

- Fig. 8. *Melosira mutabilis* n. subsp. Fadenstück vom Müggelsee. Eine grobporige Anfangszelle *a* mit Dorn; Porenreihen in der oberen Hälfte der Pervalvarachse parallel, in der unteren schräg zu derselben, beide Hälften ungleich hoch. — Zwei gemischtporige Zellen *c*; die beiden grobporigen Hälften der früheren Mutterzelle ungleich hoch, Porenreihen sigmaförmig; die feinporigen jungen Hälften gleich hoch, Porenreihen sigmaförmig. Der Faden enthält auch noch feinporige Zellen *b*.
9. *Melosira punctata* n. subsp. Fadenstück vom Müggelsee. Eine feinporige Zelle *b* mit sigmaförmigen Porenreihen. In den beiden anhängenden Hälften sind die Porenreihen nur durch Linien angedeutet. Der Faden enthält nur feinporige Zellen *b*.
10. *Melosira punctata* n. subsp. Forma *subtilissima* n. f. Fadenstück vom Müggelsee. Aneinander hängende Hälften von zwei feinporigen Nachbarzellen *b*. Der Faden enthält nur feinporige Zellen *b*.

45. W. Benecke und J. Keutner: Über stickstoffbindende Bakterien aus der Ostsee.

Vorläufige Mitteilung aus dem Botanischen Institut der Universität Kiel.

Mit 4 Textfiguren.

Eingegangen am 23. Juni 1903.

Unter den ernährungsphysiologischen Problemen, welche die Meerespflanzen der Forschung darbieten, steht die Frage noch ungelöst, ja unbearbeitet da: Ob es im Meere Organismen pflanzlicher Natur gibt, welche die Fähigkeit haben, bei geeigneter Nahrungs- und Energiezufuhr gasförmigen Stickstoff zu binden und denselben dadurch indirekt auch der Assimilation durch andere Lebewesen zugänglich zu machen.¹⁾

Durch die vorliegende Mitteilung beabsichtigen wir diese Lücke auszufüllen; es soll, zunächst für die westliche Ostsee, nachgewiesen werden, dass sowohl am Meeresgrunde als auch im Wasser selbst Mikroorganismen hausen, welchen die gekennzeichnete wertvolle Fähigkeit eignet, wie das für die Ackererde seit BERTHELOT's²⁾ Untersuchungen bekannt ist.

1) Vgl. dazu: J. REINKE, Algenflora der westlichen Ostsee, 1893, S. 15. — H. H. GRAN, Studien über Meeresbakterien I, Bergens Museums Aarbog, 1901, Nr. 10, S. 4 des Sep.-Abdr. — Derselbe, Das Plankton des norwegischen Nordmeeres. Rep. on norweg. Fish. and mar. investigations, Vol. II, 1902, Nr. 5, S. 119.

2) Comptes rendus, 1885, Bd. 101, S. 175.

Wir gliedern unsere Darstellung in zwei Teile: im ersten wird der Nachweis erbracht werden, dass in geeigneten Kulturflüssigkeiten, welche mit einem Gemisch von Meeresbakterien geimpft werden, eine Zunahme gebundenen Stickstoffs stattfindet; im zweiten geben wir einen vorläufigen Überblick über die Bakterienflora, welche wir in solchen Kulturen sich entwickeln sahen.

I.

Wie alle anderen Forscher, die bisher auf stickstoffbindende Bakterien fahndeten, verwendeten auch wir WINOGRADSKY's „elektive Kulturmethode“, d. h. Nährlösungen, welche, abgesehen von Stickstoffverbindungen, alle anderen Nahrungsstoffe in zureichender Menge und günstiger Qualität enthielten; als Nährsalze dienten Dikaliphosphat und Magnesiumsulfat, als Kohlenstoff bezw. Energiequelle Mannit oder Dextrose, als Lösungsmittel reines, filtriertes Ostseewasser. Zu einigen Kulturen, durch die der Einfluss einer geringen Menge anfänglich zugegebenen, gebundenen Stickstoffs studiert werden sollte, wurden einige Milligramm Ammonsulfat zugefügt. In vielen Fällen wurde Kreide im Überschuss zugesetzt, um etwa entstehende Säuren zu binden. Über Volumen und Konzentration der Nährlösungen findet man das Nähere in der unten folgenden Tabelle. Als Kulturgefässe dienten Erlenmeyerkolben verschiedener Grösse, die mit der Nährlösung beschickt, mittels Wattepfropf verschlossen, durch dreimaliges Sterilisieren an drei aufeinander folgenden Tagen keimfrei gemacht und hierauf beimpft wurden.

Als Impfmateriale verwendeten wir bald grössere, bald kleinere Mengen von Schlick oder Mudd, der verschiedenen Stellen des Meeresgrundes der Kieler Förde entstammte, z. B. der Gegend der „Heulboje“ aus 14 *m* Tiefe; oder eine Platinöse voll Plankton, welches etwa $\frac{1}{2}$ *m* unter der Wasseroberfläche möglichst weit draussen auf freier See bei Nordwind gefischt worden war. Es ist überflüssig, zu betonen, dass bei dem Einsammeln des Impfmateriale eine Infektion desselben peinlichst vermieden wurde.

Die geimpften Kulturkolben blieben zum grössten Teil bei Zimmertemperatur stehen, zum kleineren Teil gelangten sie in den Thermostaten (27°). Die Luft hatte entweder durch die Watte ungehinderten Zutritt zur Nährlösung, oder wurde auch vorher mit Kalilauge und Schwefelsäure gewaschen, ohne dass dadurch das Ergebnis geändert worden wäre. Auch einzelne anaerobe Kulturen wurden angesetzt; es gelangten in diesem Fall die Kulturen unter geräumige Glasglocken, innerhalb derer die Luft mittels alkalischer Pyrogallolösung von Sauerstoff befreit wurde.

Als allgemeines Resultat war zu verzeichnen, dass in allen auf

die geschilderte Weise gewonnenen Kulturen über kurz oder lang ein reichliches Bakterienleben sich entfaltete; der makroskopische Anblick des Kulturverlaufes war ein ganz ähnlicher, wie wir ihn seit den klassischen Untersuchungen WINOGRADSKY's¹⁾ über *Clostridium Pastorianum* kennen. Zunächst trat eine geringe Trübung und Hautbildung auf; alsbald setzte in den meisten Kulturen lebhaftige Gärung ein, an der, nach dem Geruch zu urteilen, Buttersäuregärung einen starken Anteil hatte. Häufig bildeten sich dicke, schleimige Massen an der inneren Wandung der Kulturgefässe im Niveau der Nährlösung. Wie bei solchen Rohkulturen nicht anders zu erwarten, war im übrigen der Verlauf ein ausserordentlich ungleichmässiger; als durchgehendes Resultat ergab sich nur, dass die Gärung (d. h. makroskopisch sichtbare Gasentwicklung) um so kräftiger war, je höher die Nährlösung in den Gefässen stand, dass sie ferner in den Dextrosekulturen viel lebhafter, wie in den Mannitlösungen vor sich ging, schliesslich dass sie in Schlickkulturen kräftiger war als in Planktonkulturen; in diesen entwickelte sich die Bakterienvegetation wohl auch ganz ohne äusserlich sichtbare Gasentbindung. Bei Zimmertemperatur gediehen die Kulturen langsamer als im Thermostaten.

Da die Kulturen, abgesehen von den wenigen Fällen, in welchen mit reichlichen Mengen von Schlick geimpft worden oder anfänglich $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in kleinen Dosen zugesetzt war, höchstens spurenweise Stickstoffverbindungen führten, liess sich aus dem eben geschilderten Kulturverlauf schon mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit das keineswegs wunderbare Ergebnis folgern, dass auch im Meere Stickstoffbindung durch Bakterien stattfindet. Sicherheit konnte aber immerhin nur die chemische Analyse bieten.

Diese wurde in den meisten Fällen folgendermassen ausgeführt: Es wurden zwei vollkommen identische Parallellösungen hergestellt, sterilisiert, mit derselben Menge Schlick, bzw. Plankton beimpft, hierauf die eine derselben abermals sterilisiert, schliesslich nach beendeter Versuchsdauer beide analysiert; die Differenz im Stickstoffgehalt ergab dann die Menge des in der einen durch Bakterientätigkeit gebundenen Stickstoffs. Die Analyse wurde in der üblichen Weise nach KJELDAHL ausgeführt; in den Fällen, in welchen möglicherweise durch grössere Mengen von Impfmateriale Nitratstickstoff in wägbaren Mengen eingeführt worden war, nach JODLBAUR. Die genauere Schilderung der analytischen Methoden wird in einer später erscheinenden ausführlichen Arbeit erfolgen.

Die Analysen hatten nun das zu erwartende Ergebnis, dass tatsächlich in unseren Kulturen eine Stickstoffbindung stattgefunden hatte; zum Beleg geben wir im folgenden die Resultate einiger Ana-

1) Arch. d. scienc. biol. St. Pétersbourg 1895, Bd. 2, S. 297.

lysen tabellarisch wieder; es handelt sich dabei zunächst um Kulturen, welche mit Schlick beimpft, bei Luftzutritt und Zimmertemperatur gediehen. Der Vergleich derselben mit Planktonkulturen, ferner mit Kulturen, die im Thermostaten und solchen, die unter anaëroben Bedingungen erwachsen, soll erst in der späteren Arbeit erfolgen. Wenn als Impfmateriel „Mannitkultur“ angegeben ist, so heisst dies, dass die betreffende Kultur geimpft wurde aus einer Mannitlösung, die vor etwa einem Jahre (Juli 1902) mit einer geringen Menge Schlick von der Heulboje beschickt worden, bald in lebhaft Gärung übergegangen war und inzwischen vollkommen abgeregnet hatte. Alles andere ergibt sich unmittelbar aus den Tabellen:

Kulturflüssigkeit (Versuch 1—8).

Ostseewasser	100	g
Dextrose	4	„
K ₂ HPO ₄	0,04	„
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,02	„
± CaCO ₃	0,2	„
ausserdem in Nr. 7: (NH ₄) ₂ SO ₄	0,004	„

Nr. des Versuchs	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Mit oder ohne CaCO ₃	Impfmaterial	Milligramm N in der geimpften Kultur	Milligramm N in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoffgewinn in 100 ccm
1	8. Febr. bis 22. April	74	+	Schlick	22 ¹⁾	6	16
2	8. Febr. bis 22. April	74	—	„	15	6	9
3	9. Febr. bis 22. April	73	+	Mannitkultur	17	0,3	16,7
4	9. Febr. bis 22. April	73	—	„	10	0,28	9,72
5	9. Febr. bis 22. April	73	+	„	10	0,3	9,7
6	11. Febr. bis 24. April	73	—	„	2	0,3	1,7
7	11. Febr. bis 24. April	73	+	„	26	1,25	24,75
8	11. Febr. bis 24. April	73	—	„	3	0,2	2,8

Kulturflüssigkeit (Versuch 9—12).

Ostseewasser	100	g
Mannit	4	„
K ₂ HPO ₄	0,1	„
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,05	„
± CaCO ₃	0,25	„

1) Um ganz sicher keinen zu hohen Stickstoffgewinn anzugeben, haben wir die Zahlen dieser Kolumne nach unten auf ganze Milligramm abgerundet. In Versuch 1—8 standen die Kulturen während der Monate März und April im kalten, ungeheizten Zimmer.

Nr. des Versuchs	Kulturzeit	Anzahl der Tage	Mit oder ohne CaCO_3	Impfmaterial	Milligramm N in der geimpften Kultur	Milligramm N in der geimpften, dann sofort sterilisierten Kultur	Stickstoffgewinn in 100 <i>ccm</i>
9	23. April bis 26. Mai	34	+	Mannitkultur	6	0,21	5,79
10	23. April bis 26. Mai	34	—	„	1,3	0,4	0,9
11	23. April bis 26. Mai	34	+	„	5,3	0,28	5,02
12	23. April bis 26. Mai	34	—	„	3	0,23	2,77

Kulturflüssigkeit (Versuch 13—16).

Ostseewasser	100	<i>g</i>
Dextrose	4	„
K_2HPO_4	0,1	„
$\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	„
$\pm \text{CaCO}_3$	0,25	„

13	23. April bis 28. Mai	36	+	Schlick	7	0,3	6,7
14	23. April bis 28. Mai	36	—	„	1,17	0,28	9,89
15	23. April bis 28. Mai	36	+	„	6	0,27	5,73
16	23. April bis 28. Mai	36	—	„	2,9	0,23	2,67

Unterziehen wir diese analytischen Ergebnisse einer kurzen Diskussion: Zuerst zeigt sich, dass in den Kulturen, welchen anfänglich kein gebundener Stickstoff zugesetzt wurde, und welche nicht mit grösseren Mengen Schlick geimpft waren (d. h. abgesehen von Versuch 1, 2, 7), der Gehalt an gebundenem Stickstoff in den sterilisierten Parallelkulturen stets weniger als $\frac{1}{2}$ *mg* Stickstoff betrug, woraus wir folgern dürfen, dass in den Kulturen, in welchen wir nach beendeter Kulturdauer etwa 1 *mg* Stickstoff fanden, mit grösster Wahrscheinlichkeit, in denjenigen, in welchen diese Menge noch grösser war, mit voller Sicherheit eine Bindung gasförmigen Stickstoffs stattgefunden hatte. Ferner erwies sich der Zusatz von Kreide stets als vorteilhaft, was bei der starken Buttersäureproduktion nicht Wunder nehmen kann. Schliesslich zeigt sich, durchaus im Einklang mit den von WINOGRADSKY verzeichneten Erfahrungen, dass die Stickstoffbindung durch anfängliche Zugabe geringer Mengen gebundenen Stickstoffes, etwa 4 *mg* Ammonsulfat zu 100 *ccm*, erheblich in die Höhe getrieben werden kann (cf. Versuch Nr. 7). Im Übrigen ist die Höhe des Gewinnes an gebundenem Stickstoff eine ausserordentlich schwankende, was bei solchen Mischkulturen eigentlich selbstverständlich ist; auch andere Autoren, die mit stick-

stofffixierenden Landbakterien arbeiteten, haben ganz dieselben Erfahrungen gemacht. Wir fanden als Maximum etwa 25, als Minimum etwa 1 mg gebundenen Stickstoff bei Darbietung von 4 g Dextrose bezw. Mannit als Energiequelle, die übrigens in den tabellarisch verzeichneten Kulturen niemals vollkommen aufgebraucht wurden; die von anderen Autoren angegebenen Zahlen schwanken etwa innerhalb derselben Grenzen.

Es ist somit das Faktum der bakteriellen Stickstofffixierung im Meerwasser nachgewiesen; wir haben uns nunmehr der Betrachtung der daran beteiligten Bakterienflora zuzuwenden und beschränken uns an dieser Stelle auf die Besprechung der bei Luftzutritt gehaltenen Kulturen. Die anaëroben sollen bei späterer Gelegenheit damit verglichen werden. Der Kundige wird ohne weiteres erkennen, dass es sich hierbei nur um eine vorläufige Orientierung handeln kann, da wir bisher nur Mischkulturen unter den Händen hatten.

II.

Impft man die oben beschriebenen, von Stickstoffverbindungen freien Nährlösungen mit Gartenerde, anstatt mit Meeresschlick, oder impft man umgekehrt Nährlösungen, die man mit Süß- anstatt mit Seewasser angesetzt hat, mit Meeresschlick, so beobachtet man in beiden Kulturen ziemlich gleichartige Wachstums- und Gärungserscheinungen; auch der schliessliche Gewinn an gebundenem Stickstoff erreicht in beiden Fällen etwa dieselbe Höhe. Daraus folgt, dass die stickstoffbindenden Landbakterien auch im Ostseewasser und umgekehrt die stickstoffbindenden Meeresbakterien auch auf dem Lande ihrem Geschäft obliegen können, wie das bei dem salzarmen, stark von Festlandseinflüssen beherrschten Ostseewasser wohl zu erwarten war. Die mikroskopische Untersuchung unserer Kulturen ergab denn auch, dass in denselben die beiden Landformen, von denen (abgesehen von den Knöllchenbakterien) bis jetzt feststeht, dass sie in Reinkulturen den gasförmigen Stickstoff zu binden vermögen, das anaërobe *Clostridium Pastorianum* Winogradsky und der aërobe *Azotobacter chroococcum* Beyerinck vorkamen, meistens miteinander vergesellschaftet und untermischt mit einer bunten Schar anderer Bakterien, die alle einzeln noch darauf zu untersuchen wären, ob sie mehr oder minder bedeutungslose Begleitformen der beiden genannten sind oder sich selbst irgendwie aktiv an der Stickstofffixierung beteiligen.

Azotobacter fehlt nach unseren bisherigen Erfahrungen nie in Kulturen, die direkt mit Schlick oder Plankton beimpft wurden, kann aber nach mehrfacher Überimpfung verschwinden. Das *Clostridium Pastorianum* andererseits, welches wir in Kulturen, die Buttersäuregärung zeigten, niemals vermissten, scheint in Planktonkulturen vollkommen fehlen zu können.

Da, wie oben gesagt, die folgenden Ausführungen nur für aërobe Kulturen gelten, ist es klar, dass die anaëroben (*Clostridium Pastorianum* u. a.) in denselben nur wegen der gleichzeitigen Anwesenheit aërober Formen, die erstere vor dem Sauerstoff schützten, gedeihen konnten.

Werfen wir zunächst einen Blick auf *Clostridium Pastorianum* und einige mit demselben nahe verwandte, noch ungenügend erforschte Arten:

Wir verweisen auf Fig. 1. Bei *a* sind einige Stäbchen dargestellt, die sich mit Jod nicht bläuen, d. h. noch keine Granulose gespeichert haben und in Kettenform verbunden sind mit anderen, welche schon reichlich dies Kohlenhydrat führen, zum Teil auch

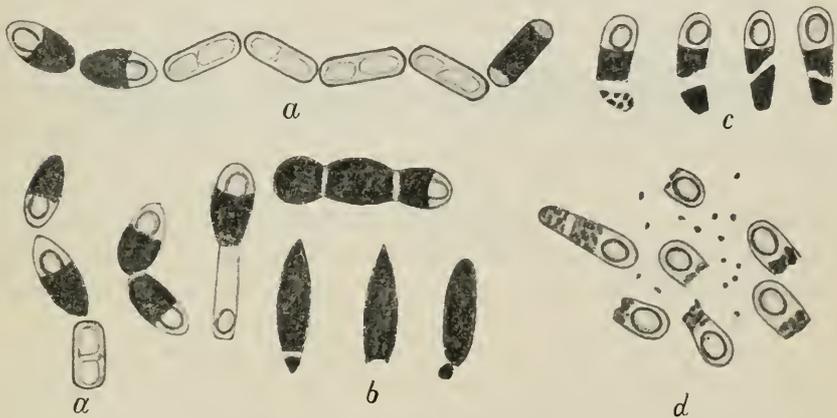


Fig. 1. *Clostridium Pastorianum* Winogradsky. Vergr. 1:2400.

Jodpräparate. Granulose schwarz.

schon clostridiumartig angeschwollen sind und an einem Pol die heranreifende Spore zeigen. Besonders häufig beobachtet man zwei miteinander verbundene, im Präparate träge dahinschwimmende Clostridien. Dieselben sind meist eiförmig (*a*), in vielen Fällen keulenförmig (*c*, *d*), selten zylindrisch (*b*). So lange in den Zellen Granulose noch fehlt, sehen sie im Leben homogen aus, Jod lässt einige Vakuolen in die Erscheinung treten. Granuloseführende Zellen zeigen ein äußerst feinwabiges Plasma („körniges Plasma“); in den Wabenräumen liegen die Granulosemassen. Reife Sporen sehen, ganz im Einklang mit WINOGRADSKY's¹⁾ Angaben, so aus, wie sie Fig. 1, *d* zeigt: sie sitzen in der einseitig geöffneten Membran der Mutterzelle darin. Während aber nach WINOGRADSKY dies Bild so zustande kommt, dass die Membran der Mutterzelle einseitig verquillt, beobachteten wir den Hergang etwas anders (cf. Fig. 1, *c*):

1) Centralbl. für Bakt., II. Abt. Bd. 9. 1902.

das der Spore entgegengesetzte Ende der Zelle bricht durch einen schrägen Riss ab und die Granulose entleert sich allmählich in Form kleiner Partikelchen nach aussen. Wie ersichtlich, ist dieser eigenartige Vorgang mit einer starken Granuloseverschwendung verbunden und vielleicht durch eine Überfütterung mit Kohlenhydraten bedingt.

Dass auch vielfach die eigenartigsten Involutionsformen vorkommen, sei nur nebenher erwähnt; z. B. die rätselhafte, schon von WINOGRADSKY (l. c.) beobachtete Abschnürung von kokkenähnlichen Gebilden, die in Fig. 1, *b* dargestellt ist.

Ähnliches dürfte übrigens auch BEYERINCK¹⁾ nach den allerdings nicht sehr vollkommenen Abbildungen zu schliessen, an seinem *Granulobacter lactobutyricum* beobachtet haben.

Da auch die Grössenverhältnisse unseres Clostridiums recht gut mit WINOGRADSKY's Angaben stimmen (Dicke der Stäbchen: $1,3 \mu$, Sporengrösse meist $1,2 \times 1,4 \mu$, gemessen an Jodpräparaten), so dürfte kein Zweifel obwalten, dass wir tatsächlich *Clostridium Pastorianum* vor uns hatten. Dagegen zu sprechen scheint allerdings die Tatsache, dass wir diese Form auch in Mannitlösungen auftreten sahen, während sie nach WINOGRADSKY diesen Alkohol nicht vergären kann; es dürfte sich das aber so erklären, dass der Mannit in unseren Mischkulturen erst durch andere Bakterien zu solchen Stoffen oxydiert wurde, die der Verarbeitung durch *Clostridium Pastorianum* anheimfallen konnten.

Neben *Clostridium Pastorianum* führten nun unsere Kulturen noch eine grosse Zahl mehr oder minder ähnlicher, grösserer wie kleinerer, zweifellos ebenfalls anaërober Granulosebakterien, die ohne Hilfe von Reinkulturen mit dem Mikroskop auseinanderwirren zu wollen ein fruchtloses Unterfangen wäre. Es genüge der Hinweis, dass eine Form, die sehr häufig war, sich von *Clostridium Pastorianum* hauptsächlich durch die scharfe Zuspitzung der Zellenden im Clostridienzustand unterschied (cf. Fig. 2, *c*).

Ganz besonders stach aber eine andere Form durch ihre ausserordentliche Grösse in die Augen; sie sei vorläufig *Clostridium giganteum* genannt (Fig. 2, *a* und *b*). In dem bei *a* gezeichneten Stadium schwärmt sie sehr lebhaft; *b* zeigt die Sporenbildung. Abgesehen von der Grösse unterscheidet sich *Clostridium giganteum* von *Pastorianum* noch durch zwei morphologische Merkmale: während bei *Pastorianum* fast immer bloss eine Spore in der Zelle entwickelt wird, zeigen die Sporangien von *giganteum* mindestens ebenso häufig, vielleicht auch häufiger zwei Sporen; ferner sind die reifen Sporen frei, liegen also nicht von der Mutterzellmembran umschlossen. Die grössten Sporen dieser Art erreichten die respektable Grösse von $2\frac{1}{2}$ auf $1\frac{1}{2} \mu$; an

1) Arch. néerl. d. sc. exactes et natur. 1896, Bd. 29, S. 9.

diesen ist die die Sporenwand umhüllende Gallertschicht, die sonst nur nach Färbung (z. B. Methylenblau) deutlich sichtbar wird, ohne Mühe schon im Leben zu sehen.

Auch *Clostridium giganteum* zeigt unter Umständen die eigenartigsten Involutionen, die gelegentlich zu ganz erstaunlich grossen Zellformen führen

Bekanntlich beschreibt WINOGRADSKY unter dem Namen „*Clostridium* aus Wollhynien“ eine stickstoffbindende Form, die ebenfalls bedeutend grösser ist als *Clostridium Pastorianum*. Immerhin dürfte dieses *Clostridium* aus Wollhynien die Grösse unseres *giganteum* nicht erreichen.

Ob *Clostridium giganteum* freien Stickstoff bindet, muss natürlich vor der Hand fraglich bleiben, so lange Erfahrungen an Reinkulturen

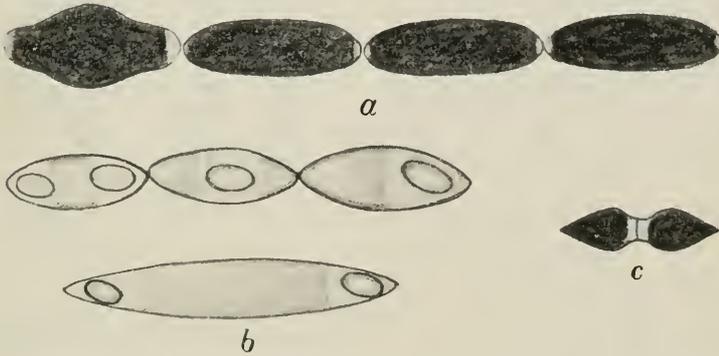


Fig. 2 a, b *Clostridium giganteum* ad int. Vergr. 1:2400. Jodpräparate; Granulose schwarz. c siehe Text, S. 340.

nicht vorliegen, denn worauf BEYERINCK¹⁾ seine Behauptung stützt, dass alle „Granulobakter“-Arten freien Stickstoff binden, wissen wir nicht. Immerhin ist es wohl wahrscheinlich, da *giganteum* oft die vorherrschende Form in unseren Kulturen war.

Dass aber andererseits *Clostridium Pastorianum* auch in unseren Kulturen einer der stickstoffbindenden Organismen war, können wir einmal auf die Autorität WINOGRADSKY's hin behaupten, ferner aber auch durch folgenden Versuch belegen, der allerdings noch durch einen Versuch mit einer Reinkultur von *Pastorianum* zu ergänzen wäre.

Die oben in der Tabelle als „Mammitkultur“ bezeichnete, mit Schlick aus der Nähe der Heulboje beimpfte Kultur zeigte nach mehrfachen Überimpfungen im wesentlichen nur drei Bakterienformen miteinander vergesellschaftet; erstens das *Clostridium Pastorianum*, zweitens einen *Bacillus* (Fig. 3, a, b, c), drittens ein *Paraplectrum*

1) Centralbl. für Bakt., II. Abt. 1902. Bd. 9, S. 3.

(Fig. 3, *d*), beide Bezeichnungen im Sinne ALFR. FISCHER's¹⁾ genommen.

Der *Bacillus*, leicht auf gewöhnlichem Nähragar, Möhren etc. gedeihend und in schön regelmässigen, sanft gebogenen Zellfäden wachsend, ist dadurch kenntlich, dass er sich mit Jod intensiv rotviolett färbt, hier und da auch fast blau, immerhin doch nicht so typisch, dass wir ihn ohne weiteres als Granulosebacillus bezeichnen möchten. Er erwies sich in den bisher verwendeten Nährmedien als obligat aërob, verflüssigte Gelatine und zeigte kein Anzeichen dafür, dass er in Reinkulturen freien Stickstoff binden könne.

Die Sporenbildung ist unter Fig. 3, *b* dargestellt, die Keimung unter 3, *c*. Diese ist meist äquatorial, die Längsachse des Keim-

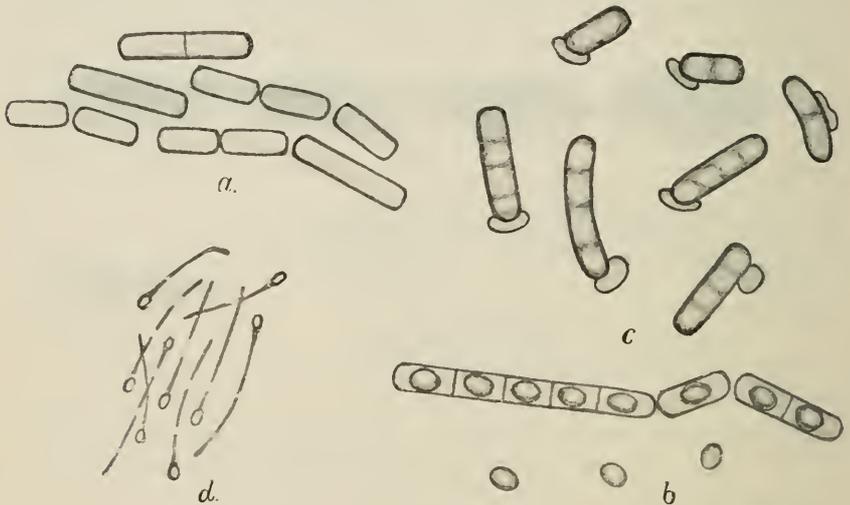


Fig. 3. Begleitbakterien von *Clostridium Pastorianum*. Vergr. 1 : 2400.
a, b, c *Bacillus* sp. *a, b* nach dem Leben. *c* Jodpräparat. *d* *Paraplectrum* sp. Jodpräparat.

stäbchens etwas schief zur Längsachse der Spore gerichtet. Was die Grösse angeht, so ist der *Bacillus* in allen Teilen etwas kleiner als *Clostridium Pastorianum*.

Das *Paraplectrum* ist unter Fig. 3, *d* abgebildet; es ist eine sehr dünne, schwach gebogene Form; vielleicht handelt es sich auch um mehrere Arten, da die Dicke der Zelle schwankt. Besonders charakteristisch ist die Granulosereaktion, die meist zwar nicht sehr intensiv, aber doch mit hinreichender Deutlichkeit eintritt, sobald die sich zur Sporulation anschickenden Zellen mit Jod behandelt werden.

Wurde das Gemisch dieser drei Formen auf Agar-Agar, Möhren oder ähnliche Nährboden ausgesät, so entwickelte sich das *Para-*

1) Vorlesungen über Bakterien. Jena 1903, S. 60 und 61.

plectrum nie; wir können also über seine sonstigen Eigenschaften, über die etwaige Fähigkeit, Stickstoff zu binden, nichts aussagen. Von den beiden anderen Arten wuchs der *Bacillus* leicht in Reinkultur, das *Clostridium* erschien aber weder bei aërober, noch bei anaërober Züchtung in Reinkultur, vielmehr nur gelegentlich in Mischkolonien mit dem *Bacillus*. So oft man beobachtete, dass einzelne Kolonien des letzteren anfangen, Gas zu entwickeln, konnte man sicher sein, dass dies auf die Anwesenheit des *Clostridiums* zurückzuführen sei.

Eine geringe Spur einer solchen Mischkolonie des *Bacillus* mit *Clostridium Pastorianum* wurde nun in eine 4prozentige Dextrose-nährlösung überimpft, welche keinen gebundenen Stickstoff enthielt, und die Kultur in den Thermostaten bei Luftzutritt gestellt. Es entwickelte sich nichts; nach einiger Zeit wurde eine geringe Menge Ammonsulfat (5 mg) hinzugefügt; alsbald trat Wachstum ein, das Mikroskop lehrte, dass der *Bacillus* anscheinend in Reinkultur wuchs; er bildete zunächst eine ganz dünne Kahlhaut; sehr bald trat Gasbildung und Gärung ein; jetzt zeigte das Mikroskop, dass ausser dem *Bacillus* sich auch *Clostridium Pastorianum* entwickelte. Als nach 14 Tagen der Versuch beendet wurde, ergab sich, dass der *Bacillus* inzwischen stark vom *Clostridium* zurückgedrängt worden war. Die Analyse ergab einen Gewinn von 4 mg Stickstoff in 100 ccm.

Wir haben zweifellos im Einklang mit WINOGRADSKY, an dessen Angaben ja überhaupt diese ganze Versuchsanordnung und ihr Ergebnis sehr erinnert, anzunehmen, dass zuerst der *Bacillus* unter Konsum des Ammonsulfates wucherte und hierauf *Clostridium Pastorianum* zu wachsen anfang und Stickstoff fixierte. Abgesehen von dem Sauerstoffentzug mögen natürlich auch noch andere, nicht näher bekannte Momente bei dieser Symbiose mitgewirkt haben.

Soviel über die Granulosebakterien unserer Kulturen.

Wie nun oben bereits bemerkt, beobachteten wir in den meisten unserer Kulturen auch den eigenartigen *Azotobacter chroococcum*, den schon WINOGRADSKY¹⁾ und KRÜGER²⁾ unter den Händen hatten, dessen genauere Kenntnis man aber erst dem unermüdlichen BEYERINCK³⁾ verdankt, und von dem durch die Arbeiten von GERLACH und VOGEL⁴⁾ sowie von ALFR. KOCH⁵⁾ sichergestellt ist, dass er in Reinkulturen bei Luftzutritt freien Stickstoff bindet. Während bei den anaëroben Granulosebakterien, wie REINKE⁶⁾ ausführt, die

1) Bakt. C. II. Abt. Bd. 9, 1902.

2) Landw. Jahrb. 1900.

3) Bakt. C. II. Abt. Bd. 7, 1901.

4) Bakt. C. II. Abt. Bd. 9, 1902.

5) Verh. der Naturf. und Ärzte. Karlsbad 1902.

6) Ebenda, ferner: Einleitung in die theoretische Biologie. 1901, S. 335.

Bindung ohne Zweifel eine Reduktion des Stickstoffs ist, ist der Mechanismus der Bindung durch *Azotobacter* noch unbestimmt.

Durch die Freundlichkeit von Herrn Prof. ALFR. KOCH, dem wir auch sonst für manche Auskunft zu bestem Dank verpflichtet sind, konnten wir aus Göttingen stammende Reinkulturen von *Azotobacter* mit den unseren vergleichen und absolut sicher stellen, dass wir die typische Form im Meerwasser gefunden haben, sowohl im Schlick, als auch im Plankton; vielleicht ist *Azotobacter* dazu berufen, vorwiegend in den oberen Wasserschichten, in denen Clostridien fehlen können, den Stickstoff zu binden, vorausgesetzt natürlich, dass ihm durch

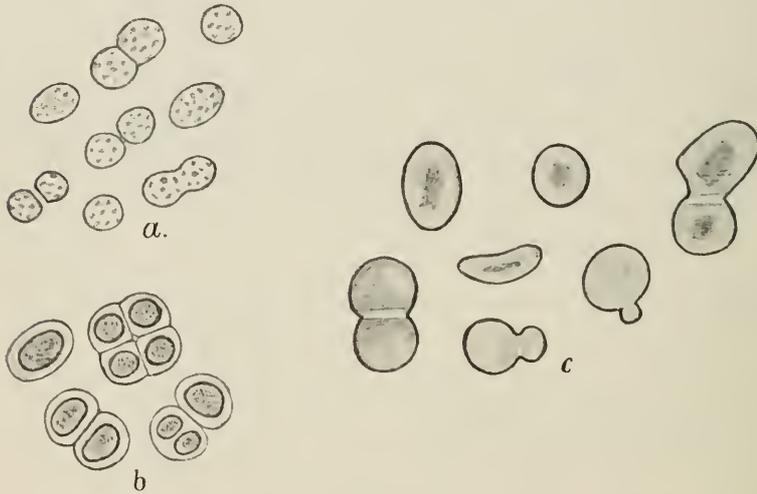


Fig. 4. *Azotobacter* Beyerinck. Vergr. 1 : 2400.

a nach dem Leben. *b* fixiert; Gallerthülle mit Hämalaun gefärbt.
c s. Text S. 345.

andere absterbende Planktonorganismen die nötige Nahrung und Energie zugeführt wird.

In morphologischer Hinsicht bemerken wir folgendes: Makroskopisch betrachtet bildet *Azotobacter* zuerst bekanntlich Kahmhäute; später pflügten die eingangs genannten, an der Glaswand haftenden Bakterienmassen zum grossen Teil aus ihm zu bestehen; dieselben färbten sich auch in unseren Kulturen, wie dies BEYERINCK als bezeichnend für die Art anführt, schliesslich rostbraun.

Einige mikroskopische Bilder bietet Fig. 4. Die ersten Stadien, in denen dieser Organismus schwärmt, beobachteten wir nicht; ein etwas älteres Stadium zeigt Fig. 4, *a*; man sieht die grossen kokkenähnlichen Zellen zum Teil in Teilung begriffen; sie sind in eine Gallerte eingebettet, mit grossen lichtbrechenden Körnern vollgestopft,

die sich auf Jodzusatz goldgelb färben; untermischt sind immer einzelne Zellen ohne körnige Einschlüsse, die auf Jodzusatz blass bleiben. Schon in diesem Stadium erinnert *Azotobacter* viel eher an eine Cyanophycee als an ein typisches Bakterium; man könnte versucht sein, ihn in die NÄGELI'sche Gattung *Aphanocapsa* als farblose Parallelform einzureihen. Noch mehr chroococcaceenähnlich wird *Azotobacter*, wie auch BEYERINCK betont, in alternden Kulturen. Die Zellen liegen dann mehr in Paketen, oft wie Sarcinen, zusammen. Gefärbte Präparate zeigen ausser der gemeinsamen Gallerte noch besondere Gallerthüllen um die einzelnen Zellen; Fig. 4, *b* ist entworfen nach Material aus einer solchen alten Kultur, welches in FLEMMING'scher Lösung fixiert und mit Hämalaun gefärbt war.

Diese Ähnlichkeit des *Azotobacter* mit Cyanophyceen dürfte im Zusammenhang mit der immer wieder auftauchenden Behauptung, dass auch Cyanophyceen freien Stickstoff binden können, Beachtung verdienen.

Abgesehen von dem typischen, eben geschilderten *Azotobacter* beobachteten wir nun, zumal auch wieder in Planktonkulturen, eine Anzahl anderer, offenbar nahe verwandter Formen, zum Teil nur durch geringere oder grössere Dimensionen unterschieden, zum Teil auch von anderer Form der Zellen; eine auch nur einigermassen vollständige Anzählung derselben würde unmöglich sein, die Entwirrung derselben eine ebenso umfangreiche Aufgabe vorstellen, wie die der oben erwähnten Granulosebakterien. Wir beschränken uns somit darauf, nur auf eine Form noch hinzuweisen, die in Fig. 4, *c* abgebildet ist. Es handelt sich um sehr grosse, bald rundliche, bald mehr ovale, zum Teil auch recht unregelmässige Formen, die man häufig in Teilung (oder Sprossung?) begriffen sieht. Sie färben sich mit Jod gelb; nicht selten lassen sie im Innern Strukturen erkennen, die an den „Centralkörper“ der Cyanophyceen erinnern.

Wir gehen kaum fehl in der Annahme, dass es sich hier handelt um die auch von WINOGRADSKY¹⁾ beobachteten „grossen, etwas clostridiumähnlichen, aber durch Jod nie blau werdenden Kokken oder Monadenformen“, die der genannte Forscher in die Nähe von *Azotobacter* zu stellen geneigt ist.

Es sei zum Schluss darauf hingewiesen, dass wir in unseren Kulturen auch Fadenpilze und Hefen als gelegentliche Gäste, ferner farblose Flagellaten beobachteten; die letztgenannten traten in den Planktonkulturen relativ früh, reichlich und regelmässig auf.

Unsere Versuche, über deren bisherige Ergebnisse wir hier kurz berichtet haben, werden hauptsächlich nach zwei Richtungen hin noch fortgeführt: einmal soll versucht werden, die wichtigsten stick-

1) Bakt. C. 1902, Bd. 9, S. 112.

stoffbindenden Formen, die wir bisher bloss in Rohkulturen untersuchten, auch zu isolieren und in morphologischer wie physiologischer Hinsicht tunlichst genau kennen zu lernen. Ferner sollen auch aus anderen Meeren als der Ostsee Grund- und Wasserproben auf stickstoffbindende Organismen untersucht und so die geographische Verbreitung derselben studiert werden.

46. W. Schmidle: Bemerkungen zu einigen Süßwasseralgen.

Mit Tafel XVIII.

Eingegangen am 24. Juni 1903.

I. Zur Kenntnis der Chlamydomonaden.

Eine neuerdings von WILLE veröffentlichte Arbeit¹⁾ veranlasst mich zu folgenden Bemerkungen.

1. Über die Algengattung *Haematococcus*. (Fig. 1–5).

In einer längeren Einleitung weist WILLE l. c. nach, dass der Gattungsname *Sphaerella* Sommerfeldt zu streichen und dafür *Haematococcus* Fl. zu setzen sei. Er weist dann auf die Schwierigkeiten hin, *Haematococcus* von *Chlamydomonas* zu trennen und sieht als charakteristisches Gattungsmerkmal für *Haematococcus* die Pseudopodien an, welche den Zelleib mit der mehr oder weniger abstehenden Zellehülle verbinden.

Es gibt aber noch ein zweites Gattungsmerkmal, welches in dem gesamten Zellbau liegt, und welches bisher wohl nur deshalb nicht bekannt wurde, weil *Haematococcus* neuerdings nicht eingehender untersucht wurde.

Nach den meisten Autoren (auch WILLE l. c.) ist dieser Zellbau von dem der Gattung *Chlamydomonas* nicht wesentlich verschieden; besonders soll das Chromatophor becherförmig sein. BLOCHMANN²⁾ freilich, welcher zuletzt die Gattung eingehend studierte, gibt an, dass es vollständig fehle.

Ich hatte nun Gelegenheit, sowohl *Haematococcus Bütschlii* Blochmann, als auch *H. pluvialis* Flotow letzten Sommer von verschiedenen

1) Algologische Notizen IX–XIV in Nyt Magazin for Naturvidenskab, Bd. 41, Heft 1, 1903.

2) BLOCHMANN, Über eine neue *Haematococcus*-Art. Verhandl. des naturh.-med. Vereins Heidelberg, Bd. III, 1886.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1903

Band/Volume: [21](#)

Autor(en)/Author(s): Keutner J., Benecke Wilhelm

Artikel/Article: [Über stickstoffbindende Bakterien aus der Ostsee. 333-346](#)