

Fall zwingt uns anzunehmen, dass in dem Filtrate der Kupfer-Kalkbrühe zu wenig Kupfer gelöst ist, um auf die Pilzsporen zu wirken, welche jedenfalls nicht so empfindlich wie Spirogyrazellen sein werden, dass aber bei Gegenwart von Kupferhydroxyd und lebenden Pflanzenzellen eine dauernde Bewegung sich ablösender Kupfertheilchen nach den Pflanzenzellen hin stattfindet, welche eine Art Anziehung darauf ausüben dergestalt, dass sie mit einem Kupferbelag sich bedecken, der nun seine physiologischen Wirkungen auf die Zelle wird ausüben können. Die Art dieser Wirkung halten wir auch hier mit NÄGELI nicht für eine rein chemische, sondern für eine katalytische, fermentartige, also für die eines Reizmittels, welches je nach dem Organismus, auf den es wirkt, bald schädlichen, bald günstigen Charakter haben kann.

Pflanzenphysiologisches Institut der kgl. landwirthschaftlichen  
Hochschule zu Berlin.

#### 4. Albert Schneider: Beitrag zur Kenntniss der Rhizobien.

(Vorläufige Mittheilung.)

Eingegangen am 21. Januar 1894.

Trotz weitläufiger und in vielen Fällen gründlicher Untersuchungen über Rhizobien ist unsere Kenntniss ihrer Lebensgeschichte noch sehr unvollständig. Irrthümliche Schlussfolgerungen verschiedener Forscher sind wahrscheinlich die Hauptursache, dass wir nicht näher am Ziele sind. Der Ansicht, dass es mehrere Arten der Rhizobien giebt, treten bis jetzt nur wenige Forscher<sup>1)</sup> bei, hauptsächlich, weil eine so bekannte Autorität wie FRANK behauptet, dass es nur eine Art gebe, nämlich das *Rhizobium leguminosarum*. Dass FRANK jedoch im Irrthume ist, scheint ziemlich festgestellt.

Sämmtliche Forscher berichteten schon über Rhizobienculturen, waren aber etwas wortkarg über die Culturerscheinungen. Die Ursache sollte mir aber bald klar werden. Vergangenes Jahr machte ich wiederholte Versuche Reinculturen der verschiedenen Rhizobienarten zu bekommen. Bei diesen Versuchen beabsichtigte ich ursprünglich, so weit als möglich, die Rhizobien unter natürlichen Bedingungen zu

1) BEYERINCK, Bot. Ztg. 1888 und 1890. — BOLLEY, Agr. Science, Vol. VII No. 2, 1892. — SCHNEIDER, Bull. Torr. Bot. Club, 1892.

züchten, das heisst, sozusagen, ich versuchte die Rhizobien unter wurzelknöllchenartigen Umgebungen zu züchten. In den Knöllchen ist das Rhizobium folgenden Hauptbedingungen ausgesetzt: 1. Es nährt sich von einer pflanzlichen Nährlösung. 2. Diese Nährlösung hat eine saure Reaction. 3. Es lebt und vermehrt sich im Dunklen. — Ueber die Bereitung der Nährlösungen will ich an dieser Stelle nicht in die Einzelheiten eingehen. Ich gebrauchte Pflanzenextracte mit Agar, welche ich auf folgende Weise herstellte: Ungefähr  $\frac{1}{2}$  kg der rein-gewaschenen Wurzeln oder von Stamm mit Blättern wurde fein zerhackt und dann mit 1 Liter destillirtem Wasser 24 Stunden ausgelaugt. Die breiartige Masse wurde dann tüchtig ausgepresst und genügend Agar zur Flüssigkeit gethan, um ihr eine gallertartige Consistenz zu geben. Die Lösung war nun, nachdem sie filtrirt war, zum Gebrauche fertig. Ich fand, dass Wurzelextracte eine saure Reaction hatten, Stamm- und Blätter-extracte noch mehr als Wurzel. Für jede Rhizobienart stellte ich eine eigene Nährlösung her. Um z. B. das Rhizobium der *Melilotus albus*-Knöllchen zu züchten, gebrauchte ich *Melilotus albus*-Extracte (Wurzel und Stamm mit Blättern). Ich machte auch neutrale und schwach alkalische Lösungen, indem ich Natroncarbonat hinzufügte. Noch andere wurden mit verschiedenen Quantitäten Peptonum, Pancreatin, Zucker, Salz u. s. w. versetzt.

Da einige Forscher behaupteten, Culturen der sogenannten Bacteroiden (*Rhizobium mutabile*) bekommen zu haben, glaubte ich, dass es mir nicht schwer fallen würde, Rein- oder annähernd Reinculturen derselben zu erhalten. Darin fand ich mich aber sehr getäuscht. Kürzlich hat ATKINSON<sup>1)</sup> über Bacteroiden berichtet. Er behauptet, Culturen in *Vicia*-Extract bekommen zu haben. Genaueres über Reinculturen, Wachstumsfähigkeit u. s. w. bleibt in seiner Mittheilung aus.

Die ersten Culturversuche stellte ich mit *Rhizobium mutabile* von *Melilotus albus* an. Dieser Pilz ist mit dem Rhizobium verschiedener *Trifolium*-Arten identisch, nur erleidet er keine so grossen Formveränderungen innerhalb der Wurzelknöllchen. Ich trug die Rhizobien aus völlig erwachsenen, gesund aussehenden Knöllchen auf *Melilotus albus*-Wurzelextract mit Agar über. Dass dabei grosse Vorsicht erforderlich ist, um das Eindringen fremder Organismen zu verhindern, ist selbstverständlich. Die geimpften Nährlösungen wurden in Reagensgläsern in ein dunkles Zimmer gestellt. Die Temperatur war die gewöhnliche Sommertemperatur des Laboratoriums. In drei bis vier Tagen bemerkte ich in den Wurzelagar-Lösungen eine kleine weissliche, etwas zähe, erhöhte Cultur. Die Untersuchung ergab, dass keine oder nur wenige zerstreute Bacteroiden anwesend waren. Die Masse der Cultur bestand aus geraden, ungefähr zwei bis drei Mal so lang

1) Bot. Gazette, May, June, July 1893.

als breiten Rhizobien. Sie waren ungefähr 2 bis 2,5  $\mu$  lang und 0,6  $\mu$  breit. Die Sporen und die im Wachsen begriffenen Rhizobien waren beweglich. Die Bewegung ist eine schnelle, unregelmässige. Sie ziehen kreuz und quer in der Flüssigkeit umher. Je zäher die Lösung, desto langsamer die Bewegung. In einem hängenden Wassertropfen kann man ihre eigenthümliche Bewegung sowie Zooglöenbildung gut verfolgen. Manchmal kommen mehrere in Contact und bleiben an einander hängen. Nach längerem Hin- und Herreissen, währenddem noch andere hängen bleiben, kommt die Masse endlich zur Ruhe. Dass sie gewöhnlich mit der Längsachse nebeneinander liegen bleiben, ist das Resultat ihrer Gesamtkräfte. Tiefe Färbung mit HOFMANN's Violett oder ZIEHL'scher Fuchsinlösung stellt die Anwesenheit von Cilien fest. Ein jeder bewegliche Organismus hatte gewöhnlich zwei Cilien, eine an jedem Ende; oft war nur eine anwesend. Sporen hatten oft drei bis vier. Nach längerem Ruhen gehen die Cilien verloren; wenigstens war es mir unmöglich, dieselben an Zooglöen bildenden Rhizobien festzustellen.

Nachdem diese Culturen ungefähr einen Monat alt waren, veränderte sich ihre Farbe von Weiss in Gelblich, und ihre Substanz wurde etwas fester. Die Untersuchung zeigte, dass viele der Rhizobien an jedem Ende eine Spore trugen. Nur wenige bewegliche Sporen und Rhizobien waren zu finden. Ich fand nur wenige, öfters gar keine Bacteroiden. Das bewegliche Rhizobium stimmt in Form und Sporenbildung so ziemlich mit der von mir<sup>1)</sup> als *Rhizobium Frankii* var. *majus* beschriebenen Art überein. Nur ist es, wie die Messungen angeben, etwas kleiner. Ich glaubte daher mein früher hypothetisch aufgestelltes *Rhizobium Frankii* gefunden zu haben und werde es einstweilen als solches ansehen. So lange meine Beobachtungen währten, zeigte *Rhizobium Frankii* keine Formveränderung. In keiner Hinsicht hat es dabei etwas mit den Bacteroiden gemein.

Trotz wiederholter Versuche mit verschiedenen Nährlösungen schien es unmöglich zu sein, Reinculturen der Bacteroiden zu bekommen. In einer Nährlösung von *Melilotus*-Stamm- und Blätterextract mit Agar war eine Zeit lang keine Veränderung zu sehen. Nach acht bis zwölf Tagen zeigte sich in einigen Versuchen eine ganz leichte, wässerige Cultur. Sie bestand aus wenigen, stark veränderten Bacteroiden. Sie waren oft verästelt oder sternartig verzweigt und enthielten stark veränderte Sporen. Diese Culturen starben nach kurzer Zeit ganz aus. Versuche, sie auf anderen Nährlösungen fortzupflanzen, gelangen mir nicht. Sie hatten wahrscheinlich ihre Vermehrungsfähigkeit gänzlich verloren. Das waren die einzigen Reinculturen der Bacteroiden, die ich erhielt.

1) Bull. Torr. Bot. Club, July 1892, oder Rev. Mycologique, April 1893.

Die genauere Untersuchung des Inhalts der Wurzelknöllchen von *Melilotus albus* und der verschiedenen Culturversuche stellte folgendes fest: Die Knöllchen enthalten zwei vorherrschende Rhizobienarten. Die eine, die sogenannten Bacteroiden, ist mit dem Cytoplasma innig vermischt. Die zweite Art ist beweglich und mischt sich nie mit dem Cytoplasma, sondern befindet sich immer in den sogenannten Infectionsfäden. In manchen Knöllchen, hauptsächlich in den älteren, findet man noch einzelne andere Arten mit den zwei Hauptarten vermischt. Da es unmöglich ist, von einem Knöllchen zu impfen, ohne dass man wenigstens zwei Arten bekommt, so ist es leicht begreiflich, warum es so schwer fällt, eine Reincultur zu bekommen. Das bewegliche Rhizobium, welches ich, wie angegeben, *Rhizobium Frankii* nenne, vermehrt sich viel schneller als die Bacteroiden, und seine grosse Anzahl verhindert das Aufkommen der letzteren. Ebenso verhält es sich innerhalb der Knöllchen. Die zwei Hauptarten inficiren einige Zellen der jungen Wurzelepidermis und verursachen in Folge des geäusserten Reizes eine Meristembildung. *Rhizobium Frankii* vermehrt sich am schnellsten, und durch seine Bewegung wird das Cytoplasma veranlasst, sie mit einer Cellulosemembran zu umschliessen. Das Wachsthum der Fäden mit den Rhizobien hält dann Schritt mit dem Wachsthum des Knöllchens. Die Rhizobien sind ja im wahren Sinne die Ursache der Knöllchenbildung. Die Fäden werden auf folgende Weise verursacht: Das Rhizobium bewegt sich vor- und rückwärts in einer Bahn, parallel mit seiner Längsachse. Sind zwei oder mehr bei einander, so bewegt sich ein jedes nicht in seiner eigenen Bahn im Cytoplasma umher, denn dazu ist das Cytoplasma zu widerstandsfähig. Ein jeder Organismus bewegt sich in einer Bahn des geringsten Widerstandes, das heisst, ein zweiter bewegt sich vor- und rückwärts parallel mit dem ersten, ein dritter mit den ersten zwei u. s. w. Der Faden verlängert sich polwärts, weil das die Bahnen der grössten Kraftanwendungen sind. Theoretisch würde der Faden in gerader Linie fortwachsen; es kommen aber andere Kräfte in Thätigkeit, welche ausserhalb der Rhizobien selbst liegen. Diese verursachen die Verzweigungen, Krümmungen und Schwellungen der Fäden. Der Faden wächst so lange in die Breite, als die Cellulosewand nicht fest genug ist, um weiteres Ausbreiten zu verhindern.

Um in Kürze auf die Leguminoseninfection einzugehen, kann ich MOELLER, FRANK und PRAZMOWSKI nicht beistimmen, wenn sie behaupten, dass Bacterien junge Cellulosewandungen zu durchdringen vermögen. Noch weniger kann ich, auf Grund meiner Beobachtungen, mit MOELLER<sup>1)</sup> übereinstimmen, wenn er angiebt, dass Rhizobien

1) Ber. d. deutsch. bot. Ges., H. 5, 1892.

Cellulose zu lösen vermögen. Dass die Rhizobien auf irgend eine Weise in die Wurzelzellen gelangen, ist gewiss, aber, wie es mir scheint, gerade noch nicht richtig erklärt. Es sind wahrscheinlich Kräfte ausserhalb der Rhizobien dabei behülflich, z. B. die Druckkraft zwischen Wurzel und Erde. Die Infection in Wasserculturen scheint dem zu widersprechen. Jedoch kann hier auch gegenseitiger Druck der Epidermiszellen stattfinden, welcher unserer Beobachtung entgeht. Nach meinen Beobachtungen konnte ich keine Auflösung der Fädenmembranen durch die Rhizobien feststellen. Die Fäden sind ebenso permanent wie die Zellwände, insoweit sie denselben an Dicke gleich sind. Ich finde sie stets in alten, völlig erwachsenen Knöllchen anwesend. Wenn natürliche Zersetzungsprocesse anfangen die Knöllchen zu zerstören, gehen die Fäden wegen ihrer Zartheit am ersten zu Grunde. Von einem Durchdringen der Zellwände kann gar nicht die Rede sein. Dazu besitzen die Rhizobien nicht Kraft genug. Nie findet man eine Schwellung, Buchtung oder Formveränderung in den durchdrungenen Zellwänden, wie es bei einer anhaltenden Kraftanwendung, wenngleich einer geringen, vorkommen würde. Die Auflösung der Cellulose durch die Rhizobien scheint mir sehr unglaublich; denn es ist schwer zu begreifen, warum die Rhizobien an einer Stelle Cellulose lösen sollen, während sie an anderen Stellen damit eingeschlossen werden. Nach meiner Ansicht geschieht das augenscheinliche Durchdringen der Zellwand in folgender Weise. — Ein Faden beginnt in einer inficirten Zelle. Die dabei verursachte Störung leitet die Zelle zur Theilung. Der Faden wächst mehr in die Länge. Die neue Zellwand wird um den Faden herum gebaut. Der Faden wird dadurch verhindert, sich weiter auszubreiten oder eingeschnürt. Das erklärt auch die Schwellungen an jeder Seite der Zellwand. Wie schon angegeben, sind die Fäden mit Rhizobien und deren Sporen angefüllt. Culturversuche mit den Fäden im hängenden Tropfen zeigten, dass sie völlig unfähig sind zu wachsen und dass die enthaltenen Sporen und Rhizobien sich ohne Fadenbildung weiter vermehren. Die sogenannten Infectionsfäden sind also der lebenden Pflanzenzelle etwas eigenthümliches, verursacht durch die Anwesenheit der beweglichen Rhizobien.

Ich komme nun wieder zu den Rhizobienculturen zurück. Wie angegeben gelang es mir nicht, eine Reincultur der Bacteroiden zu bekommen, welche nicht bald der Erschöpfung unterlag. Mit anderen Rhizobienculturen fand ich dieselben mehr oder weniger vermischt; dies unterstützt meine frühere Behauptung, dass die Bacteroiden (*Rhizobium mutabile*) am weitesten verbreitet sind. Im hängenden Tropfen bemerkte ich, dass sie sich durch Sporen sowie durch Zweitheilung vermehren. Eine Spore, welche sich zum Wachsen anschickt, vergrössert sich beinahe auf das Doppelte, worauf der Sporen-

schlauch hervorwächst. Die normalen sowie die stark veränderten Bacteroiden tragen Sporen. Die von FRANK, MOELLER und PRAZ-MOWSKI beschriebenen sonderbaren Inhaltkörper der degenerirten Bacteroiden in *Pisum*-, *Trifolium*- und *Medicago*-Arten sind nach meiner Ansicht chemisch veränderte Sporen, welche ihre Wachstumsfähigkeit verloren haben. Sie färben sich tief mit den meisten Färbemitteln. Xylol, Benzol, Aether, Chloroform und Nelkenöl löst sie öfters theilweise, manchmal ganz auf. Natürlich sind mikrochemische Reactionen allein nicht zuverlässig zur Schlussziehung über die Natur dieser Körper. Ich stimme MOELLER bei, dass es vielleicht fettig degenerirte Eiweisskörper sind, glaube aber, dass die ursprüngliche Morphologie und Herkunft dieser Eiweisskörper die der Sporen ist.

Culturversuche mit *Pisum sativum*-Knöllchen stellten fest, dass auch hier zwei Rhizobienarten anwesend sind. Eine, die kleinere, befand sich nur in den Fäden. Sie stimmt in allem bis auf die Grösse mit *Rhizobium Frankii* überein. Es ist das von mir anderswo angegebene *Rhizobium Frankii* var. *minus*. Die zweite und grösste Art glaubte ich früher zu den Bacteroiden gehörig. Sie ist jedoch kleiner, mehr regelmässig kugelig rund, trägt gewöhnlich eine, manchmal zwei Sporen oder sogenannte degenerirte Inhaltkörper. Sie erleidet keine solchen Formveränderungen wie die Bacteroiden. Ich habe diese Art provisorisch *Rhizobium sphaeroides* genannt. Am besten glückten Culturversuche mit *Phaseolus vulgaris*-Knöllchen. Sie enthalten gewöhnlich nur eine Rhizobienart, nämlich *Rhizobium Frankii* var. *majus*, manchmal auch *Rhizobium curvum*. Diese zwei Arten scheinen nahe verwandt zu sein. Ihre Entwicklungsfähigkeit ist ungefähr gleich. Diejenige, welche in grösster Anzahl in die Nährlösung kommt, behält die Oberhand. Oefters war *Rhizobium Frankii* auch anwesend und überwucherte alle anderen anwesenden Rhizobien nach kurzer Zeit.

Wie nach früheren Untersuchungen mitgetheilt, stellte ich das Rhizobien-System bloss aus morphologischen Gründen auf. Meine jetzigen Culturversuche, obgleich noch nicht beendigt, stehen bis jetzt mit den morphologischen Gründen im Einklang. Nach vielen Versuchen fand ich, dass Leguminosenwurzel-Extract mit Agar im Dunklen am besten geeignet ist, approximale Reinculturen der Rhizobienarten zu züchten. Die Abwesenheit des Lichtes und die saure Reaction hält so ziemlich andere Luft-, Wasser- und Erdbakterien fern. Die Unterscheidung der verschiedenen Rhizobienarten ist, wie angegeben, eine weit schwierigere Sache. Ohne weiter darauf einzugehen, gebe ich in folgender Tabelle die Culturresultate an. In den angegebenen Fällen wurde *Melilotus albus*-Wurzel-Agar-Extract als Nährlösung gebraucht. Alle Culturen wurden im Dunklen bei der gewöhnlichen Sommertemperatur des Laboratoriums gezogen. Am auffallendsten ist der Farbenwechsel der Culturen.

	Arten	Cultur, Vermehrung	Farbenwechsel	Andere Merkmale
1	<i>Rhizobium mutabile</i> von <i>Melilotus albus</i> .	Sehr langsam. 8 bis 10 Tage. Bald erschöpft.	Farblos, weisslich. Später etwas grau.	Verzweigt, nicht beweglich. Grosse Formveränderung. Mehrsporig.
2	<i>Rhizobium Frankii</i> var. <i>majus</i> von <i>Phaseolus vulgaris</i> .	Mässig schnell. 3 bis 4 Tage.	Anfangs weiss. Später dunkelgrau. Schwarz?	Nicht beweglich? Keine Formveränderung. Zweisporig. Sporen endständig.
3	<i>Rhizobium Frankii</i> von <i>Melilotus</i> -Fäden.	Schnell. 2 bis 4 Tage. Dauerhaft.	Anfangs weiss. Später gelblich.	Beweglich (Cilien). Keine Formveränderung. Zweisporig.
4	<i>Rhizobium Frankii</i> var. <i>minus</i> von <i>Pisum</i> -Fäden.	Schnell. 2 bis 4 Tage.	Anfangs weiss. Später gelblich.	Beweglich (Cilien). Keine Veränderung. Zweisporig.
5	<i>Rhizobium curvum</i> von <i>Phaseolus vulgaris</i> .	Mässig schnell. 3 bis 4 Tage.	Anfangs weiss. Später schwarz.	Nicht beweglich. Kein Formwechsel. Gebogen. Zweisporig.
6	<i>Rhizobium nodosum</i> von <i>Cassia cham.</i>	Mässig schnell. 4 bis 5 Tage.	Weiss bis grau.	Nicht beweglich. Ketten bildend. Mehrsporig.
7	<i>Rhizobium sphaeroides</i> n. sp., von <i>Pisum sativum</i> .	Sehr langsam. Bald erschöpft.	Röthlich bis rostfarbig.	Nicht beweglich. Ein- oder zweisporig.

Mit *Rhizobium dubium* habe ich noch keine Culturversuche angestellt. Ein sonderbares Rhizobium entdeckte ich diesen Sommer in *Petalostemon violaceus*-Wurzelknöllchen. Es ist vielmals grösser und mehr verzweigt als das normale *Rhizobium mutabile* von *Melilotus albus*. Es ist mehrsporig. Ich fand nur drei oder vier dieser Organismen in jeder Zelle, gewöhnlich nahe der Zellwand. Wegen Mangel an Material kann ich jetzt keinen weiteren Bericht darüber abstaten.

Illinois Experiment Station zu Champaign, U. S. A.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1894

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Schneider Albert

Artikel/Article: [Beitrag zur Kenntniss der Rhizobien. 11-17](#)