein, wenn das Nitrat in der Lösung bereits verbraucht ist. Zu dieser Zeit ist in den beimpften, aber zusatzlosen Kontrollkulturen das gesamte Eisen als FeS ausgefällt. Die gleiche Wirkung läßt sich auch im *Grundversuch* nachweisen (Versuche 69, 70 und 71).

6. Ein Zusatz von 3 % NaCl verhindert die H_2S -Bildung in beiden Versuchsanordnungen (Versuch 72, Ausgangsversuch, Versuch 73, Grundversuch).

7. Durch Phosphatzusatz, KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 -Gemisch von pH 7,0 wird der Prozeß weder gefördert noch gehemmt. Selbst ein Zusatz von 0,1 Mol/Liter erweist sich noch als wirkungslos.

8. 0,1 % Natriumchlorat als Zusatz hemmt deutlich die Sulfatreduktion (Versuch 74, Ausgangsversuch, Versuch 75, Grundversuch).

Rückblick.

Mit dem Ergebnis der geschilderten Versuche, vor allem jenem des Grundversuchs (Versuch 6), der eine rasche und intensive Sulfatreduktion unter einfachen und übersichtlichen Versuchsbedingungen ohne organische Substanz und ohne erkennbare Mitwirkung anderer

bekannter Wasserstoff- und Energiespender zeigt, ist ein biologischer Prozeß aufgezeigt, der nach den bisherigen Erfahrungen entgegen allen Erwartungen abläuft.

Über die Art der zugrunde liegenden Reaktionen sind zur Zeit keine Anhaltspunkte für bestimmtere Vorstellungen gefunden worden. Ein Urteil wird erst nach eingehenderer Prüfung der beteiligten Organismen und auf Grund der im Gang befindlichen quantitativen Versuche möglich werden. Die bisherigen Versuche lassen es als wünschenswert erscheinen, auch die von anderer Seite bereits eingehend studierten Sulfatreduzierer einer Prüfung neuerlich zu unterwerfen, um zu sehen, inwieweit der vorliegende Fall in früheren Versuchen mitgewirkt hat. Übrigens ist durch die Versuche 66 bis 71 auch die Reduktion der Nitrate ohne zugesetzte organische Substanz aufgezeigt. Es scheinen demnach auch andere Reduktionsvorgänge ohne Mitwirkung von organischen Stoffen und ohne Wasserstoffspender bekannter Art möglich zu sein.

In dem in seinen Einzelheiten zwar noch nicht geklärten Prozeß läßt sich schon jetzt jener Vorgang vermuten, welcher im Lunzer Obersee in einer Tiefe von 10 m und mehr und in anderen Biocönose vorkommt und welcher dort für die Bereitstellung von H_2S sorgt, ohne daß erkennbar größere Mengen an organischen Stoffen beteiligt sind.

Das Vorkommen eines ähnlichen oder gleichen Prozesses wurde schon früher in der starken H_2S -Bildung im Beisein des thermophilen *Thiospirillum pistiense* im sulfatischen Thermalwasser und in synthetisch gewonnenen Mineralsalzlösungen [s. Czurda (1936)] bei Darbietung von größeren Mengen an CO_2 vermutet. Mangels geeigneter Vermehrungsbedingungen für den genannten Organismus konnte damals der Fall nicht näher untersucht werden.

Die wochenlange Erhaltung von schwefelführenden Purpurbakteriengesellschaften in Mineralsalzlösungen wird durch die im vorhergehenden geschilderten Versuche vielleicht verständlich gemacht (s. auch S. 192). Auch folgende, mir von Herrn Dr. Berger, Lunz, brieflich und durch Farbaufnahme belegte Erscheinung könnte mit der vorliegenden Sulfatreduktion zusammenhängen. Für bestimmte chemische Untersuchungen wurden Schlammproben des Obersees (14 m Tiefe) in Glasstöpselflaschen unter dem Standortswasser im Kühlschrank bei etwa $4^{\circ}C$ und im Dunkeln durch mehrere Wochen aufbewahrt. Die anfangs farblose Standortswassermenge hat sich nach langer Lagerung unter den angegebenen Bedingungen ($4^{\circ}C$ und völliger Dunkelheit) innerhalb von 3 bis 4 Tagen intensiv rot verfärbt. Der Erreger der roten Färbung war *Chromatium Weissei*.

Zusammenfassung.

Im vorhergehenden wird das Vorkommen einer intensiven Sulfatreduktion in bloßer Mineralsalzlösung, bestehend aus 0,01 % Ammonium-

chlorid, 0,001 % sek. Kaliumphosphat, 0,0001 % Ferrichlorid, 0,1 % Natriumsulfat und 0,2 % Natriumbicarbonat und Kohlendioxydüberschuß beschrieben, die dann einsetzt, wenn die genannte Lösung mit einem bestimmten Keimgemisch beimpft, nach gründlicher Entfernung der Luft einer CO₂-Atmosphäre von etwa 13 % Gehalt ausgesetzt wird.

Die Reduktion findet nicht nur ohne jeden Zusatz von organischen Stoffen statt, sondern auch bei möglicher Ausschaltung von molekularem Wasserstoff und aller in Betracht kommenden Verunreinigungen, selbst dann, wenn die Versuchsanordnung verschiedentlich abgeändert wird.

Der Erreger dieser Gärung ist ein Organismengemisch der *Chromatium Weissei*-Biocönose des Lunzer Obersees. Das Organismengemisch ist auch in anderen Thiorhodobakteriengesellschaften und in *Beggiatoa arachnoidea*-Biocönose angetroffen worden. Durch fortgesetzte Kultur in der obengenannten Lösung, also bei ständigem Ausschluß von organischen Stoffen und Wasserstoff, bleiben im wesentlichen zwei Organismen übrig, ein farbloses Stäbchen und ein farbloses Spirillum vom Aussehen von *Sporovibrio desulfuricans* (Beij.) Starkey. Von diesem binären Konsortium ist nur das Spirillum zur Sulfatreduktion befähigt, wie Plattenguß- und Hochschichtgußserien zeigen.

Die Untersuchung zwecks Auffindung des bisher unbekannten Wasserstoff- und Energiespenders wird fortgesetzt.

Literatur.

- Baars, J. K., Over sulfatreductie door bacterien. Diss. Delft 1930. — Beijerinck, M. W., Centralbl. f. Bakt. II, 1, 1, 49, 104, 1895. — Buchanan, R. E., u. E. I. Fulmer, Physiology and Biochemistry of Bacteria, III, London, Bailliere, Tindall and Co., 1932. — Bunker, H. J., A review of the physiology and biochemistry of the sulfur bacteria. Dept. of Sci. and Indus. Chem. Res. Special report No. 3, 1, London 1936. — Czurda, V., Centralbl. f. Bakt. II, 92, 407, 1935. — Derselbe, diese Zeitschr. 7, 110, 1936. — Derselbe, Centralbl. f. Bakt. II, 96, 138, 1937. — Delden, A. van, ebenda II, 11, 81, 113, 1904. — Elion, L., ebenda II, 63, 58, 1924. — Klein, G., u. M. Steiner, Österr. bot. Zeitschr. 78, 289, 1929. — Kluyver, A. J., The chemical activities of the Microorganisms. Univ. Press, 1931. — Müller, H., Internat. Rev. d. ges. Hydrobiol. u. Hydrogr. 36, 433, 1938. — Nabokitch, A. J., u. A. F. Lebedeff, Centralbl. f. Bakt. II, 17, 350, 1906. — Niel, C. B. van, diese Zeitschr. 3, 1, 1931. — J. Nikitinsky, Centralbl. f. Bakt. II, 19, 495, 1907. — Niklewsky, B., ebenda II, 40, 430, 1914. — Roelofsens, P. A., Metabolism of the purple sulfur bacteria. Diss. Utrecht, 1935. — Rubenschik, L., Centralbl. f. Bakt. II, 73, 483, 1928. — Ruttners, Fr., Arch. f. Hydrobiol. 32, 255, 1937. — Starkey, R. L., Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 41, 422, 1938. — Derselbe, Nature 141, 791, 1938. — Derselbe, diese Zeitschr. 9, 268, 1938. — Stephenson, M., Bacterial metabolism. II. Aufl., London 1939. — Stephenson, M., u. L. H. Stickland, Biochem. J. 25, 215, 1931.

(De l'Institut botanique, Université, Berne.)

Recherches sur la répartition de l'hétérotrophie par rapport à l'aneurine chez les champignons.

Par

W. H. Schopfer et S. Blumer.

Avec 2 figures dans le texte.

(Eingegangen am 11. April 1940.)

L'hétérotrophie par rapport à l'aneurine a été étudiée surtout chez les *Mucorinées*, les *Ustilaginées* et chez les champignons supérieurs à chapeau, particulièrement chez les *Polyporacées*. La liste que nous avons dressée des organismes nécessitant l'aneurine nous montre que par rapport aux auxo-autotrophes, le nombre des auxo-hétérotrophes est relativement restreint.

L'hétérotrophie par rapport à l'aneurine est apparue indépendamment de la position systématique des espèces et atteint tous les groupes de champignons. Il nous a semblé intéressant de poursuivre nos recherches en faisant appel à d'autres organismes que ceux utilisés habituellement comme test. Notre but est de rechercher dans quelle mesure le besoin en aneurine, ou de ses constituants est réparti dans les diverses classes de champignons.

I. Polyporales.

Fries (2) a consacré à ce groupe une étude très soignée. Il montre que plusieurs espèces de *Polyporus* sont dépendantes de l'aneurine mais n'établit pas si éventuellement la pyrimidine ou le thiazol pourrait suffire. Nous nous proposons tout d'abord de mettre au clair cette question. Les organismes utilisés sont les suivants:

Polyporus squamosus (Huds) Fr., *P. abietinus* (Dicks) Fr., *P. benzoinus* (Wahlbg.) Fr., *Polyporus zonatus* (Ness) Fr., *P. adustus* (Willd.) Fr., *Polystictus versicolor* (L.) Fr.; toutes les souches proviennent de Baarn. De plus nous avons utilisé *Hypholoma fasciculare* (Huds.) Fr. souche de Berne. Sauf *Polyporus squamosus*, *Polystictus versicolor* et *Hypholoma fasciculare*, ces champignons ont été étudiés par *Fries* qui les classe dans les organismes à aneurine.

Les cultures se font sur notre milieu habituel: glucose puriss. 2%, asparagine puriss. 1‰, phosphate acide de potassium 1,5‰, sulfate de magnésium 0,5‰, p_H 4,2, temp. 18–20°.

La dose d'aneurine utilisée est supraoptimale, soit 1 pour 25 cm de milieu, dans des Erlenmeyers de 150 cm. Stérilisation 115° pendant 15 minutes, avec le facteur de croissance. Lorsque l'aneurine est remplacée par ses constituants, ceux-ci sont également présents à la dose de 1 chacun.

Notre but est d'obtenir le meilleur développement possible, compatible avec nos conditions de culture (quantité et hauteur du milieu, forme du vase etc.). Nous ne pouvons nous contenter de la méthode des doses sub-optimales utilisées par Fries.

Le développement se mesure au poids sec, déterminé après croissance complète de l'organisme.

Les inoculations se font avec un très petit fragment du thalle de la culture initiale.

Les résultats obtenus sont les suivants (tableau I):

Tableau I.

Espèce	Age de la cult.	O	P	T	P + T	B ₁
<i>Polyporus squamosus</i> ...	28 jours	1,9	24,5	1,7	94,5	114,9 mg
" <i>abietinus</i> ...	28 "	5,2	4,4	4,0	52,0	21,2 "
" <i>benzoinus</i> * ..	28 "	11,8	15,8	14,0	78,5	54,5 "
" <i>zonatus</i> 2 a b	28 "	0,4	1,5	0,7	89,9	84,3 "
" " 7 a' b'	28 "	2,8	0,9	2,4	91,7	79,9 "
" <i>adustus</i>	27 "	4,9	27,5	3,1	32,4	26,5 "
<i>Polystictus versicolor</i> ...	21 "	3,2	4,7	1,5	119,3	156,4 "
<i>Hypholoma fasciculare</i> ..	22 "	1,3	3,3	0,9	23,6	23,7 "

* Formation de mucilage: pesées peu précises!

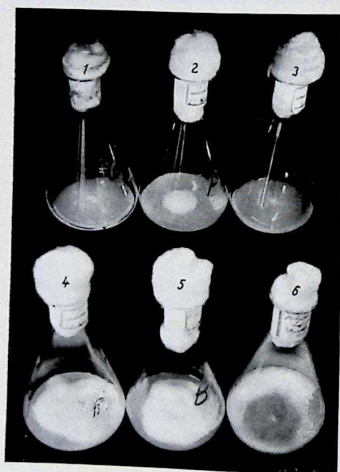


Fig. 1. Croissance de *Polyporus squamosus*.
1. milieu contrôle. — 2. avec pyrimidine. — 3. avec thiazol. — 4. avec pyrimidine + thiazol. — 5. avec aneurine. — 6. sur milieu naturel.

Il ressort de ce tableau que *Polyporus adustus*, qui semble être un champignon à aneurine, se contente en réalité de la pyrimidine. Les autres espèces sont à pyrimidine + thiazol; incapables de faire la synthèse de P et T, elles peuvent encore les condenser en aneurine lorsque ces substances sont offertes comme facteur de croissance.

Pour *Polyporus squamosus*, *zonatus* 2 a b et *Hypholoma fasciculare* la croissance sur P + T est à peu de chose près semblable à celle sur aneurine. Pour *Polyporus abietinus* et *zonatus* 7 a' b' et *benzoinus*, la croissance est meilleure en présence de P + T qu'avec aneurine. Pour *Polyporus*

versicolor, l'aneurine agit plus favorablement que P + T. Pour *Polyporus adustus*, la pyrimidine remplace exactement l'aneurine. Il est pour l'instant difficile d'expliquer ces différences, qui se montrent constantes avec plusieurs cultures. Lorsque l'aneurine agit plus favorablement que P + T, on peut admettre que la resynthèse de la vitamine B₁ ne se fait pas complètement, ou trop lentement. Cependant le cas contraire, P + T plus actif que la vitamine reste inexpliqué.

Nous remarquons que sauf pour *Polyporus benzoïnus*, les cultures contrôles donnent des poids très faibles et que les résultats obtenus avec les facteurs de croissance sont tels que l'hétérotrophie par rapport à l'aneurine, à ses deux composants, ou à un seul des deux est indiscutable. A part les 6 espèces à P + T et l'espèce à P nous n'avons trouvé aucun organisme exigeant l'aneurine, molécule complète. Il y aurait un grand intérêt à étudier d'autres espèces voisines.

II. Ustilaginales.

Les besoins en aneurine (pyrimidine + thiazol) d'*Ustilago violacea* et d'*U. scabiosae* sont maintenant bien connus (11). Nous avons expérimenté avec les espèces suivantes, du même groupe: *Entyloma arnoseridis* Syd., *Tilletia horrida* Tak., *Tilletia tritici* (Bjrk) Wint. et *Tilletia levis* Kühn. Certains *Tilletia* ont été étudiés par Defago [communication personnelle du 19. 4. 39 (3)]. Il trouve pour *Tilletia tritici* un besoin en aneurine, molécule complète. Il existe pour ces espèces certaines difficultés d'inoculation.

Dans nos expériences *Tilletia levis* semble auxo-autotrophe, du moins par rapport à l'aneurine. Pour *Tilletia tritici* nous ne pouvons retrouver la nécessité en aneurine indiquée par Defago; le champignon croît faiblement sur milieu contrôle, un peu mieux sur P, PT et B₁. Les différences de souches et de mode d'inoculation sont peut-être la cause de ces différences. Les expériences

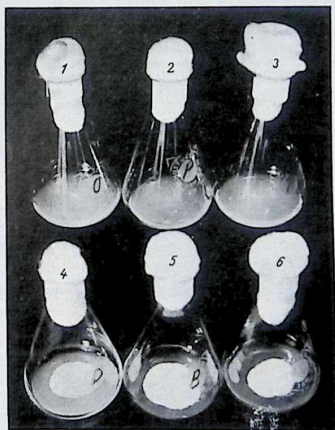


Fig. 2. Croissance de *Tilletia horrida*.
1. milieu contrôle. — 2. avec pyrimidine. — 3. avec thiazol. — 4. avec pyrimidine + thiazol. — 5. avec aneurine. — 6. sur milieu naturel.

ont été faites sur milieu liquide (voir formule ci-dessus) et sur milieu solide avec 2 % d'agar lavé trois fois à l'eau courante d'une manière prolongée¹.

Entyloma arnoseridis ne donne pas de résultats précis et semble auxo-autotrophe (par rapport à l'aneurine). Par contre les résultats sont très nets avec *Tilletia horrida*, qui est étudié pour la première fois à ce point de vue.

Sur milieu liquide, les résultats sont les suivants (tableau II):

Tableau II.

O	P	T	P + T	B ₁
1,4	0,6	2,2	57,6	50,2 mg

Ce champignon est un organisme typique à P + T.

Sur milieu solide, la culture apparait sous forme d'une croûte épaisse. Avec les milieux solides et liquides, il se produit un pigment d'un beau rouge-violacé qui diffuse dans le milieu et le colore intensément, avec aneurine et P + T surtout, mais aussi sur milieu naturel. Les faibles cultures contrôles ne produisent pas de pigment.

III. Sphaeriales.

Septoria apii (Br. et Cav.) Rostr., *Mycosphaerella confusa* Wolf, *M. sentina* Schroet., *M. grossulariae* (Fr.) Lindau (souches de Baarn). Ces espèces ont donné les résultats suivants.

Sur milieu liquide:

Septoria apii. (voir tableau III)

*Mycosphaerella confusa*² partout bon développement

*M. sentina*³ idem

*M. grossulariae*⁴ idem

Tableau III.

O	P	T	P + T	B ₁
15,0	75,6	9,8	120,0	149,5 mg
1,2	42,1	1,4	151,0	120,3 „
moyenne 8,1	58,8	5,7	135,5	134,9 mg

¹ Il est malgré tout difficile d'éliminer complètement les facteurs de croissance et autres substances favorisantes de l'agar. — ² La croissance est un peu meilleure avec B₁. — ³ O, P, T: développement faible, meilleur avec P + T et B₁. — ⁴ Aucune différence entre les cultures.

Sur milieu solide :

Septoria apii: partout bon développement, un peu meilleur avec P, P + T et B₁. La présence de facteurs de croissance dans l'agar doit être prise en considération.

Mycosphaerella confusa: partout bon développement; sauf sur les milieux contrôles, il apparaît un pigment brun-vert diffusant dans le milieu.

M. sentina: partout développement faible.

M. grossulariae: pas de différence, développement moyen. Nous pouvons donc mettre en évidence une espèce certainement auxo-hétérotrophe par rapport à l'aneurine, susceptible d'être fortement favorisée dans son développement par la vitamine B₁, ou par P + T, ou encore plus faiblement par la pyrimidine seule. Cet organisme est un champignon à pyrimidine incomplet; nous en avons déjà trouvé de semblables, *Absidia ramosa*, *Parasitella simplex* p. ex.

Avec *Mycosphaerella sentina*, les résultats sont moins clairs; cette espèce semble faiblement activée par l'aneurine et le mélange pyrimidine + thiazol.

Chaetomium elatum Kze et Schm, *Chaetomium bostrychoïdes* Zopf donnent lieu à un développement notable sur notre milieu et ne sont pas favorisés par l'aneurine ou ses constituants. Une accélération de croissance par d'autres facteurs n'est pas exclue.

Rosellinia thelena Auersw. ne prospère pas sur notre milieu et n'est pas influencée par l'aneurine.

IV. Plectascales.

Quelques champignons de ce groupe croissent bien sur notre milieu et ne sont pas influencés par l'aneurine et ses constituants: *Monascus purpureus* Went, *Penicillium camemberti* Thom (*Penicillium caseicolum* = *P. camemberti* Thom?), *Gymnoascus setosus* Eidam.

V. Endomycetales.

Pericystis apis.

Cette espèce qui produit le couvain calcifié des abeilles promettait d'être intéressante à maints égards. Elle n'a pas jusqu'à maintenant été étudiée du point de vue de ses facteurs de croissance. Claussen décrit son développement en 1921 et Mademoiselle Maurizio met en évidence l'existence de deux formes distinctes par la grandeur des carpophores, qu'il n'a pas été possible jusqu'à maintenant d'hybrider (6). Elles se distinguent morphologiquement par la grandeur du carpophore, mais aussi physiologiquement, dans leurs réactions à la température p. ex. Elles sont différentes de *Pericystis alvei*. Mademoiselle Maurizio indique comme favorable un milieu

semblable à celui que nous utilisons, mais enrichi avec 1⁰/₁₀₀ d'extrait de levure. Sur milieu synthétique aucune des formes ne se développe.

Elles sont indiscutablement hétérotrophes par rapport à leurs facteurs de croissance. Nous avons eu en main les deux formes, à grands fruits (no. 217 *Liebefeld-Bern*) et à petits fruits (no. 211 *Liebefeld-Bern*).

Action des divers extraits. La forme utilisée est celle à grands fruits. Résultats obtenus (tableau IV):

Tableau IV.

	0	$\frac{5}{100}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{5}{10}$	1	2	4 ccm
I	0,8	1	1	2,4	6,8	9,8	13,2 mg
II	—	2	3,6	13,2	30,4	37,2	51 „
III	—	5,8	11,4	23	35,4	34	40,2 „

I, Difco, II, Harris, III, Hoffmann-La Roche. Mêmes conditions de culture que pour *Torulopsis candida*.

Les extraits n'agissent pas dans le même ordre qu'avec *Torulopsis candida* (voir p. 211). L'extrait III est toujours le plus actif; l'extrait II l'est tout autant alors que pour *Torulopsis* il était le moins efficace. Ceci doit nous indiquer que les deux champignons réclament une autre constellation de facteurs de croissance.

Action des substances pures: Sur milieu synthétique, le petit fragment de thalle inoculé ne croît pas; avec adjonction de pyrimidine, de thiazol et d'aneurine, il n'y a aucune amélioration.

Les facteurs de croissance purs suivants furent utilisés: inositol, acide pantothénique de *R. J. Williams*, adermine (vitamine B₆) acide nicotinique, lactoflavine. Ces facteurs furent employés seuls ou en combinaisons diverses avec l'aneurine. Dans aucun des essais, la moindre accélération du développement ne fut observée.

Nous les avons combinés avec l'extrait Hoffmann-La Roche (III). Dans un second essai avec cet extrait les résultats furent les suivants:

$\frac{1}{10}$	$\frac{5}{10}$	1	4 ccm
19	62,7	72,5	83,5 mg

(moyenne de 3 déterminations).

Les poids sont notablement plus élevés que dans l'expérience précédente. Nous pouvons considérer la dose de $\frac{5}{10}$ de ccm comme suboptimale.

Les 6 facteurs ajoutés (tableau V) seuls, ou ensemble, à des doses qui devraient être suffisantes, sont incapables de compléter l'action de la dose suboptimale d'extrait de levure III. Si l'arrêt de croissance

Tableau V.
Extrait de levure seul ($\frac{5}{10}$ ccm) = 62,7 mg.

Facteurs ajoutés	2	10	20 γ
Extrait $\frac{5}{10}$ ccm + B ₁	53	60,5	62 mg
„ + inositol	—	51,0	54,5 „
„ + acide pantothénique	49	64,5	21,5 „
„ + adermine	37,5	48,5	59 „
„ + acide nicotinique	48	47	54,5 „
„ + lactoflavine		manque	
„ + les 6 facteurs sus-cités (moyenne de 3 déterminations)	61,7	60,2	64,2 „

en milieu synthétique est vraiment produit par une absence de facteurs de croissance, ce qui reste à prouver, ceux-ci doivent être recherchés ailleurs.

Erenascus fertilis Stoppel croît normalement sur notre milieu et n'est pas influencé par l'aneurine.

VI. Fungi imperfecti.

Torulopsis candida (Saïto) Lodder.

Cette espèce, qui croît difficilement sur milieu synthétique, mais très bien sur milieu naturel, fut étudié récemment par Rennerfelt (8).

Des cultures mixtes de cette espèce avec *Penicillium rugulosum* montrent un cas de stimulation unilatérale (7): *Torulopsis candida* est favorisé dans son développement par *Penicillium rugulosum*. L'agar, dans lequel les substances produites par le *Penicillium* ont diffusé permet une très belle croissance de *Torulopsis*. On peut donc admettre que *Torulopsis* a perdu le pouvoir de faire la synthèse de ses facteurs de croissance. Cette espèce complètement auxo-hétérotrophe les reçoit de *Penicillium* (auxo-autotrophe); ils se trouvent également dans la levure pressée et l'extrait de malt [Foghammar (1)].

Le cas semble présenter une certaine analogie avec celui que nous avons observé chez *Phycomyces blakesleeanus* (9, 10). Cette espèce, hétérotrophe par rapport à l'aneurine (pyrimidine + thiazol) ne croît pas sur milieu synthétique agarisé. Une infection de *Penicillium* déclanche une croissance intense des hyphes (autour de l'infection!). Pour l'instant on ne connaît chez *Phycomyces* qu'un seul facteur de croissance identifié chimiquement, l'aneurine (remplacée par la pyrimidine et le thiazol). Il faut donc admettre que le *Penicillium* livre à *Phycomyces* l'aneurine (ou l'ensemble pyrimidine + thiazol).

Il est vrai qu'autrefois Hoet (5) a démontré qu'avec le milieu de culture de *Penicillium* il était impossible de supprimer l'arrêt de croissance provoqué chez le rat par l'absence de facteur B. Nous savons aujourd'hui qu'un tel argument n'est pas probant et que le test animal n'est pas suffisamment sensible pour conférer une valeur quelconque à un résultat négatif. Un

organisme tel que *Phycomyces* qui pour 25 ccm de milieu réclame 0,5 γ de vitamine B₁, ou encore *Ustilago violacea* qui se contente de 0,01 γ pour 25 ccm de milieu doit être utilisé si l'on veut être certain qu'une substance ou un liquide est privé d'aneurine ou non. Sans contester la valeur de l'observation de Hoet, confirmée, par Deas (4), nous admettons donc que *Penicillium*, dans l'expérience de stimulation unilatérale, fournit à *Phycomyces* le facteur indispensable, probablement l'aneurine ou ses constituants.

Par contre Hoet montre que le milieu de culture utilisé de *Penicillium* est capable d'activer la croissance de la levure. Il contient donc très probablement les bios. Il est intéressant, en vérifiant l'expérience de Rennerfelt, de rechercher si le *Penicillium* livre également à *Torulopsis candida* l'aneurine ou ses constituants. Nous savons que l'aneurine ou ses constituants sont facteurs de croissance pour certaines espèces de *Torula*. Des essais effectués avec la pyrimidine, le thiazol, les deux ensemble et l'aneurine nous prouvent qu'avec notre milieu, il est impossible de déclencher le développement de *Torulopsis* avec la vitamine B₁ ou ses dérivés. Cependant la croissance est très intense sur milieu naturel, avec extrait de levure p. ex.

Ce cas de stimulation unilatérale ne peut donc être comparé avec celui de *Phycomyces-Penicillium*.

Nous avons utilisé les extraits concentrés suivants: I. Extrait de levure Difco; II. Extrait de levure Harris; III. Extrait concentré Hoffmann-La Roche 3163/4. Chacun des extraits est employé à la dose de 0,2 % ajouté au milieu synthétique et stérilisé avec lui.

Les résultats sont les suivants (tableau VI):

Tableau VI.

	0	5/100	1/10	5/10	1	2	4 ccm
I	5	20	23	38	36	43	52 %
	5	20	23	32	42	43	59 %
II	5	18	22	28,5	28	34	38 %
	5	16,5	20	24	32	38	37 %
III	5	32	36	50	54	58	55 %
	5	33	38	49	50,5	51	58 %
	5	29	36	55	53	53	50 %

Le développement est mesuré à l'aide de la cellule photoélectrique de Lange. Les chiffres se rapportent au pourcentage d'absorption de lumière.

Les cultures avec 2 et 4 ccm de l'extrait I sont légèrement jaunâtres. Ajoutons que les extraits de levures sont extrêmement concentrés et sont complètement solubles dans l'eau.

Dans l'ordre d'activité décroissant, les extraits de levure s'ordonnent de la manière suivante: Hoffmann-La Roche, Difco, Harris.

Avec III (Hoffmann-La Roche), le développement maximum, mesuré par néphélométrie, est atteint avec $\frac{5}{10}$ à 1 cm, avec I (Difco) la dose de 4 cm est nécessaire; avec II (Harris), le maximum n'est pas atteint dans notre expérience. En se basant sur les résultats de l'extrait III, nous constatons que le meilleur développement est obtenu avec 1 à 2 mg d'extrait ajoutés à 25 cm de notre milieu.

L'activation du développement doit être produite par d'autres facteurs de croissance que l'aneurine; ils agissent peut-être concurremment avec l'aneurine (synergisme) et restent à identifier; il n'est pas impossible qu'il s'agisse d'un ou plusieurs bios. L'adérmine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique n'ont pas été essayés avec cette espèce. Nous nous contentons d'indiquer pour le moment qu'elle ne réagit pas à la présence de l'aneurine tout en étant complètement auxo-hétérotrophe.

Dematium.

Dematium sp. (Maurizio, Liebefeld-Bern) réagit faiblement à la présence de thiazol, de pyrimidine + thiazol et d'aneurine.

Dematium pullulans De By et Löw, *Dematium Chodati* Netchich croissent bien sur milieu synthétique et ne réagissent pas à la présence de l'aneurine et de ses constituants.

Catenularia sp. croît normalement et semble autotrophe par rapport à l'aneurine.

Conclusions.

Cette étude nous permet de mettre en évidence les besoins exacts des *Polyporus* en facteur de croissance. Aucun n'exige vraiment l'aneurine, mais bien la pyrimidine et le thiazol ou la pyrimidine seule. Aucune des formes étudiées n'est vraiment liée à la molécule complète de la vitamine B₁. Parmi les *Ustilaginées*, *Tilletia horrida* se révèle comme un organisme à pyrimidine + thiazol. Parmi les *Mycosphaerellacées*, *Septoria apii* est un organisme à pyrimidine + thiazol (incomplètement à pyrimidine). Parmi les *Imperfecti* nous confirmons la forte auxo-hétérotrophie de *Torulopsis candida* en indiquant qu'elle n'est pas due à l'aneurine ou à ses constituants. La stimulation unilatérale *Torulopsis candida*-*Penicillium rugulosum* est différente de la stimulation *Phycomyces*-*Penicillium* sp. La forte auxo-hétérotrophie de *Pericystis apis* est mise en évidence. L'aneurine ou ses constituants ne semble jouer aucun rôle de même que 5 autres substances cristallisées employées.

Pour *Torulopsis candida* comme pour *Pericystis apis*, les facteurs indispensables sont à rechercher dans les extraits de levure concentrés, complètement hydrosolubles. Les constellations de facteurs requis par ces deux espèces sont différentes. Il est probable qu'il s'agit réellement de facteurs de croissance, mais il reste à examiner si une modification

quantitative ou qualitative du milieu utilisé ne serait pas capable de suffire au développement.

Il est singulier qu'aucun des champignons étudiés et dépendant de l'aneurine ou de ses constituants ne se révèle comme un organisme à thiazol. Le cas de *Mucor Ramannianus* étudié par W. Müller reste jusqu'à maintenant unique (6a, 9).

Nous sommes redevables de l'aneurine, de la pyrimidine, du thiazol, de la lactoflavine et de l'extrait de levure aux Etablissements Hoffmann-La Roche, Bâle (Dr. M. Guggenheim), de l'aneurine et de l'adernine à la I. G. Farbenindustrie (Prof. Hörlein) et de l'acide pantothénique au Dr. R. J. Williams. Nous les remercions vivement, ainsi que Mademoiselle Maurizio pour les souches qu'ils nous ont fournies.

Travaux cités.

- 1) S. Foghammer, Bot. Not. 421, 1938. — 2) N. Fries, Symbolae botan. Upsaliensis III, 2, 1938. — 3) G. Defago, Bull. Soc. botan. suisse 49, 413, 1939. — 4) J. Deas, J. of biol. Chem. 61, 5, 1924. — 5) J. Hoet, Arch. intern. Physiol. 19, 129, 1922. — 6) A. Maurizio, Bull. Soc. bot. suisse 44, 133, 1935. — 6a) W. Müller et W. H. Schopfer, C. r. acad. Sci. Paris, 205, 687, 1937. — 7) G. Papacostas et J. Gaté, Les associations microbiennes. Leurs applications thérapeutiques, Encyclop. scientifique, Gaston Doin, Paris 1928. — 8) E. Rennerfelt, Svensk Botanisk Tidskrift 32, 332, 1938. — 9) W. H. Schopfer, Ergebn. d. Biol. 16, 1—172, 1939. — 10) Idem, C. r. Soc. physique hist. nat. Genève 50, 152, 1933. — 11) W. H. Schopfer et S. Blumer, Arch. f. Mikrobiol. 9, 305, 1938.

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Dresden.)

Erfahrungen mit neuen, lang feucht bleibenden Trägern für Nährlösungen an Stelle von Agar.

Von

Friedrich Tobler.

(Eingegangen am 24. April 1940.)

Im Verlauf der langjährigen Kulturversuche, die ich mit Flechten und Flechtenpilzen in verschiedenster Weise angestellt habe, stand ich sehr häufig vor der Aufgabe, gerade bei diesen Gegenständen Kulturen über weit längere Zeit unberührt stehenlassen zu müssen, weil infolge des besonders langsamen Wachstums vor Ablauf einer Frist von einem halben oder mehr als einem Jahre wenig Ergebnisse zu erwarten waren. Überimpfung kam nicht in Frage und so hatte ich sehr häufig mit Schwierigkeiten zu kämpfen insofern, als Agarnährböden während solcher Zeitdauer austrockneten und damit entweder ein Ergebnis überhaupt hinfällig wurde oder aber doch wesentlich veränderte Wachstumsbedingungen für die Objekte entstanden. Ich bemühte mich daher seit mehreren Jahren darum, festzustellen, ob es nicht auch andere als Träger für Nährlösungen geeignete und selbst möglichst indifferente Materialien gäbe, die man gegebenenfalls an Stelle des Agar setzen könnte. Wenn ich heute einige von diesen, übrigens in meiner zusammenfassenden Darstellung der Flechtenkulturmethoden¹ schon angedeuteten Erfahrungen wiedergebe, so geschieht das mit folgenden Einschränkungen:

1. bin ich mir vollständig darüber im klaren, daß die von mir herangezogenen neuen Träger für Nährlösungen nur dann in Frage stehen, wenn *Durchsichtigkeit des Substrats nicht verlangt wird*;

2. ist bei ihnen allen eine weit größere *Unebenheit der Oberfläche* mit in Kauf zu nehmen als sie beim Agar sonst geboten wird und selbstverständlich begrüßt werden muß. Aber es kommt ja in vielen Fällen, und nicht nur bei meinen Objekten, nicht darauf an, die Kulturgefäße (z. B. Petrischalen) unmittelbar im durchfallenden Licht zu betrachten, sondern vielmehr nur darauf, überhaupt ein Wachstum feststellen und später vielleicht losgelöste Objekte oder Objektteile zu zergliedern und zu beobachten. Und diese letztgenannten Möglichkeiten bestehen bei einer Reihe von neuen Materialien nach meinen Erfahrungen durchaus. Ich füge endlich noch von vornherein hinzu, daß als besonders brauchbar mir

¹ Fr. Tobler, Kultur von Flechten in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. XII, 2, 1498, 1939.

meine neuen Methoden bei der Benutzung von *Petrischalen* erscheinen, mache allerdings dabei die Voraussetzung, die man auch sonst weit mehr zu machen gut täte als es gewöhnlich geschieht, nämlich, daß man wirklich gut schließende und genau zueinander passende Petrischalenteile benutzt. Hierzu sei nebenbei bemerkt, daß ich längst für solche dauerhafte Kulturen, bei denen Verdunstung starke Gefahr bedeutet, nur *best abgepaßte und in Deckel wie Boden mit Nummern versehene Schalen* benutze. Sämtliche Erfahrungen in der Verdunstung gehen auf mindestens allmonatlich wiederholte genaue Wägungen der bezifferten Schalen zurück. Die Kulturen wurden ausgeführt mit *Flechten*, *Flechtenpilzen*, einer Reihe *Schimmelpilzen*, *Orchideenwurzelpilzen*, umfangreichere Kolonien bildenden *Bakterien* wie *B. prodigiosum*, farbigen *Luftseifen* u. a. m.

I. Bekanntlich wurden von jeher und namentlich früher für Pilze und auch Flechten, Agarnährböden mit organischen Lösungen von nicht genau bekannter Zusammensetzung verwandt (Malzextrakt, Bierwürze usw.). Von derartigen Erfahrungen ging ich aus, als ich mich zuerst mit *Torf* als Unterlage befaßte. Gut gereinigter, mehrfach gründlich ausgespülter und gleichmäßig weitgehend zerkleinerter Torf bietet günstige Möglichkeiten. Am vorteilhaftesten ist es dabei, einen reinen *Sphagnumtorf* zu wählen. Dieser bietet stofflich tatsächlich so gut wie gar nichts, was bei der Ernährung darauf wachsender Objekte eine Rolle spielen könnte. Er nimmt aber wie *Sphagnum* im allgemeinen, Lösungen ja außerordentlich gut auf, und so fällt es nicht schwer, einen solchen feinkrümeligen Torf mit Lösungen gleichmäßig zu durchtränken. Die Schicht wird im allgemeinen kaum höher als 2 mm (in trockenem Zustand) in die Petrischale gebracht. Bei der Durchfeuchtung quillt sie etwa auf die doppelte Höhe auf, was also ganz flache Petrischalen ausschließt.

Die Oberfläche wird nach der Aufquellung unebener als sie es vorher ist, aber für viele Gegenstände ist das belanglos. Das Feuchtbleiben von Torf zeigt sich aber ganz erstaunlich groß. Ich habe Petrischalen im Brutschrank bei Temperaturen von 20 bis 25° *weit über 1 Jahr in angemessener Feuchtigkeit halten können*, womit also die Leistung eines Agarnährbodens in dieser Beziehung bei weitem übertroffen ist. Die Abnahme der Feuchtigkeit vollzieht sich zuerst keineswegs schneller, sondern bleibt vollkommen gleichmäßig. In jedem Monat wird nur etwa $\frac{4}{10}$ % des Gesamtgewichts abgegeben, so daß auch nach Ablauf eines Jahres ein kaum merkbarer Verlust vorhanden ist.

Ebenso wie *Sphagnumtorf* ließ sich auch reines zerkleinertes *Sphagnum* unmittelbar verwenden, so wie dieses in der Gärtnerei üblich ist zur Kultur von Orchideen usw.

II. Im Anschluß hieran bemühte ich mich auch bereits, mit bestimmten Stoffen getränkten Torf, sog. *Huminal* der I. G. Farbenindustrie A.-G., heranzuziehen und habe auch hiermit guten Erfolg gehabt. Im Huminal sind im wesentlichen Gaben von Kali und Stickstoff enthalten, was man bei der Benutzung entsprechend berücksichtigen kann. Im übrigen ist auch dieser Stoff dem Torf sehr ähnlich, doch scheint mir die Feuchtigkeitsabgabe etwas größer zu sein als bei reinem *Sphagnum*torf. Es geht das offenbar darauf zurück, daß der zur Herstellung des Huminal hergestellte Torf nicht reiner *Sphagnum*torf gewesen ist. Jedenfalls habe ich auch mit Huminal gefüllte Petrischalen *über 1 Jahr lang so erfreulich feucht halten können*, wie es niemals bei Agarnährböden der Fall gewesen ist.

III. Ich habe weiter eine brauchbare Unterlage finden können in *Vistraabfällen*, die ich der Freundlichkeit der Hersteller verdankte. Vistra ist reine Cellulose und also für die Allgemeinheit vieler zu kultivierender Objekte völlig indifferent bei der Ernährung. Vermöge ihres Baues saugt sie aber außerordentlich gut wässrige Lösungen auf und hält sie entsprechend fest. Anscheinend wirkt dabei der im Querschnitt sehr stark und vielfach eingeschnittene Umriss der Oberfläche sehr günstig auf die Festhaltung der Flüssigkeit. Ein besonderer Vorteil dieses Materials ist die schöne weiße Farbe, auf der sich die Objekte ausgezeichnet abheben. Unzweckmäßig ist es aber, die Zerkleinerung des Materials durchzuführen, weil zu kurze Stückchen der Kunstfäden natürlich weniger gut feucht bleiben als längere. Auf der anderen Seite ist es aber bei längeren Stücken weit schwieriger, eine einigermaßen glatte Oberfläche herzustellen. Ich versuchte zunächst, das Material durch Zerpfeifen in trockenem Zustand gleichmäßig auf dem Boden der Schale auszubreiten. Wenn das auch gelungen schien, so ergaben sich, infolge eingetretener Zusammenballungen beim Aufquellen, doch beträchtliche Höhenunterschiede, was die Benutzung weniger angenehm machte.

Ich versuchte daher zunächst, gleichmäßig gestrecktes Material auszubreiten, konnte das aber bei den zur Verwendung gelangenden Abfällen verhältnismäßig schwer erreichen. Eine Besserung ließ sich aber herbeiführen dadurch, daß ich möglichst gleichmäßig hergestellte Lagen angefeuchtet zunächst stark preßte und diese, nach der Größe der Petrischale zurecht geschnittenen flachen Kuchen einlegte und quellen ließ. Damit bekam man eine wesentlich verbesserte glatte und weiße Fläche, auf der die Objekte sich sehr gut halten ließen. Es wäre eine rein technische Aufgabe anderer Stellen, solches Abfallmaterial in dieser Beziehung maschinell zweckmäßig zu formen. Was nun die Feuchthaltung der Vistraabfälle als Unterlagen betrifft, so ist hier allerdings die Dauer nicht ganz so günstig wie bei Torfunterlagen. Im allgemeinen

sind solche Böden in längstens 4 bis 5 Monaten ausgetrocknet. Es kommt allerdings darauf an, was man für Lösungen verwendet. Nährbouillon z. B. hält sich wesentlich länger als mineralische Lösungen und es könnte allerdings bei Kulturen mit solchen Substanzen diese Unterlage besonders empfohlen werden. Ich habe jedenfalls Kulturen auch mit *Vistra* 5 Monate gut zu halten vermocht.

Im Anschluß hieran sei bemerkt, daß ich auch Abfälle von anderen Kunstfasern zur Benutzung herangezogen habe. Es ist interessant, daß sie je nach der Form der Kunstfaser zum Teil auch weniger gut geeignet sind, weil sie die Feuchtigkeit, z. B. bei glatter Oberfläche, weniger gut halten. Ebenso sind aber auf manchen Kunstfasern auch künstliche Überzüge vorhanden, die die Feuchtigkeit weniger gut aufnehmen lassen, wodurch auch schnellere Eintrocknung eintritt.

Es war ursprünglich die Absicht, eine umfangreiche Untersuchung auf diesem Gebiet vorzunehmen und noch dadurch zu vertiefen, daß von den einzelnen als Unterlage benutzten Stoffen auch Analysen bezüglich der in ihnen enthaltenen Stoffe hergestellt wurden. Diese Untersuchung ist aber — unter meiner Leitung begonnen und erfolgreich fast zu Ende geführt — zu meinem großen Bedauern dann liegen geblieben und dürfte kaum mehr veröffentlicht werden. Der Kern ihres Inhalts war aber der, daß jedenfalls sehr geringe Stoffmengen in den betreffenden Böden von Beginn an vorhanden sein dürften, noch dazu durch Auswaschung einigermaßen sicher entfernt werden können und daß ihnen daher keine Rolle bei der Ernährung selbst zufällt. Im ganzen sind jedenfalls die hier erwähnten und erprobten Unterlagen vielleicht geeignet, einen *Ersatz für Agar* unter gewissen Umständen zu bieten, eine Tatsache, die durchaus nicht nur mit Rücksicht auf die gegenwärtige Zeit, sondern auch auf die Wünsche nach lange feucht bleibenden Kulturen, eine gewisse Bedeutung haben kann.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität
in Prag.)

Vitamine als vermehrungsbegrenzende Faktoren bei *Haematococcus pluvialis*.

Von

Karl Ondratschek.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. April 1940.)

In einer vorangegangenen Mitteilung (Ondratschek, 1940) wurde gezeigt, daß *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung durch Ascorbinsäure, in einer Nährlösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle durch Aneurin in seiner Vermehrung wesentlich gefördert wird. Bestimmte Versuche in der genannten Arbeit zeigten auf, daß die Zellenzahl durch die vermehrungsfördernde Wirkung der beiden Vitamine innerhalb der ersten 8 bis 10 Tage der Versuchsdauer mehr oder minder rasch zunimmt, nach diesem Zeitpunkt aber fast gänzlich unverändert bleibt.

Es schien nun zweckmäßig, ergänzende Versuche darüber anzustellen, was das Absinken der Vermehrungsintensität veranlaßt. Nach der obengenannten Mitteilung kamen im wesentlichen nur zwei Faktoren in Frage: der völlige Verbrauch der anfänglich zugesetzten Vitamingenomen oder der durch Aufbrauchen der Nährstoffe verursachte Mangel an lebenswichtigen Verbindungen. Zur Klärung dieser Fragen wurden die im folgenden geschilderten Versuche angestellt.

Ein Eingehen auf die Methodik kann hier unterbleiben, da alles Nötige in der genannten Mitteilung (Ondratschek, 1940) enthalten ist.

Zur Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung wurde die folgende Nährlösung verwendet: KNO_3 0,1 %, K_2HPO_4 0,001 %, MgSO_4 0,001 %, CaCl_2 0,001 % und FeCl_3 0,0001 %. Die Reaktion der Nährlösung lag 24 Stunden nach der Sterilisation (= Zeitpunkt der Beimpfung) um $p_H = 7,0$.

Um gleichzeitig die Kohlensäureassimilation und die Aufnahme organischer Nährstoffe zu ermöglichen, deren gleichzeitiges Stattfinden in einer folgenden Mitteilung behandelt werden soll, wurde die folgende Nährlösung verwendet: Na-Acetat 0,2 %, Asparagin 0,1 %, K_2HPO_4 0,001 %, MgSO_4 0,001 %, CaCl_2 0,001 % und FeCl_3 0,0001 %. Reaktion um $p_H = 7,0$.

Zur Herbeiführung heterotropher Ernährung wurde die gleiche Lösung wie oben verwendet, die Kulturen jedoch im Dunkeln gehalten.

Jede der genannten Nährlösungen erhielt dann folgende Zusätze: Zu einem Teil der Nährlösung kam 0,0001 % Aneurin, zu einem anderen

Teil 0,0001 % Ascorbinsäure, und ein dritter Teil blieb ohne Zusatz zur Kontrolle.

Die Beimpfung erfolgte mit einer homogenen *Haematococcus*-Aufschwemmung derart, daß zu jedem Versuchsröhrchen 1 Tropfen Aufschwemmung mit ungefähr 25 Zellen zugesetzt wurde.

Innerhalb der ersten zehn Versuchstage nahm die Zahl der Zellen in der Volumeinheit in der gleichen Weise zu, wie es in der vorangegangenen Arbeit aufgezeigt wurde. Nach 10 Tagen erfolgte ein neuerlicher Zusatz von Vitaminen bzw. Nährstoffen, und zwar derart, daß zu je einem Teil der Röhrchen der drei genannten Versuchsgruppen Aneurin, zu je einem weiteren Teil Ascorbinsäure, zu je einem dritten Teil Nährstoffe zugesetzt wurden, alle in der gleichen Konzentration, wie anfänglich angewendet worden war. Ein je vierter Teil der Röhrchen blieb ohne weiteren Zusatz. Nach weiteren 10 Tagen Versuchsdauer ergab sich folgendes:

A. Bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht.

1. Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt (Abb. 1).

Ein zweiter Zusatz von Ascorbinsäure ließ die Vermehrung neuerdings ansteigen, bis nach 6 bis 8 Versuchstagen eine maximale Zellen-

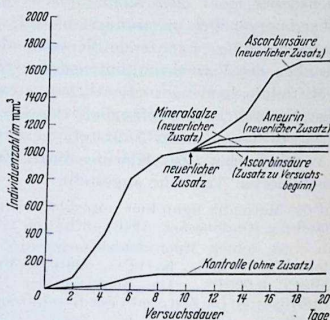


Abb. 1. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung mit Ascorbinsäure.

zahl im cmm erreicht war, welche durch weitere Zusätze des gleichen Vitamins nicht mehr gesteigert werden kann. Ein Zusatz von Aneurin am zehnten Versuchstage läßt jedoch nur unmerklich die Vermehrung neuerlich ansteigen. Ebenso hat ein Zusatz von anorganischen Nährsalzen keine neuerliche, vermehrungsanregende Wirkung.

2. Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt (Abb. 2).

Ein Ascorbinsäurezusatz am zehnten Versuchstage bewirkt eine bedeutende Zunahme der Zellenzahl, die Ernteerträge sind von gleicher Höhe wie bei Züchtung in einer Lösung, der vom Anfang an Ascorbinsäure zugesetzt war. Eine neuerliche Beigabe von Aneurin, wie auch von Mineralsalzen ändert nichts an der Höhe des Ernteertrages.

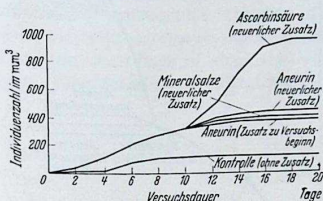


Abb. 2. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung mit Aneurin.

B. Bei Züchtung in einer Nährlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

1. Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt (Abb. 3).

Innerhalb der ersten 10 Versuchstage steigt die Zellenzahl in der üblichen Weise an, ein am zehnten Tage erfolgter neuerlicher Zusatz

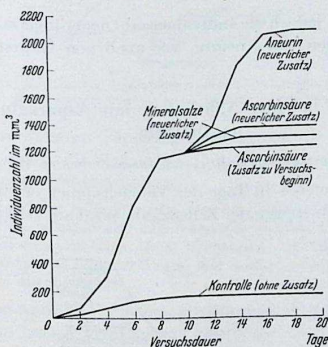


Abb. 3. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht. Ascorbinsäurezusatz.

von Ascorbinsäure hat keinen vermehrungsfördernden Einfluß, eine Beigabe von Aneurin hingegen läßt den Zellertrag auf das Doppelte ansteigen. Zusätze von Nährstoffen (Asparagin, Acetat und Mineralsalze) ändern nichts am vorhergehenden Zustand.

2. Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt (Abb. 4).

Während der ersten 10 Versuchstage nimmt die Zahl der Zellen im cmm in ähnlicher Weise zu, wie bei Züchtung in der gleichen Nährlösung mit Ascorbinsäure. Ein am zehnten Tage erfolgter Zusatz von

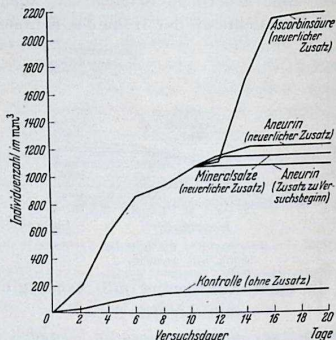


Abb. 4. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht. Aneurinzusatz.

Ascorbinsäure läßt jedoch die Individuenzahl neuerdings stark ansteigen. Neuerliche Beigaben von Aneurin, wie auch von Nährstoffen bleiben ohne Erfolg.

C. Bei Züchtung in einer Nährlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

1. Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt (Abb. 5).

Während der ersten 10 Tage der Versuchsdauer bewirkt Ascorbinsäure ein mäßiges Ansteigen der Zellenzahl. Wird am zehnten Versuchs-

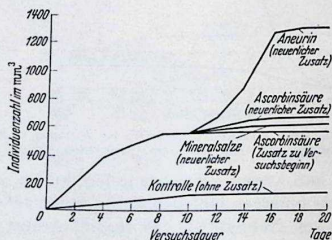


Abb. 5. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln. Ascorbinsäurezusatz.

tage neuerdings Ascorbinsäure zugesetzt, so unterbleibt eine weitere Steigerung, setzt man hingegen Aneurin zu, so nimmt die Zahl der Zellen im cmm in starkem Maße neuerdings zu. Ein Zusatz der üblichen Nährstoffe bleibt auch hier ohne nennenswerten Einfluß.

2. Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt (Abb. 6).

Die am zehnten Versuchstag zum Abflauen gelangte Vermehrung wird durch einen Ascorbinsäurezusatz nicht mehr gesteigert. Setzt man hingegen Aneurin neuerdings zu, dann tritt eine starke Zunahme der Zellenzahl ein. Eine Beigabe von Nährstoffen bleibt auch hier ohne Wirkung.

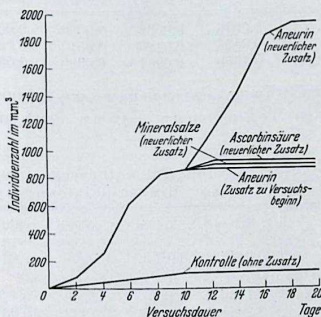


Abb. 6. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln. Aneurinzusatz.

In einigen weiteren Versuchsreihen wurden die eben aufgezeigten Verhältnisse durch Bestimmungen des Trockengewichts der Ernteträge zusätzlich sichergestellt.

Zur Verwendung gelangten die gleichen Nährlösungen und Vitaminzusätze wie eben besprochen. Die Versuche wurden mit 250 ccm Lösung in 300-ccm-Erlenmeyerkolben aus Schottglas Nr. 20 durchgeführt, die Beimpfung erfolgte in gleicher Weise wie vorher. Jeder einzelne Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Die ersten nach 10 Versuchstagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen hatten das folgende Ergebnis.

Tabelle I. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0142	0,0156	0,0162	0,0153	—
Mit Ascorbinsäure	0,1256	0,1302	0,1296	0,1285	8,4
Mit Aneurin	0,0550	0,0592	0,0521	0,0554	3,6

Tabelle II. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0256	0,0248	0,0253	0,0252	—
Mit Ascorbinsäure	0,1685	0,1829	0,1765	0,1760	7,0
Mit Aneurin	0,1564	0,1694	0,1698	0,1652	6,7

Tabelle III. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0076	0,0082	0,0062	0,0077	—
Mit Ascorbinsäure	0,0526	0,0426	0,0512	0,0488	6,3
Mit Aneurin	0,1060	0,0987	0,0920	0,0989	12,9

Die nach weiteren 10 Tagen, also nach insgesamt 20-tägiger Versuchsdauer durchgeführten Bestimmungen ergaben dann die folgenden Trockengewichte.

Tabelle IV. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20-tägiger Züchtung in reiner Mineralsalzlösung am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0146	0,0159	0,0162	0,0156	—
Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1266	0,1310	0,1286	0,1287	8,2
Ascorbinsäure	0,2061	0,1989	0,1992	0,2014	13,0
Aneurin	0,0130	0,0136	0,0139	0,0135	8,7
Mineralsalzen	0,0141	0,0136	0,0132	0,0136	8,7
Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,0602	0,0596	0,0615	0,0604	3,9
Ascorbinsäure	0,1246	0,1262	0,1241	0,1246	8,9
Aneurin	0,0625	0,0636	0,0629	0,0630	4,0
Mineralsalzen	0,0611	0,0624	0,0613	0,0616	3,9

Tabelle V. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20-tägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0284	0,0276	0,0290	0,0283	—
Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1812	0,1802	0,1831	0,1815	6,4
Ascorbinsäure	0,2016	0,2112	0,2002	0,2043	7,4
Aneurin	0,3261	0,3224	0,3241	0,3242	11,5
Mineralsalzen	0,1946	0,1960	0,1938	0,1950	6,9
Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1656	0,1662	0,1676	0,1665	5,9
Ascorbinsäure	0,3368	0,3376	0,3372	0,3372	11,9
Aneurin	0,1702	0,1720	0,1722	0,1715	6,1
Mineralsalzen	0,1700	0,1689	0,1680	0,1690	6,0

Tabelle VI. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20tägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0082	0,0079	0,0083	0,0081	—
<i>Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:</i>					
Kein Zusatz	0,0500	0,0497	0,0506	0,0501	6,3
Ascorbinsäure	0,0562	0,0571	0,0555	0,0563	7,0
Aneurin	0,1210	0,1192	0,1196	0,1199	14,8
Mineralsalzen	0,0520	0,0509	0,0526	0,0518	6,4
<i>Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:</i>					
Kein Zusatz	0,1006	0,0989	0,1019	0,1005	12,4
Ascorbinsäure	0,1065	0,1046	0,1075	0,1060	13,1
Aneurin	0,2104	0,2111	0,2109	0,2108	27,0
Mineralsalzen	0,1102	0,1092	0,1098	0,1097	13,5

Besprechung der Versuchsergebnisse.

In den vorstehenden Versuchsreihen konnte der Beweis dafür erbracht werden, daß das Abnehmen der Vermehrung mit zunehmender Versuchsdauer nur auf dem Verbrauch des zugesetzten Vitamins beruht. Bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht, wie auch in einer Lösung mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Dunkeln liegen die Verhältnisse einfach: im ersteren Falle ist, wie früher schon festgestellt, Ascorbinsäure der für die Vermehrung notwendige Wachstumsfaktor. Die anfänglich zugesetzte Menge von 0,0001 % ist nach 8 bis 10 Tagen verbraucht, ein neuerlicher Zusatz des gleichen Vitamins läßt die Vermehrung aufs neue ansteigen. Das gleiche gilt auch für den oben an zweiter Stelle genannten Fall, nämlich für Aneurin bei Ernährung mit organischen Stoffen.

Bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung am Licht hat aber auch Aneurin eine gewisse Wirkung, wenn auch die erzielten Ernteerträge hinter den mit Ascorbinsäure erzielten beträchtlich zurückbleiben. Ein neuerlicher Zusatz von Aneurin am zehnten Tage hat aber *keinen* weiteren vermehrungsfördernden Einfluß, hingegen läßt neuerlich zugesetzte Ascorbinsäure die Vermehrung wiederum ansteigen.

Ganz gleich liegen die Verhältnisse bei Züchtung von *Haematococcus pluvialis* in einer Nährlösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und Ascorbinsäurezusatz im Dunkeln. Das C-Vitamin wirkt auch hier nur schwach fördernd, ein weiterer Zusatz nach 10 Tagen ist wirkungslos, nur ein Zusatz von Aneurin ist imstande, die Vermehrung wieder ansteigen zu lassen.

Auch hier wiederum sehen wir, daß Ascorbinsäure der maßgebende Faktor bei der autotrophen, Aneurin bei der heterotrophen Ernährungsweise ist.

Bei Züchtung von *Haematococcus pluvialis* in einer Lösung mit organischen Nährstoffen am Lichte, also unter „mixotrophen Bedingungen“, sehen wir hingegen eine ungefähr gleich starke Wirkung von Ascorbinsäure und Aneurin. In beiden Fällen läßt sich der Ernteertrag durch neuerliche Beigabe des gleichen Vitamins nicht mehr steigern, wohl aber dann, wenn wir der ursprünglich ascorbinsäurehaltigen Nährlösung Aneurin, bzw. der anfänglich aneurinhaltigen Lösung Ascorbinsäure zufügen. Dann bekommen wir in beiden Fällen ein erneutes Ansteigen der Vermehrungskurve.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß die Vermehrung allein von dem zur Verfügung stehenden Vitamin beeinflusst wird. Ist dieses verbraucht, dann kann nur ein neuerlicher Vitaminzusatz die Vermehrung wieder ansteigen lassen. Ein weiterer Zusatz von Nährsalzen hat keine Wirkung.

Literatur.

K. Ondratschek, diese Zeitschr. 11, 89, 1940. Hier weitere Literaturangaben.

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Das gleiche gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzuliefern. Diktirte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und in gutem Deutsch geschrieben sein. Arbeiten in den anderen Kongresssprachen können nur aufgenommen werden, wenn es sich um die Muttersprache des Autors handelt. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Ergebnisse gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens eine Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hingegen können besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden¹⁾.
6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Kurze, aber erschöpfende Figurenunterschrift erübrigt nochmalige Beschreibung im Text. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur *ein* gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Tabelle und Kurve. *Farbige* Bilder können nur in seltenen Ausnahmefällen Aufnahme finden, auch wenn sie wichtig sind. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.
7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen ohne Titel der Arbeit nur mit Band-, Seiten-, Jahreszahl. Titelangabe nur bei Büchern.
8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen zwecks Erweckung des Anscheins größerer Kürze ist unzulässig.
10. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
11. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig hingegen sind einzelne Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet, oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften*, *Habilitationsschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

¹⁾ Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

Handbuch der Virusforschung

Herausgegeben von

Professor Dr. R. Doerr und Professor Dr. C. Hallauer

Basel

Bern

Zuletzt erschienen:

Zweite Hälfte

Die Virusarten als infektiöse Agenzien. — Die Immunität gegen Virusinfektionen. — Die Technik der experimentellen Erforschung phytopathogener Virusarten

Bearbeitet von J. Craigie, Toronto, R. Doerr, Basel, G. M. Findlay, London, C. Hallauer, Bern, K. M. Smith, Cambridge, O. Thomsen, Kopenhagen

Mit 19 Abbild. im Text. XVI, 838 Seiten. 1939. RM 96.—; gebunden RM 99.—

Inhaltsübersicht: Fünfter Abschnitt. **Die Virusarten als infektiöse Agenzien.** 1. Natürliche und experimentelle Übertragung. Von R. Doerr, Basel. 2. Der qualitative Virusnachweis. — Anreicherungsverfahren. Von R. Doerr, Basel. 3. Der quantitative Virusnachweis. Von R. Doerr, Basel. 4. Die Ausbreitung der Virusarten im Wirtsorganismus. Von R. Doerr, Basel. 5. Die Tropismen und unspezifischen Lokalisationen der Virusarten. Von R. Doerr, Basel. 6. Variation in Viruses. By G. M. Findlay, London. 7. Virusarten als tumorerzeugende Agenzien. Von O. Thomsen, Kopenhagen. — Sechster Abschnitt. **Die Virusarten als Antigene und die erworbene Immunität gegen Virusinfektionen.** 1. Die Antigenfunktionen und die serologischen Reaktionen der Virusarten in vitro. Von J. Craigie, Toronto (Kanada). 2. Die erworbene Immunität gegen Virusinfektionen. Von C. Hallauer, Bern, unter Mitwirkung von F. Magrassi, Rom. — Siebenter Abschnitt. **The principles of Plant virus Research.** By Kenneth M. Smith, Cambridge. — Anhang: A. Tabellarische Zusammenstellung der tierpathogenen Virusarten. Von R. Doerr, Basel. — B. Tabellarische Zusammenstellung der bisher bekannten phytopathogenen Virusarten. Von Kenneth M. Smith, Cambridge. — Sachregister für die erste und zweite Hälfte des Handbuchs.

Früher erschien:

Erste Hälfte

Die Entwicklung der Virusforschung und ihre Problematik. — Morphologie der Virusarten. — Die Züchtung der Virusarten außerhalb ihrer Wirte. — Biochemistry and biophysics of viruses

Bearbeitet von F. M. Burnet, Melbourne, R. Doerr, Basel, W. J. Elford, London, G. M. Findlay, London, M. Haitinger, Wien, C. Hallauer, Bern, M. Kaiser, Wien, W. M. Stanley, Princeton

Mit 71 zum Teil farbigen Abbild. im Text. XII, 546 Seiten. 1938. RM 66.—; geb. RM 69.—

Inhaltsübersicht: Erster Abschnitt. **Die Entwicklung der Virusforschung und ihre Problematik.** Von R. Doerr, Basel. — Zweiter Abschnitt. **Morphologie der Virusarten.** A. Die Viruselemente: 1. The sizes of viruses and bacteriophages, and methods for their determination. By W. J. Elford, London. — 2. Die Fluoreszenzmikroskopie. Von M. Haitinger, Wien. — 3. Die Färbungsmethoden der Viruselemente. Von M. Kaiser, Wien. — B. Inclusion bodies and their relationship to viruses. By G. M. Findlay, London. — Dritter Abschnitt. **Die Züchtung der Virusarten außerhalb ihrer Wirte.** A. Die Viruszüchtung im Gewebsexplantat. Von C. Hallauer, Bern. — B. The growth of viruses on the chorioallantois of the chick embryo. By F. M. Burnet, Melbourne. — Vierter Abschnitt. **Biochemistry and biophysics of viruses.** By W. M. Stanley, Princeton, N. J.

Das Werk wird nur vollständig abgegeben

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN WIEN

Hierzu vier Beilagen vom Verlag Julius Springer

Verlag von Julius Springer in Berlin. — Verantwortlich für den Anzeigenteil: Albert Meyer, Berlin-Steglitz, Kühlebornweg 5. — Pl. 3. — Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig. — Printed in Germany