Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Spirophyllum ferrugineum Ellis, einem typischen Eisenbakterium.

Von

Rudolf Lieske.

Mit 2 Textfiguren.

Bei meinen Untersuchungen im Botanischen Institut der Universität Leipzig fielen mir im Februar 1909 an eisernen Röhren in den Wasserbassins der Gewächshäuser große Rostanhäufungen auf. Die mikroskopische Untersuchung derselben ergab, daß es sich um große Kolonien von Eisenbakterien handelte, die mit bloßem Auge von auf rein chemischem Wege gebildeten Eisenoxydhydrat kaum unterschieden werden können, während im mikroskopischen Bilde nur die eisenhaltigen Bakterienfäden zu erkennen sind. Die wenigen und sich vielfach widersprechenden Angaben der Literatur über die Physiologie der Eisenbakterien weckten mein Interesse für weitere Untersuchungen. Nachdem es mir nach vielen vergeblichen Bemühungen gelungen war, den erwähnten Organismus zu kultivieren, begann ich die Physiologie der Eisenbakterien und ihre Beziehungen zu den Eisensalzen näher zu untersuchen. Es zeigte sich aber sehr bald, daß die als „Eisenbakterien" bezeichneten Organismen nicht nur morphologisch sehr verschieden sind, sondern auch in ihrem physiologischen Verhalten wesentlich voneinander abweichen. Ich muß daher schon hier betonen, daß die Resultate meiner mit einer Art angestellten Versuche nicht ohne weiteres für andere Arten von Eisenbakterien gelten.

Spirophyllum ferrugineum Ellis und *Gallionella ferruginea* Ehrenberg.

Im Jahre 1897 beschrieb Ellis (1) einen von ihm in England entdeckten Organismus, der die typischen Eigenschaften der Eisen-

bakterien zeigte. Derselbe war anscheinend schon lange bekannt, wurde aber, wie aus der Literatur ersichtlich ist, immer für identisch mit *Gallionella ferruginea* Ehrenberg gehalten, trotzdem er sich wesentlich von der typischen Form der *Gallionella* unterscheidet. Da der von mir rein kultivierte Organismus in allen wesentlichen Punkten mit der von Ellis beschriebenen Bakterienart übereinstimmt, behalte ich zunächst den Namen *Spirophyllum ferrugineum* bei und gebe im folgenden eine genaue Beschreibung desselben.

Spirophyllum ferrugineum Ellis bildet sehr lange, flache Bänder, die schraubenförmig um ihre Längsachse gedreht sind. Sie besitzen eine gewisse Ähnlichkeit mit einem gedrehten Baumwollhaar. Die Breite der ausgewachsenen Bänder beträgt in den meisten Fällen 2—5 μ, ganz junge Individuen dagegen sind so fein und durchsichtig, daß sie unter dem Mikroskop auch bei Anwendung von Ölimmersion ($^1/_{12}$ Zoll resp. 2 mm Apochromat) schwer zu erkennen sind. Sie besitzen annähernd den Brechungskoeffizienten des Wassers. Irgend eine Differenzierung der *Spirophyllum*-Fäden habe ich nicht wahrnehmen können. Alle Färbungsversuche versagten. Ältere Exemplare lassen sich etwas mit Methylenblau färben, ohne daß hierdurch etwas erreicht wird.

Ellis nimmt an, daß die jüngsten Fäden flache Bänder darstellen, die sich erst in einer weiteren Entwicklungsstufe spiralig drehen. Ich bemerke hierzu, daß man in allen Altersstufen mehr oder weniger stark gedrehte Fäden findet, und daß zuweilen selbst ganz alte, stark eisenhaltige Fäden nur wenige Windungen aufweisen. Ich habe an den feinsten Fäden aus ganz jungen Kulturen die Drehung stets deutlich beobachtet. Meiner Ansicht nach wachsen die Fäden von allem Anfang an in den charakteristischen Drehungen.

Zu einer anderen Ansicht als Ellis bin ich auch in bezug auf die Länge der *Spirophyllum*-Fäden gekommen. Sobald die Fäden das erste Wachstumsstadium überwunden haben, sind sie außerordentlich leicht zerbrechlich. Selbst bei allergrößter Sorgfalt bekommt man bei einem mit Deckglas versehenen Präparat immer nur eine Anzahl mehr oder weniger lange Bruchstücke. Ellis spricht in seiner Arbeit von „Individuen“, die 15 und mehr vollständige Windungen aufweisen, während wieder andere kaum eine halbe Windung besitzen. Wenn man bei der Herstellung eines Präparates von nicht zu altem, wenig eisenhaltigem *Spirophyllum*

sorgfältig darauf achtet, daß das Deckglas vorsichtig von oben ohne die geringste seitliche Verschiebung aufgelegt wird, kann man ohne weiteres Fäden erhalten, die durch das ganze Gesichtsfeld gehen und an denen man 50 und mehr Windungen zählen kann.

Bei genauer Untersuchung des Materials findet man oft Fadenbruchstücke, die eine Verzweigung aufweisen. Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine falsche Dichotomie wie bei *Cladothrix dichotoma* oder *Clonothrix fusca*. Die Verzweigung von *Spirophyllum* ist deshalb etwas schwierig zu beobachten, weil die sehr spröden Fäden besonders an der Verzweigungsstelle leicht zerbrechen.

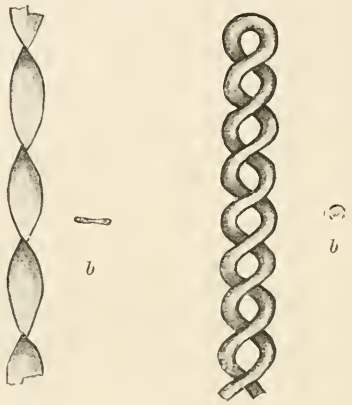
Die Vermehrung von *Spirophyllum* vollzieht sich in der Hauptsache wohl dadurch, daß die älteren Fäden in kleine Stücke zerfallen, die dann wieder zu neuen Individuen auswachsen. Ellis will eine Conidienbildung wie bei *Leptothrix ochracea* beobachtet haben. Diese Beobachtung zu bestätigen habe ich keine Gelegenheit gehabt, ebenso wie Molisch, der sich speziell mit der Kultur von *Leptothrix* befaßte, die von Ellis beschriebene Conidienbildung dieses Organismus nicht beobachten konnte.

Die *Spirophyllum*-Fäden haben je nach dem Ort, an dem die Kolonie gewachsen ist, ein verschiedenes Aussehen. Die Kolonien bilden auf metallischem Eisen, z. B. in eisernen Leitungsröhren, große, kompakte Höcker von dunkel rostbrauner Farbe. Die einzelnen Fäden einer solchen Kolonie sind stark gedreht und ziemlich breit, nach kurzer Zeit sehr stark eisenhaltig. Es sei hier besonders betont, daß alle anderen Eisenbakterien in dieser Weise auf metallischem Eisen keine Kolonien bilden. Anders sehen die Kolonien von *Spirophyllum* aus, die in schwach Eisenoxydulkarbonat-haltigem Wasser ohne metallisches Eisen gewachsen sind. Diese bilden hellgelbe Flocken, schwimmen frei im Wasser, die einzelnen Fäden wachsen ganz locker durcheinander, zeigen auch nach längerem Wachstum keine so starke Eisenspeicherung und sind meist weniger stark gedreht. Im allgemeinen sind *Spirophyllum*-Fäden, die auf metallischem Eisen gewachsen sind, etwas breiter und stärker als andere.

Spirophyllum ist in dem von mir untersuchten Gebiet mindestens ebenso verbreitet wie *Leptothrix*. Es findet sich aber meist nicht mit *Leptothrix* gemischt, sondern gewöhnlich ohne andere Eisenbakterien. Namentlich im Frühjahr nach der Schneeschmelze kann man es sehr häufig in Gräben und Lachen finden. Ich habe wiederholt derartige Gewässer untersucht, in denen die Kolonien

besonders gut gediehen, und habe gewöhnlich keinen besonders hohen Eisengehalt des Wassers feststellen können, trotzdem die Bakterien reichlich Eisen gespeichert enthielten. Im Gegensatz hierzu findet man *Leptothrix ochracea* meist in stärker eisenhaltigen Wässern. Das Leitungswasser der Stadt Leipzig enthält immer *Spirophyllum*.

Es wäre nun die Frage zu entscheiden, ob *Spirophyllum* und *Gallionella* zwei verschiedene Organismen sind oder ob sie nur verschiedene Wachstumsformen ein und desselben Organismus darstellen. Die Frage wurde zum ersten Male in der Literatur von Molisch (2) erörtert. Er läßt dieselbe unentschieden und führt für *Spirophyllum* provisorisch den Namen *Gallionella feruginea* var. *lata* ein.



a a
Fig. 1. Fig. 2.
Spirophyllum. *Gallionella.*

Eine nähere Betrachtung der beiden Formen dürfte hier angebracht sein. Die nebenstehenden Figuren sind nach typischen Fadenbruchstücken (Ölimmersion $^1/_{12}$ Zoll) unter Einhaltung der natürlichen Größenverhältnisse gezeichnet. Fig. 1*a* stellt einen *Spirophyllum*-Faden, Fig. 2*a* einen *Gallionella*-Faden dar. 1*b* und 2*b* sind die entsprechenden Querschnitte.

Gallionella besteht aus einem zylindrischen Faden, der in den meisten Fällen in der Mitte umgebogen ist, wobei die beiden freien Enden sich spiralig umeinander drehen. *Spirophyllum* stellt ein flaches Band dar, das um seine eigene Längsachse gedreht ist. Beide Formen unterscheiden sich hauptsächlich durch folgende Merkmale:

1. *Spirophyllum*-Fäden sind stets bandförmig und haben einen entsprechenden Querschnitt (vgl. Fig. 2*b*). *Gallionella*-Fäden sind zylindrisch und auf dem Querschnitt kreisrund.

2. Ich habe nie beobachtet, daß ein *Spirophyllum*-Faden sich in der Mitte umbiegt, und daß die beiden freien Enden sich spiralig umeinander drehen, was bei *Gallionella* die Regel ist.

3. *Spirophyllum*-Fäden sind um ihre eigene Längsachse gedreht, *Gallionella*-Fäden drehen sich spiralig um eine außerhalb des Fadens liegende Achse.

4. *Spirophyllum*-Fäden sind im allgemeinen weit länger als *Gallionella*-Fäden.

Gemeinsam haben beide Formen nur, daß sie eisenspeichernde Organismen sind, bei denen eine Differenzierung in einzelne Zellen mit den bisher angewendeten Hilfsmitteln nicht zu erkenen ist.

In der Natur gedeihen beide Formen anscheinend unter denselben Wachstumsverhältnissen. Im September 1910 untersuchte ich bei meinem Aufenthalt in Karlsbad von einer Stelle entnommenes Material aus der dortigen Eisenquelle. Die Bakterienmasse bestand zum größten Teil aus *Gallionella*, zu einem geringen Teil aus *Spirophyllum*. In *Gallionella*-Material, das ich aus Berlin zugeschickt erhielt, konnte ich mikroskopisch *Spirophyllum* nicht nachweisen.

Eine Übergangsform von *Gallionella* zu *Spirophyllum* habe ich bei meinen ausgedehnten Untersuchungen nicht entdecken können. Da der Querschnitt von *Gallionella* kreisrund ist und der von *Spirophyllum* flach gedrückt, so müßte meiner Ansicht nach eine Übergangsform einen elliptischen Querschnitt haben, auch müßte man sie an der Art der Drehung erkennen können. Ich habe dergleichen nie wahrgenommen. Die Breite der *Spirophyllum*-Fäden variiert etwas, in demselben Maße wie die Breite abnimmt, ist aber dann auch die Dicke der Fäden geringer, die Form des Querschnittes ändert sich im Vergleich zu breiteren Fäden nicht.

Die typische *Gallionella* zu kultivieren, ist mir nicht gelungen. Von dem mir aus Berlin zugegangenen *Gallionella*-Material impfte ich 10 Kolben, die nach der von mir für die Kultur von *Spirophyllum* angewendten Methode angesetzt waren. In 8 von diesen trat kein Wachstum ein, in 2 trat *Spirophyllum* auf. Aus dieser Kultur einen sicheren Schluß zu ziehen, ist jedoch nicht möglich, da das zum Impfen angewandte Material nicht rein war. Bei meinen Versuchen trat in Rohkulturen, die nach der erwähnten Art angesetzt waren, sehr häufig *Spirophyllum* von selbst auf. Warum in den übrigen 8 Kulturen kein Wachstum eintrat, ist für den Fall, daß *Spirophyllum* und *Gallionella* identisch sind, allerdings nicht ersichtlich. Das Impfmaterial war entschieden lebensfähig.

In den Kulturen, mit denen ich die im folgenden beschriebenen Untersuchungen ausführte, war immer nur die typische *Spirophyllum*-Form vorhanden.

Es liegt also für mich kein Grund vor, *Gallionella* und *Spirophyllum* für verschiedene Wachstumsformen desselben Organismus anzusehen. Ich kann aber auch nicht beweisen, daß es sich um zwei verschiedene Arten handelt. Auf Grund der vorstehenden Ausführungen behalte ich in meiner Arbeit für den von mir kultivierten Organismus den Namen *Spirophyllum ferrugineum* Ellis bei, ohne aber damit sagen zu wollen, daß es sich nicht event. nur um eine Wachstumsform von *Gallionella ferruginea* Ehrenberg handeln könnte. Die systematische Stellung des erwähnten Organismus ist für die im folgenden beschriebenen physiologischen Versuche übrigens kaum von Bedeutung.

Über die Morphologie von *Gallionella* finden sich in der Literatur Angaben bei Adler (1), Ellis (2), Lafar (1), Migula (1), Molisch (1) und Schorler (2). Angaben über die Morphologie anderer Eisenbakterien finden sich hauptsächlich bei Cohn (1), Ellis (3) (5), Jackson (1), Lafar (2), Molisch (1) (4), Schorler (1), Winogradsky (1) und Zopf (1).

Die bisher in der Literatur erschienenen Arbeiten über die Physiologie der Eisenbakterien.

Trotzdem die Eisenbakterien in der Natur sehr auffällig sind, wegen ihres massenhaften Auftretens und der intensiven Gelbfärbung der Kolonien, sind sie doch erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit näher bekannt geworden, und zwar sind die ersten eingehenden Untersuchungen aus praktischem Interesse unternommen worden. Es handelte sich hierbei in den meisten Fällen um *Crenothrix polyspora* und *Clonothrix fusca*, die in Wasserleitungen so häufig auftraten, daß sie dieselben verstopften.

Die ersten Bemerkungen in der Literatur über Eisenbakterien finden sich bei Ehrenberg (1), später folgen Arbeiten von Cohn (1) und Zopf (1), die hauptsächlich morphologische Untersuchungen enthalten. Die erste eingehende physiologische Untersuchung wurde 1888 von Winogradsky (1) veröffentlicht. Ihr folgte im Jahre 1891 eine zweite eingehende physiologische Untersuchung von Molisch (3), deren Resultate in allen wesentlichen Punkten das Gegenteil der Ergebnisse der Winogradskyschen Arbeit sind. Nachdem ich die im folgenden beschriebenen Untersuchungen bereits abgeschlossen hatte, erschien eine zweite Arbeit von Molisch (1), die in bezug auf die physiologischen Untersuchungen im wesentlichen eine Erweiterung und Bestätigung der Ergebnisse seiner ersten

Arbeit ist. Weitere beachtenswerte Arbeiten über die Physiologie der Eisenbakterien finden sich in der mir vorliegenden Literatur nicht.

Das Hauptresultat seiner Untersuchungen drückt Winogradsky folgendermaßen aus: „Die Lebensprozesse der Eisenbakterien werden ausschließlich oder hauptsächlich auf Kosten der bei der Oxydation von Eisenoxydul zu Eisenoxyd freiwerdenden Wärme (aktuelle Energie) im Gange erhalten.“.

Er begründet diesen Satz durch folgende Beobachtungen: *Leptothrix*-Fäden nahmen nur in $FeCO_3$-haltigem Wasser größere Mengen von Eisen auf, und zwar nur dann, wenn sie lebende Zellen enthielten. Ohne Zufuhr von Eisenoxydul wuchsen die Fäden von *Leptothrix* nicht. (Winogradsky hatte zur Nährflüssigkeit keine oder nur Spuren organischer Substanz zugesetzt!) Schließlich erwähnt Winogradsky, daß *Leptothrix* sehr üppig gedeihen kann in Eisenquellen, deren Wasser nur sehr geringe Spuren von organischer Substanz enthält.

Molisch ist es neuerdings (1910) gelungen, Reinkulturen von *Leptothrix ochracea* herzustellen. Mit diesen wies er nach, daß *Leptothrix* ohne Zusatz von Eisen oder Mangan in organischer Nährlösung gedeihen kann. Er schließt hieraus, daß die Eisenspeicherung der Eisenbakterien nur ein ganz nebensächlicher und ernährungsphysiologisch bedeutungsloser Faktor ist und betont, daß durch seine Untersuchungen die Angaben Winogradskys widerlegt seien.

Durch meine Untersuchungen habe ich festgestellt, daß die als Eisenbakterien bezeichneten Organismen nicht nur morphologisch sehr verschieden sind, sondern auch in ihrem physiologischen Verhalten wesentlich voneinander abweichen. Die sowohl von Winogradsky als auch von Molisch durch Versuche mit *Leptothrix ochracea* erhaltenen Resultate können daher nicht ohne weiteres auf andere Arten übertragen werden, speziell nicht, wie aus meinen Untersuchungen hervorgeht, auf *Spirophyllum*.

Die von Winogradsky angeführten Beobachtungen habe ich nachgeprüft und kann sie im wesentlichen bestätigen. Desgleichen habe ich nach den Angaben von Molisch Kulturen von *Leptothrix ochracea* auf Manganpepton-Gelatine herstellen können.

Meiner Ansicht nach bilden die Resultate der Untersuchungen von Winogradsky und Molisch durchaus keinen Widerspruch. Es ist sehr wohl denkbar, daß *Leptothrix ochracea* bei Gegenwart genügender Mengen organischer Substanz heterotroph zu leben ver-

mag, während bei Mangel an organischer Substanz die Oxydation des Eisenoxydulbikarbonates ernährungsphysiologisch von Bedeutung werden kann. Ein derartiger Fall wäre übrigens nicht neu und einzig dastehend. Es ist, wie später noch erwähnt werden wird, z. B. von den wasserstoffoxydierenden Bakterien mit Sicherheit bekannt, daß sie sowohl mit organischer Substanz als ohne solche mit Hilfe von CO_2-Assimilation gedeihen können. Sicher festgestellt ist nach den Untersuchungen von Molisch, daß *Leptothrix* in organischer Nährlösung ohne Zusatz von Eisen oder Mangan gedeihen kann. Die Frage, ob event. bei Mangel an organischer Substanz die Eisenoxydation für *Leptothrix* von ernährungsphysiologischer Bedeutung werden kann, bedarf neuer Untersuchungen.

Angaben in der Literatur über Kulturmethoden von Eisenbakterien.

Um Versuche mit *Spirophyllum* anstellen zu können, war es zunächst nötig, gute Kulturen und womöglich Reinkulturen dieses Organismus zu erhalten. Ich versuchte naturgemäß zunächst die Methoden, die ich in der Literatur für die Kultur anderer Eisenbakterien angegeben fand. Von diesen möchte ich die hauptsächlichsten hier erwähnen.

Es ist dies erstens die Kulturmethode von Winogradsky (1), der hohe, mit Brunnenwasser gefüllte Glaszylinder mit sich zersetzendem Heu und frisch gefälltem Eisenoxydhydrat versetzte. Nach dieser Methode kann man gute Rohkulturen von *Leptothrix ochracea* erhalten. *Spirophyllum* oder andere Eisenbakterien konnte ich nicht auf diese Weise kultivieren.

Eine zweite Kulturmethode ist die von Rössler (1), der *Crenothrix polyspora* in Wasser, das Ziegelsteine und Eisenoxydsulfat enthielt, kultiviert haben will. In Übereinstimmung mit den Berichten aller anderen Autoren, die diese Methode versucht haben, führte dieselbe bei mir weder mit *Crenothrix* noch mit anderen Eisenbakterien zu irgend einem Resultat. Auf Grund anderweitiger Versuche bin ich geneigt anzunehmen, daß die Angaben Rösslers auf einer Verwechslung beruhen. Einige eisenspeichernde Pilze wachsen in einer Eisensulfatlösung auf Ziegelsteinen sehr gut, und die stark eisenhaltigen Pilzfäden sind von stark eisenhaltigen *Crenothrix*-Fäden nicht leicht zu unterscheiden.

Eine dritte Methode findet man oft in der auf Eisenbakterien bezüglichen Literatur angegeben. Es ist das Verfahren, nach dem

Büsgen (1) *Cladothrix dichotoma* in Reinkultur erhielt. Die Herstellung von Reinkulturen dieses Organismus bietet durchaus keine Schwierigkeiten, aber die echte *Cladothrix dichotoma* speichert kein Eisen. Sie dürfte früher oft mit *Clonothrix fusca* verwechselt worden sein. Ich habe *Cladothrix dichotoma* mehrere Monate lang in eisenhaltigem Wasser kultiviert (mit Zusatz von Fleischextrakt), aber die Gallertscheide enthielt nie mehr Eisen, als in jede tote Gallertmasse hineindiffundiert. Von einer ansehnlichen Eisenspeicherung wie etwa bei *Leptothrix ochracea* konnte ich nichts wahrnehmen. Eisenbakterien nach der Methode von Büsgen zu kultivieren gelang mir nicht.

Weitere in der Literatur angegebene Methoden erwiesen sich ebenfalls für die Kultur von *Spirophyllum* als erfolglos. Auch die in neuester Zeit von Molisch für die Herstellung von Reinkulturen von *Leptothrix ochracea* angegebene Methode ist für die Kultur von *Spirophyllum* nicht anwendbar, wie nachträgliche Versuche ergaben.

Um *Spirophyllum* kultivieren zu können, war ich also gezwungen eine neue Kulturmethode zu finden. Ich versuchte hunderte von flüssigen und festen Nährböden verschiedenster Zusammensetzung, aber ohne allen Erfolg.

Über das Vorkommen der Eisenbakterien in der Natur.

Zunächst machte ich es nun zu meiner Aufgabe, das Vorkommen der Eisenbakterien in der Natur möglichst genau zu studieren, um so neue Anhaltspunkte für die Herstellung künstlicher Kulturen zu gewinnen. Die hauptsächlichsten Resultate dieser Untersuchungen seien im folgenden mitgeteilt.

1. Alle Eisenbakterien wachsen in ganz klaren stehenden oder fließenden Gewässern. In trübem Wasser, in dem Schlammteilchen suspendiert sind, habe ich nie Eisenbakterien gefunden. Eine Ausnahme bilden nur die Wässer stark eisenhaltiger Quellen, die zuweilen durch mechanisch ausgefallenes Eisenoxydhydrat getrübt sind.

2. Ich habe Eisenbakterien nie gefunden in Wässern, die größere Mengen organischer Substanz erhalten. Sie gedeihen z. B. nicht in Abwässern, die große Mengen von Pilzen und anderen Bakterien, z. B. auch *Cladothrix dichotoma* enthalten, auch wenn das Wasser einen relativ hohen Eisengehalt hat. Es muß aber hier besonders hervorgehoben werden, daß die einzelnen Arten der

Eisenbakterien sich sehr verschieden gegen organische Substanzen verhalten. *Crenothrix polyspora* verträgt am meisten davon, weniger *Leptothrix ochracea* und *Clonothrix fusca*, am wenigsten *Spirophyllum*. Die Angaben von Molisch, daß das Auftreten von *Leptothrix* abhängig sei von dem Gehalt des Wassers an organischer Substanz kann ich nicht bestätigen, da ich gefunden habe, daß gerade dieser Organismus in verschiedenen Eisenquellen, deren Wasser so arm an organischer Substanz ist, daß ich dieselbe auf chemischem Wege nicht nachweisen konnte, mit großer Üppigkeit gedeiht. (Die Untersuchungen wurden ausgeführt nach der Methode von Schulze-Trommsdorff mit Kaliumpermanganat.)

3. Alle Gewässer, in denen ich Eisenbakterien gefunden habe, erwiesen sich als stark CO_2-haltig. (CO_2-Nachweis mit Baryumoxydhydrat resp. Kalkwasser.)

4. Alle Gewässer, in denen ein gutes Wachstum von Eisenbakterien zu beobachten war, hatten einen hohen Eisengehalt. In Gewässern mit hohem Eisengehalt habe ich in allen Fällen Eisenbakterien gefunden. Ausgewachsene Fäden von Eisenbakterien aus natürlichen Gewässern gaben in allen Fällen eine starke Eisenreaktion. Dieser letzte Punkt ist besonders beachtenswert, da es Molisch in neuester Zeit gelungen ist, *Leptothrix ochracea* ohne Zusatz von Eisen resp. Mangan zu kultivieren. Bei meinen sehr zahlreichen Untersuchungen habe ich in der Natur nie ausgewachsene *Leptothrix*-Fäden ohne beträchtlichen Eisengehalt gefunden. Dagegen findet man oft *Crenothrix*-Fäden, die nur eine schwache Eisenreaktion geben.

Herstellung von Reinkulturen von *Spirophyllum ferrugineum*.

Ich versuchte nun meine Kulturen so einzurichten, daß sie den natürlichen Bedingungen möglichst nahe kamen, aber anfangs mit wenig Erfolg. Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang es mir zum ersten Male *Spirophyllum* auf folgende Weise zu kultivieren. In ein Gefäß, das etwas Sand und altes Laub aus einem *Spirophyllum*-haltigen Bache der Dresdner Haide und Dresdner Leitungswasser enthielt, gab ich etwas dünnen Eisendraht. An den Stellen, wo der Eisendraht die Blätter berührte, bildeten sich nach wenigen Tagen schöne große Kolonien von *Spirophyllum*. Diese Kultur entspricht annähernd der Winogradskyschen Methode, da die Kohlensäure der sich zersetzenden Blätter das metallische Eisen

auflöst. Später gelang mir die Kultur in Erlenmeyerkolben, die Leitungswasser, Eisendraht und etwas Extrakt von alten Blättern enthielten. Von dem Blätterextrakt darf nur sehr wenig zugegeben werden. Es sei bereits hier erwähnt, daß derselbe lediglich als Kohlensäurequelle dient, er zersetzt sich unter Entwicklung einer reichlichen Menge Kohlensäure, die das in den Kulturen enthaltene Eisen als Oxydulkarbonat löst. Gibt man nur so viel von dem Blätterextrakt zu, daß die Flüssigkeit deutlich gelb gefärbt ist, so wirkt bereits die organische Substanz hemmend auf das Wachstum. Wenn man den Eisendraht in den Kulturen durch grobe Feilspäne von weichem Eisen ersetzt, so kann man auf diese Weise gute, für viele Zwecke brauchbare Rohkulturen erhalten.

Bei meinen Arbeiten im Botanischen Institut der Universität Leipzig brauchte ich die Nährflüssigkeit nur mit etwas Wasser der Leipziger Wasserleitung zu impfen, das stets *Spirophyllum* enthält. Das Wachstum begann meist nach ungefähr 4 Tagen. Impft man Material aus so hergestellten Kulturen wiederholt in sterile Kolben über, so kann man Kolonien von so großer Reinheit erhalten, daß es bei der mikroskopischen Untersuchung kaum gelingt, fremde Bakterien oder andere Organismen zu entdecken. Selbstverständlich ist diese Kulturmethode für exakte Untersuchungen noch nicht brauchbar, da diese nur mit Reinkulturen durchgeführt werden können, deren Nährflüssigkeit von bekannter chemischer Zusammensetzung ist, was bei Anwendung von Blätterextrakt natürlich ausgeschlossen ist. Endlich gelang mir die Herstellung solcher Reinkulturen auf folgende Weise. Ich beobachtete wiederholt, daß die Eisenbakterien vorzüglich gediehen in Lösungen, die gar keine organischen Substanzen enthielten. Es stellte sich später bei genaueren Untersuchungen heraus, daß gerade darin der Hauptgrund der vielen Mißerfolge zu suchen war, daß ich zu den meisten meiner Kulturen als Kohlenstoffquelle organische Substanz zugab. *Spirophyllum ferrugineum* gedeiht vorzüglich in einer Lösung, die außer einem geringen Prozentsatz anorganischer Salze nur kohlensaures Eisen enthält, ohne die geringste Spur organischer Substanz. Da die Zahl der Mikroorganismen, die ohne organischen Kohlenstoff gedeihen, sehr gering ist, so treten Fremdorganismen in solchen Kulturen sehr zurück. Durch fortgesetztes Überimpfen in sterile Kolben gelangte ich schließlich zu Reinkulturen, und zwar nicht allzu schwer. Von 5 Kulturkölbchen, die mit Material geimpft waren, das aus einer 11-mal übergeimpften Kultur stammte, er-

wiesen sich zwei als rein. Bei dem Impfen sind verschiedene Eigentümlichkeiten zu beobachten, auf die ich noch zurückkomme.

Von wesentlicher Bedeutung für die Möglichkeit, auf diese Weise Reinkulturen zu gewinnen, ist der Umstand, daß *Spirophyllum* nicht mit einer dicken Gallertscheide umgeben ist, wie z. B. *Crenothrix*. Bei älteren *Crenothrix*-Fäden findet man nämlich die Scheide oft von zahlreichen stäbchenförmigen Bakterien durchsetzt, die hier parasitisch oder symbiotisch zu leben scheinen. Dasselbe beschreibt Molisch von *Leptothrix ochracea*. Bei *Spirophyllum* habe ich nie etwas Ähnliches entdeckt. Außerdem würde die Isolierung auf die beschriebene Weise schwierig sein, wenn das Impfmaterial andere Arten von Eisenbakterien enthielt, die unter denselben Ernährungsbedingungen gedeihen könnten. Von den verhältnismäßig sehr großen, regelmäßigen und außerordentlich charakteristisch gestalteten *Spirophyllum*-Fäden müßten andere eisenspeichernde Organismen auf jeden Fall mikroskopisch zu unterscheiden sein, selbst wenn es sich um Arten handelte, die *Spirophyllum* sehr ähnlich wären. Ich habe davon weder in dem von mir verwendeten Rohmaterial, noch in den Kulturen etwas entdecken können. Übrigens ist es mir nicht gelungen, nach der beschriebenen Methode andere Arten bisher bekannter Eisenbakterien zu kultivieren.

Wenn man die Kulturflüssigkeit, auf deren Boden wenig Eisenfeilspäne regelmäßig verteilt sind, mit sehr wenig Material impft, so treten nach einigen Tagen an verschiedenen Stellen einzelne Kolonien auf, die strahlenförmig von einem Punkte aus wachsen, ähnlich wie man das oft an Pilzkulturen beobachten kann. Es ist anzunehmen, daß diese Kolonien meist, wenn auch nicht aus einer einzelnen Zelle, so doch aus einem Zellfaden entstanden sind. Diese Kolonien eignen sich besonders zum Abimpfen. Im folgenden gebe ich die genaue Beschreibung der Kulturmethode, die sich bei mir vorzüglich bewährt hat.

Kleine Erlenmeyerkolben von ungefähr 100 ccm Inhalt werden ca. 2 cm hoch mit folgender Nährlösung gefüllt:

$(NH_4)_2SO_4$	1,5 g
KCl	0,05 g
$MgSO_4$	0,05 g
K_2HPO_4	0,05 g
$CaNO_3$	0,01 g
H_2O dest.	1000 g

Hierauf werden die Kolben gut mit Watte verschlossen und im Dampfsterilisator sterilisiert. Dann werden grobe Feilspäne von weichem Eisen in einem gut verschlossenen Reagensglas im Trockensterilisator eine Stunde lang auf ca. 160 ^{0} erhitzt. Nachdem man die Kolben aus dem Sterilisator genommen hat, läßt man sie mindestens 3 Tage unter einer leicht mit Watte verschlossenen Glasglocke an der atmosphärischen Luft stehen. Hierauf gibt man im sterilen Raum von den sterilisierten Eisenfeilspänen ungefähr 0,05 g in jeden Kolben und impft mit einer feinen sterilen Pipette aus einer bereits vorhandenen Kultur oder mit Rohmaterial. Für die Herstellung von Reinkulturen empfiehlt es sich nur junge, schnell wachsende Kulturen, bei denen noch die einzelnen, aus dem Impfmaterial entstandenen Kolonien zu unterscheiden sind, zum Abimpfen zu verwenden. Es genügt eine sehr geringe Menge von Impfmaterial. Hierauf bringt man die geimpften Kolben unter eine Glasglocke, in die man so viel Kohlensäure einleitet, daß die Luft in der Glocke ungefähr 1 Prozent davon enthält, und setzt die Kultur an einen kühlen Ort. Das Wachstum beginnt ungefähr nach 4 Tagen. Die *Spirophyllum*-Fäden wachsen als zusammenhängende Decke auf dem Boden des Gefäßes über den Eisenfeilspänen, oder sie setzen sich als feine hellgelbe Flocken an den Wänden des Gefäßes an.

Die Kulturmethode besitzt folgende Eigentümlichkeiten, die besonders zu beachten sind. Zunächst ist wesentlich, daß *Spirophyllum* in sehr wenig konzentrierter Nährlösung vorzüglich gedeiht. Größere Mengen von Nährsalzen als die angegebenen zuzugeben ist nicht ratsam, da das Wachstum dadurch nur ungünstig beeinflußt wird. Eisen und Nährlösung müssen unbedingt getrennt sterilisiert werden, da sonst aus mir unbekannten Gründen ein Wachstum überhaupt nicht eintritt. Außerdem ist sehr wichtig, daß die Nährflüssigkeit nach dem Sterilisieren einige Tage an der Luft stehen bleibt, damit das Wasser die beim Erhitzen verloren gegangenen Gase, besonders CO_2 und O wieder absorbieren kann. Erst dann darf das Eisen zugegeben werden. Das Eisen muß in Form grober Feilspäne verwendet werden. Das offizinelle Eisenpulver oder mit Wasserstoff reduziertes Eisen können nicht angewendet werden, da diese Eisensorten zu schnell in Oxydhydrat übergehen. Die groben Feilspäne werden von der im Wasser absorbierten Kohlensäure allmählich als doppelkohlensaures Salz gelöst. Der hierbei entstehende Wasserstoff sammelt sich zuweilen in Form von großen Blasen unter der über den Feilspänen wachsenden

Bakteriendecke an. Wenn die Bakterien in lockeren Flocken in der Kultur wachsen, dann steigt der Wasserstoff in kleinen Blasen an die Oberfläche. Solange sich noch metallisches Eisen in der Kultur befindet, ist ihr Gehalt an Eisenoxydulkarbonat annähernd konstant und beträgt ungefähr 0,01 %.

Man kann die auf die beschriebene Weise hergestellten Kulturen an der Luft stehen lassen, die Kohlensäure der Luft ist ausreichend für ein gutes Wachstum. Etwas schnellere und bessere Resultate erzielt man jedoch, wenn man die Kulturen in einer Atmosphäre wachsen läßt, die ungefähr 1 % CO_2 enthält, was man unter Glasglocken durch Einleiten von CO_2 sehr leicht bewerkstelligen kann. In bezug auf die Stickstoffquelle der Nährlösung habe ich gefunden, daß *Spirophyllum* Ammonsalze besser verarbeitet als Nitrate, am besten hat sich in den Kulturen Ammonsulfat bewährt.

Von der Reinheit meiner Kulturen überzeugte ich mich auf auf folgende Weise: Nach Anwendung von verschiedenen Färbungen wurde zunächst eine genaue mikroskopische Untersuchung vorgenommen. Da die *Spirophyllum*-Fäden nur sehr wenig Farbe annehmen, sind andere Bakterien auf diese Weise leicht zu erkennen. Stark eisenhaltige Fäden wurden zunächst zur Beseitigung des Eisenoxydhydrats mit verdünnter Salzsäure behandelt. Waren Bakterien auf diese Weise in den Kulturen nicht zu entdecken, so wurde denselben etwas sterilisierte Peptonlösung zugesetzt. Hierauf blieben die Kulturen etwa 8 Tage im Wärmezimmer bei ungefähr 25° stehen und wurden dann aufs neue in der oben beschriebenen Weise untersucht. Außerdem wurde anfangs ein Teil des Inhaltes der Kolben in Nährgelatine geimpft und in Petrischalen ausgegossen. Bei den im folgenden beschriebenen physiologischen Versuchen wurden nur die Kulturen berücksichtigt, die sich nach dem Versuch als rein ergaben. Es sei aber hier ausdrücklich bemerkt, daß Kulturen, die nicht mit sterilem Material hergestellt wurden, fast immer ein besseres Wachstum ergaben, obwohl bei der Untersuchung fremde Bakterien nur ganz vereinzelt gefunden werden konnten.

Der Einfluß des Lichtes auf das Wachstum der Eisenbakterien.

Irgend welche genaueren Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf das Wachstum der Eisenbakterien finden sich in der mir vorliegenden Literatur nicht verzeichnet. Schorler (3) be-

richtet, daß er die Beobachtung gemacht habe, daß *Gallionella* im Dunkeln besser wachse als im Lichte. Er hat für seine Annahme lediglich die Begründung, daß er bei der Untersuchung einiger weniger Eisenteile aus der offenen Elbe *Gallionella* (resp. *Spirophyllum)* nicht aufgefunden hat. Das Fehlen der Eisenbakterien in der Elbe ist wahrscheinlich auf ganz andere Ursachen zurückzuführen (s. die Angaben über das Vorkommen der Eisenbakterien in der Natur). Andererseits finden wir in der erwähnten Arbeit von Ellis (4) über *Spirophyllum* folgende Angaben: Er ließ seine *Spirophyllum*-Kulturen in vollem Tageslichte wachsen und schreibt dem Lichte den Hauptgrund seines Erfolges zu, indem er annimmt, daß das Licht das Wachstum aller Fremdorganismen in den Kulturen hemmt, dagegen den Eisenbakterien nicht schadet oder sogar förderlich ist.

Ich habe den Einfluß des Lichtes wie alle folgenden Erscheinungen hauptsächlich mit Reinkulturen von *Spirophyllum* untersucht und habe gefunden, daß das Licht keinen Einfluß auf das Wachstum ausübt, ein Resultat, das kaum anders zu erwarten war, denn in der Natur findet man alle Eisenbakterien in gleicher Üppigkeit sowohl in offenen, dem vollen Tageslicht ausgesetzten Gräben und Bächen, als in lichtlosen Behältern und Wasserleitungen. Die Angabe von Ellis ist sehr wohl begründet, bei Anwendung von Reinkulturen fällt in dieser Hinsicht der günstige Einfluß des Lichtes natürlich fort. Wenn man dafür sorgt, daß die Temperaturdifferenz zwischen den im Lichte, selbst bei zeitweiliger direkter Sonnenbestrahlung und den im Dunkeln gehaltenen Kulturen nicht allzugroß wird, so kann man stets ein vollständig gleichmäßiges Wachstum beobachten. Außerdem berichtet in neuester Zeit Molisch, daß das Wachstum der Reinkulturen von *Leptothrix ochracea* unabhängig ist vom Licht.

Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der Eisenbakterien.

Angaben über den Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der Eisenbakterien habe ich in der Literatur nicht gefunden. Bei meinen Kulturversuchen mit *Spirophyllum* erwies sich die Temperatur als ein wesentlicher Faktor. Die verschiedenen Arten der Eisenbakterien verhalten sich in bezug auf die Temperatur verschieden. Ich möchte nicht unterlassen, folgende Beobachtung aus der Natur hier anzuführen:

Im Februar 1909 untersuchte ich einen Bach der Dresdener Heide (Mordgrundbach). Derselbe enthielt stellenweise, zum Teil unter Schnee und Eis, große Mengen von Eisenbakterien. Die Untersuchung ergab, daß es sich um *Spirophyllum* handelte. Bei eingehender Untersuchung konnte ich keine anderen Eisenbakterien entdecken. Einige Monate später, im Sommer desselben Jahres, war der Bach wiederum dicht mit Eisenbakterien bewachsen, aber die gelben Massen bestanden, wie die mikroskopische Untersuchung ergab, aus *Leptothrix ochracea*, es gelang mir nur mit vieler Mühe, Spuren von *Spirophyllum* nachzuweisen. Als im nächsten Winter wieder stärkerer Frost eingetreten war, bestand die Bakterienvegetation wieder ausschließlich aus *Spirophyllum*, im folgenden Sommer wieder aus *Leptothrix*. Durch Versuche habe ich konstatiert, daß dieser Wechsel lediglich auf den Einfluß der Temperatur zurückzuführen ist.

In bezug auf den Temperatureinfluß habe ich folgende allgemeine Beobachtungen gemacht. *Crenothrix polyspora* und *Clonothrix fusca* treten am häufigsten in den Monaten auf, in denen das Wasser die höchste Temperatur besitzt, sie gedeihen also üppig bei einer Temperatur von 18—25°, während eine Temperaturverminderung das Wachstum stark zu hemmen scheint. *Leptothrix* findet man im Sommer und Winter mit fast gleicher Häufigkeit, im Winter ist eine geringe Abnahme des Wachstums zu beobachten. Genauere Untersuchungen stellte ich mit Reinkulturen von *Spirophyllum* an. Von einer Anzahl gleich angesetzter Kolben wurden je drei 14 Tage lang bei verschiedener Temperatur kultiviert. Es wurden folgende Temperaturen angewendet: 0—0,5° wurde dadurch erhalten, daß die Kolben in schmelzendem Eis gehalten wurden. 6°: Temperatur des Eisschrankes. 15°: Temperatur eines Kellerraumes. 22°, 27° und 32°: wurden in verschiedenen Etagen des Wärmezimmers geboten. Ich erhielt folgende Resultate:

Temperatur	Wachstum von *Spirophyllum*
0—0,5°	sehr gut
6°	vorzüglich (beste Kultur)
15°	gut
22°	sehr gering
27°	kein Wachstum
32°	kein Wachstum

Aus dem Versuch geht hervor, daß *Spirophyllum* ausgesprochen kälteliebend ist, so daß Temperaturen von über 20° bei den an-

gewendeten Kulturbedingungen das Wachstum stark hemmen oder ganz aufheben. Bei einer Temperatur, die nahe dem Schmelzpunkt des Wassers liegt, wächst *Spirophyllum* vorzüglich, nur etwas langsamer als bei wenig höherer Temperatur. Das besonders häufigere Auftreten von *Spirophyllum* im Winter und das starke Zurücktreten dieser Art in den Sommermonaten ist somit leicht erklärlich.

Molisch (5) berichtet in seiner neuesten Arbeit über das Temperaturbedürfnis von *Leptothrix ochracea:* „Wächst bei 5° und 40° nicht mehr, gut bei Zimmertemperatur, noch besser bei 23—25°".

Kulturen mit und ohne Eisen.

Zunächst galt es nun, die Frage festzustellen, ob *Spirophyllum* fähig ist ohne Eisen zu wachsen oder nicht. Die Versuche führte ich mit Reinkulturen aus. Da *Spirophyllum* sehr gut auf metallischem Eisen wächst, konnte ich die Kultur in der oben beschriebenen Weise anwenden, ohne Eisensalze zusetzen zu müssen. 40 kleine Erlenmeyerkolben wurden mit der angegebenen Nährlösung aus chemisch reinen Salzen gefüllt, im sterilen Raum von einer Reinkultur geimpft und 20 davon mit Eisenfeilspänen versehen. Darauf ließ ich die Kulturen 14 Tage lang im Dunkelschrank stehen. Alle 20 Kulturen mit Eisenfeilspänen zeigten nach dieser Zeit ein vorzügliches Wachstum von *Spirophyllum.* In keiner der unter ganz gleichen Verhältnissen sich befindenden eisenfreien Kulturen war auch nur eine Spur von Wachstum wahrzunehmen. Dieser grundlegende Versuch wurde noch einmal mit demselben Resultat wiederholt.

In der aus chemisch reinen Salzen und destilliertem Wasser hergestellten Nährlösung war auf chemischem Wege Eisen nicht nachzuweisen. Gegen den Versuch ließ sich daher der Einwand erbringen, daß kein Organismus ohne Spuren von Eisen gedeihen könne, daß also auch *Spirophyllum* zu seinem Wachstum eine gewisse Menge Eisen benötige. Deshalb wiederholte ich den Versuch und gab statt des destillierten Wassers solches aus der Leipziger Leitung. Der Erfolg war genau derselbe wie bei dem ersten Versuch. Außerdem konnte ich konstatieren, daß in der mit destilliertem Wasser ohne Eisen angesetzten Kultur nach Zusatz von chemisch reinem Asparagin eingeimpfte Pilze sehr gut wuchsen, was beweist, daß so geringe Spuren von Eisen, wie sie zum Auf-

bau organischer Substanz nötig sind, auch in der Nährlösung enthalten waren, die aus als chemisch rein bezeichneten Salzen hergestellt war.

Aus dem Versuch ergibt sich also die Tatsache, daß *Spirophyllum ferrugineum* bei den angewendeten Kulturbedingungen zu seinem Wachstum eine gewisse Menge Eisen nötig hat, abgesehen von den Spuren von Eisen, die wohl jeder Organismus zu seinem Gedeihen gebraucht.

Kulturversuche mit anderen Metallen.

Da *Spirophyllum* auf metallischem Eisen vorzüglich gedeiht, entsteht die Frage, ob das Eisen durch andere Metalle ersetzbar ist. Um diese Frage zu entscheiden, wurden den Kulturen anstatt Eisen verschiedene andere chemisch reine Metalle zugesetzt, und zwar: Blei, Zinn, Wismut, Kadmium, Zink, Nickel, Kobalt, Wolfram, Chrom, Magnesium und Kupfer. Die Kontrollkulturen mit Eisen gediehen vorzüglich. In den Kulturen mit Wolfram zeigten sich einige gut ausgebildete Kolonien von *Spirophyllum*, eine genauere Untersuchung ergab jedoch, daß das Wolframpulver durch einige Körnchen Eisen verunreinigt war. Alle anderen Kulturen blieben ohne jedes Wachstum. Der Versuch zeigt also, daß die geprüften Metalle das Eisen unter diesen Bedingungen nicht vertreten können.

Über die Manganspeicherung der Eisenbakterien.

Die mit Mangan angesetzten Kulturen von *Spirophyllum* ergaben gleichfalls kein Wachstum, obwohl von anderen Eisenbakterien bekannt ist, daß sie Mangan eben so gut speichern wie Eisen. Die von mir untersuchten *Crenothrix*- und *Clonothrix*-Fäden aus den Dresdener Wasserwerken mit starkem Mangangehalt enthielten neben Mangan etwas Eisen. Von *Leptothrix ochracea* erhielt ich jedoch wiederholt gute Rohkulturen mit Manganspeicherung, ohne daß ich in den Scheiden hätte Eisen nachweisen können.

Falls die Eisenspeicherung für die erwähnten Arten überhaupt von ernährungsphysiologischer Bedeutung ist, ist es nicht ausgeschlossen, daß das Mangan die Funktion des Eisens vertreten kann, zumal da die in Betracht kommenden Mangansalze sich den entsprechenden Eisensalzen außerordentlich ähnlich verhalten. Das Mangankarbonat ist wie das entsprechende Eisensalz in CO_2-haltigem Wasser löslich und zerfällt mit Sauerstoff unter beträchtlicher

Energieabgabe in Manganhydroxyd und Kohlensäure. Notwendig folgt aber hieraus die Möglichkeit einer Vertretung des Eisens durch Mangan nicht. Denkbar wäre auch, daß die Manganspeicherung andere Ursachen hätte.

Daß es mir gerade mit *Spirophyllum* nicht gelungen ist, Mangankulturen herzustellen, liegt vielleicht an einem Kulturfehler, da sämtliche Eisenbakterien sehr empfindlich sind und bei der geringsten Abänderung ihrer Lebensbedingungen das Wachstum einstellen. Genauere Angaben über die Manganspeicherung zu machen, ist mir daher vorläufig nicht möglich.

Kulturen mit Eisenoxydulkarbonat.

Bei den Kulturen, die metallisches Eisen enthalten, ist es klar, daß das Eisen nicht als Metall von den Bakterien verarbeitet werden kann. Das Eisen wird wahrscheinlich von der im Wasser enthaltenen Kohlensäure gelöst und von den Bakterien als Oxydulkarbonat aufgenommen. Wenn diese Annahme richtig ist, muß das Metall in den Kulturen durch eine Lösung von Eisenkarbonat ersetzt werden können. Der Versuch ergibt die Richtigkeit dieser Annahme. Eine gesättigte Lösung von Eisenbikarbonat stellt man sich sehr leicht dadurch her, daß man in ein Gefäß mit Wasser etwas reduziertes Eisen gibt und Kohlensäure durchleitet. Die Lösung enthält dann etwa 0,01 % des Eisensalzes. Bei der Kultur zeigt sich folgende bemerkenswerte Tatsache. Gibt man die Lösung in einen Kolben und impft mit *Spirophyllum*, so tritt nach kurzer Zeit ein gutes Wachstum ein, das aber sehr bald aufhört. Die Bakterien wachsen nur dann weiter, wenn man die Lösung erneuert. Genau dieselbe Beobachtung hatte Winogradsky mit *Leptothrix ochracea* gemacht. Sobald *Leptothrix* kein gelöstes Eisenbikarbonat mehr zur Verfügung hatte, stellte sie ihr Wachstum ein. Es ergibt sich also, daß *Spirophyllum* mit Eisenoxydulkarbonat vorzüglich gedeiht.

Kulturen mit Eisenoxyd- und Oxydulsalzen.

Es entsteht nun die wichtige Frage, welche Eisensalze von den Bakterien verarbeitet werden. Zur Ausführung der Versuche kann man nicht einfach eine Nährlösung mit einem bestimmten Prozentsatz eines Eisensalzes versetzen und dann die Kultur sich selbst überlassen, da die Salze in der Konzentration, in der sie beigegeben

werden dürfen, sämtlich sehr unbeständig sind. Es durfte höchstens eine Konzentration von 0,01 % angewendet werden, der des gelösten Karbonates entsprechend. Die Kulturen wurden daher so eingerichtet, daß durch eine Hebervorrichtung die Nährflüssigkeit täglich erneuert werden konnte. Es wurde zunächst davon abgesehen, die Kulturen steril zu halten. Wie die Erfahrung gezeigt hatte, konnte das kaum einen Einfluß auf die Resultate haben, da die Nährlösung frei von organischer Substanz war. Der Erfolg der Kulturen enthob mich der Mühe, dieselben mit sterilem Material zu wiederholen. Die Nährlösung hatte außer den angegebenen Eisensalzen die oben beschriebene Zusammensetzung.

Es wurden 5 Kulturreihen angesetzt. Die Nährflüssigkeit der Kulturen wurde täglich erneuert.

1. Versuch. Nährlösung mit 0,01 % Eisenbikarbonat. Nach 14 Tagen waren sämtliche Kulturen vorzüglich gewachsen.

2. Versuch. Die Nährlösung enthielt statt des Eisenbikarbonates 0,01 % Eisenchlorid. Nach 14 Tagen fand sich in den Kulturen eine geringe Ausfällung von Eisenhydroxyd, von einem Wachstum der Bakterien war keine Spur zu entdecken.

3. Versuch. Die Nährlösung enthielt 0,01 % Eisenoxydulsulfat. Resultat wie bei Versuch 2, nur eine etwas stärkere Ausfällung von Eisenoxydhydrat. In einem Kolben waren eisenspeichernde Pilze aufgetreten.

Es ergibt sich also aus den drei vorstehenden Versuchen die Tatsache, daß Eisenoxydulkarbonat verarbeitet wird, Eisenchlorid und Eisenoxydulsulfat dagegen nicht. Es liegt nun der Schluß nahe, daß die bei dem Zerfall des Chlorids und Sulfates auftretenden Säuren vielleicht dem Wachstum hinderlich sein könnten. Um diesen Umstand näher zu untersuchen, wurden zwei weitere Versuche angestellt.

4. Versuch. Nährlösung mit 0,01 % $FeCO_3$ und 0,005 % Fe_2Cl_6.

5. Versuch. Nährlösung mit 0,01 % $FeCO_3$ und 0,005 % $FeSO_4$.

In beiden Fällen war ein gutes Wachstum von *Spirophyllum* zu konstatieren, ungefähr in dem Maße, als ob das Chlorid und das Sulfat überhaupt nicht anwesend wären. Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß diese beiden Eisensalze für das Wachstum der Bakterien schädliche Bestandteile nicht enthalten können.

Wenn ich z. B. ein gutes Wachstum von Eisenbakterien auf metallischem Eisen, auf geschmolzenem Schwefeleisen, oder nach der Methode von Winogradsky mit Eisenoxydhydrat erhielt, so sind die Erfolge wahrscheinlich auf eine Bildung von Eisenoxydulkarbonat in der kohlensäurehaltigen Nährlösung zurückzuführen.

Der Einfluß des Luftsauerstoffes.

Durch die beschriebenen Untersuchungen war festgestellt, daß *Spirophyllum* bei den angewendeten Kulturbedingungen ohne Eisenbikarbonat nicht wachsen kann. Es galt nun, den Einfluß des Luftsauerstoffes näher zu untersuchen. Aus einer Glocke, in der sich die Kulturkolben befanden, wurde zunächst durch längeres Einleiten von Kohlensäure die Luft verdrängt. Um zu verhüten, daß während der Dauer des Versuches durch den Gummiverschluß in die Glocke Luft einströmen konnte, wurde die ganze Vorrichtung unter Wasser gesetzt. Nach 14 Tagen zeigte sich keine Spur von Wachstum. Die Glocke wurde geöffnet, es wurde atmosphärische Luft zugelassen und hierauf die Glocke wieder unter Wasser gesetzt. Nach wenigen Tagen begann *Spirophyllum* gut zu wachsen.

Dieser Versuch bildet allerdings noch keinen Beweis dafür, daß *Spirophyllum* ohne Sauerstoff nicht zu wachsen vermag. Es liegt die Möglichkeit vor, daß das Wachstum lediglich durch die hohe Konzentration der Kohlensäure verhindert wurde. Der Versuch mußte also in abgeänderter Form wiederholt werden. Die Kulturkolben kamen zu diesem Zwecke unter eine Glasglocke, die auf eine Glasplatte genau aufgeschliffen, und die mit einem Glashahn versehen war. Nachdem sich die Verschlüsse als vollkommen dicht erwiesen hatten, wurde der Hahn mit einer Wasserluftpumpe verbunden und die Glocke auf ungefähr 3 mm Quecksilberdruck evakuiert. Hierauf wurde reiner, sauerstofffreier Wasserstoff in die Glocke geleitet. Das Evakuieren und Einleiten von Wasserstoff wurde dreimal wiederholt. Auf dem Boden der Glocke befand sich außer den Kulturkolben noch eine flache Schale, die in der Mitte eine Scheidewand aus Paraffin besaß. Die eine Häfte der Schale war mit Wasser gefüllt, die andere mit einem Gemisch von Natriumbikarbonat und Weinsäure. Durch Neigen der Glocke trat nun das Wasser über die Scheidewand zu dem Natriumbikarbonat und der Weinsäure, und damit begann die Entwicklung der genau berechneten Menge von CO_2. In der Glocke war zu diesem Zwecke

eine entsprechende Luftverdünnung gelassen worden. Auf diese Weise enthielt die Glocke reinen Wasserstoff und 1 % reine Kohlensäure. Von einer Hemmung des Wachstums durch zu hohe Konzentration der Kohlensäure konnte also hier nicht mehr die Rede sein. Ebenso kann man dem indifferenten Wasserstoff kaum einen Einfluß zuschreiben. Die Kultur zeigte nach 3 Wochen keine Spur von Wachstum. Derselbe Versuch wurde noch einmal wiederholt und es wurde dabei eine beträchtlich größere Menge an Impfmaterial zugegeben. Der Erfolg war genau derselbe. Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß *Spirophyllum* zu seinem Wachstum atmosphärischen Sauerstoff nötig hat.

Die Bedeutung der Kohlensäure.

Bei meinen Untersuchungen hatte ich festgestellt, daß alle natürlichen Gewässer, in denen Eisenbakterien gut gedeihen, reich an Kohlensäure sind. Es galt nun, die Bedeutung letzterer näher zu untersuchen. Ich wendete die oben beschriebenen Reinkulturen mit Eisenfeilspänen an. Sieben kleine Erlenmeyerkolben wurden unter eine Glasglocke gebracht, die atmosphärische Luft mit etwa 1 % CO_2 enthielt, sieben vollkommen gleich angesetzte unter eine Glasglocke, in der sich eine CO_2-freie Luft befand (CO_2 absorbiert mit KOH). Nach 14 Tagen war in allen Kolben in CO_2-haltiger Luft ein vorzügliches Wachstum eingetreten. Alle sieben Kolben in der CO_2-freien Luft waren unverändert geblieben. Ich wiederholte den Versuch mit demselben Erfolge.

Das Resultat dieser Versuche ist aber nicht neu und deckt sich mit der bereits früher gemachten Erfahrung, daß *Spirophyllum* zu seinem Wachstum Eisenoxydulkarbonat braucht. Wenn die Kulturen sich in CO_2-freier Luft befinden, ist eben die Bildung des Eisenoxydulkarbonates ausgeschlossen. Will man den Kulturen das gelöste Salz zugeben, so ist es aber unvermeidlich, daß man einen Überschuß von freier Kohlensäure mit zugibt. Auf direktem Wege ist also der Einfluß der freien Kohlensäure nicht nachweisbar.

Vollkommener Ausschluß organischer Substanzen.

In der Natur finden wir oft ein üppiges Wachstum von Eisenbakterien in Gewässern, die fast frei von organischer Substanz sind. Ebenso gediehen meine Reinkulturen von *Spirophyllum* vorzüglich ohne den geringsten Zusatz von organischem Kohlenstoff. Es galt

nun durch genauere Versuche festzustellen, ob diese Beobachtungen tatsächlich richtig sind. Zu diesem Zwecke wurden die Kulturkolben sorgfältig mit Chromsäure gereinigt, die Nährflüssigkeit aus chemisch reinen Salzen und destilliertem Wasser im sterilen Raum staubfrei zugegeben und die Kolben nach dem Impfen mit Glaswolle verschlossen. Hierauf wurden die Kolben unter eine Glasglocke gebracht. Durch langsames Absaugen wurde die Glocke mit einer Luft gefüllt, die durch drei hintereinander geschaltete U-Röhren mit Bimssteinstücken gegangen war. In der ersten Röhre waren die Bimssteinstücke mit konzentrierter H_2SO_4, in der zweiten mit $KMnO_3$ und in der dritten mit $NaHCO_3$ getränkt. Alle in der Luft befindlichen organischen Basen und Säuren, die im Laboratorium in oft nicht unbedeutender Menge vorhanden sind, mußten auf diese Weise absorbiert werden. Von einem besonderen Zusatz von Kohlensäure wurde in diesem Falle abgesehen, da die Luftkohlensäure zum Wachstum von *Spirophyllum* genügt. Die Luft in der Glocke wurde aber durch langsames Absaugen täglich erneuert. Das Wachstum von *Spirophyllum* ging bei diesem Versuch vollkommen normal vor sich. Ein zur Kontrolle mit *Penicillium glaucum* beimpfter Kolben zeigte keine Spur von Wachstum, das jedoch sofort nach Zusatz von etwas Traubenzucker eintrat. Es unterliegt daher kaum einem Zweifel, daß der zum Aufbau der Bakterien nötige Kohlenstoff aus anorganischer Kohlensäure gewonnen wurde. Ob auch andere Eisenbakterien ohne organische Substanz zu leben vermögen, bedarf weiterer Untersuchungen. Auf Grund meiner Beobachtungen halte ich es für *Gallionella*, falls dies ein selbständiger Organismus ist, und auch für *Leptothrix ochracea* für wahrscheinlich.

Kulturen mit organischer Substanz.

Um zu untersuchen, inwieweit *Spirophyllum* auch organische Substanz verarbeitet, machte ich folgenden Versuch. Zu den üblichen Reinkulturen gab ich Pepton oder Rohrzucker in Dosen von je 0,3%, 1%, 5%, 3% und 5%. Der Erfolg war überraschend. In sämtlichen Kulturen zeigte sich keine Spur von Wachstum. Eine genaue Untersuchung ergab, daß die Kulturen bis auf zwei steril geblieben waren. Um genauer festzustellen, bei welcher Konzentration der organischen Substanz *Spirophyllum* das Wachstum einstellt, wurde der Versuch mit weit geringeren Quantitäten von Rohrzucker, Pepton und Asparagin wiederholt. Es wurden in ver-

schiedenen Abstufungen Konzentrationen von 0,005 bis 1 % angewendet. Als Resultat ergaben sich für die angewendeten organischen Substanzen ungefähr folgende niedrigste Konzentrationen, bei denen Reinkulturen von *Spirophyllum ferrugineum* das Wachstum vollständig einstellten:

Pepton . .	0,25 %
Rohrzucker .	0,25 %
Asparagin .	0,35 %

In allen Fällen zeigte aber ein Zusatz von 0,01 % organischer Substanz schon eine ganz bedeutende Hemmung des Wachstums. Die Versuchsreihe mit Pepton mußte wiederholt werden, da sich einige Kolben nach Beendigung des Versuches als nicht steril erwiesen.

Die Resultate dieser Untersuchungen machen es also wahrscheinlich, daß *Spirophyllum* überhaupt nicht imstande ist, seinen Kohlenstoff aus organischer Substanz zu gewinnen. Es ist vielleicht nicht ausgeschlossen, daß es bei anderer Versuchsanstellung gelingen könnte, *Spirophyllum* mit organischer Substanz ohne Eisen zu kultivieren, wie das Molisch in neuester Zeit mit Reinkulturen von *Leptothrix* durchgeführt hat. Mir ist dies trotz vieler Versuche nicht gelungen.

Quantitative Kohlenstoffbestimmung.

Um eine zahlenmäßige Bestätigung der Kohlensäureassimilation zu erhalten, wurde der Ertrag einer Reinkultur der Elementaranalyse unterzogen. Die Analyse hat lediglich den Zweck, den Kohlenstoffgehalt der Kultur zu bestimmen. Von einer Bestimmung der Eiweißkörper, des Fettes usw. wurde abgesehen.

125 ccm der angegebenen Nährlösung wurden auf 5 Erlenmeyerkölbchen verteilt. Dann wurde denselben insgesamt 0,2175 g Eisen in Form von Feilspänen zugesetzt. Als in der Kultur nach 3 Wochen ein sehr gutes Wachstum eingetreten war, wurde der Gesamtinhalt der 5 Kolben quantitativ in eine Platinschale übergespült. Ein leiser Anflug von Substanz konnte mit Gummiwischern nicht von den Kölbchen entfernt werden und mußte, da Säure nicht Anwendung finden durfte, darin gelassen werden. Die Schale mit der Substanz wurde im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die so gewonnene Substanzmenge betrug 0,4965 g. Sie wurde der Analyse unterworfen. Es ergaben sich folgende Werte:

Gesamtgewicht der Trockensubstanz	0,4965 g
Asche	0,4752 g
Glühverlust	0,0213 g
	0,4965 g

Dieser Glühverlust stellt nun aber nicht das Gewicht der verbrennbaren organischen Substanz dar. Es ist hierbei noch folgendes zu berücksichtigen. Das zugesetzte Eisen hatte einen Gesamtgehalt an Kohlenstoff von 0,6 %. Da die den Kulturen zugesetzte Menge 0,2175 g betrug, ergab sich für die zugesetzte Menge Kohlenstoff 0,0013 g. Außerdem zeigte sich, daß die getrocknete Substanz 0,24 % anorganische Kohlensäure enthielt, die aus den in der Nährlösung gebildeten Karbonaten herrührte. Dieselbe wurde nach der Methode von Fresenius bestimmt. Sie stellte ein Gesamtgewicht von 0,0010 g dar. Beide Gewichtsmengen müssen von dem Gewicht des Glühverlustes abgezogen werden, damit man das Gesamtgewicht der verbrennbaren organischen Substanz erhält.

Gesamtgewicht der Trockensubstanz	0,4965 g
Glühverlust	0,0213 g
Gesamtgew. des mit dem Eisen zugesetzten C	0,0013 g
Gesamtgew. der in den Karbonaten enth. CO_2	0,0010 g
Gewicht der verbrennbaren organ. Substanz .	0,0190 g

Die Elementaranalyse der Substanz ergab folgende Werte:

Wasserstoff	0,0081 g
Kohlenstoff	0,0045 g
Sauerstoff (+ N + S) . .	0,0087 g
Asche	0,7452 g
	0,4965 g.

Nach Abzug der Werte des mit dem Eisen zugesetzten Kohlenstoffes und der in der Trockensubstanz in Form von Karbonaten enthaltenen Kohlensäure berechnet sich für die verbrennbare Substanz folgende prozentuale Zusammensetzung:

Wasserstoff in der brennbaren Substanz . .	42,63 %
Kohlenstoff „ „ „ „ . .	16,01 %
Sauerstoff (+ N + S) in der brennb. Substanz	41,36 %
	100,00 %.

Bei der Beurteilung des Resultates ist folgendes zu berücksichtigen. Die gefundene Menge Kohlenstoff ist sicher geringer als die tatsächlich in der Substanz vorhandene. Erstens ergibt die Analyse erfahrungsgemäß leicht etwas zu niedrige Werte, und dann ist zu beachten, daß eine geringe Menge organischer Substanz sich nicht aus den Kulturgefäßen entfernen ließ. Vor allem aber ist die abgezogene Menge Kohlenstoff, die im Eisen enthalten war, entschieden zu hoch, da ein großer Teil derselben im Eisen in Form von Carbiden enthalten ist und bei der Oxydation desselben als Kohlenwasserstoff frei wird. Da das Verhältnis des freien zum gebundenen Kohlenstoff in Eisen nicht genau festgestellt werden konnte, wurde der Gesamtwert des Kohlenstoffes in Abzug gebracht.

Die Menge des in der Kultur von den Bakterien gebundenen Kohlenstoffes von über 3 mg erscheint vielleicht auf den ersten Blick ziemlich gering, die in der Kultur gewachsene und zur Analyse verwendete Bakterienmenge war aber ganz bedeutend. Dieser Umstand erklärt sich daraus, daß die lebenden *Spirophyllum*-Fäden, wie bereits im morphologischen Teile näher erörtert wurde, außerordentlich wenig konsistent sind. Die lebenden Fäden besitzen aller Wahrscheinlichkeit nach einen Wassergehalt von über 90 %. Außerdem ist zu bedenken, daß der bei weitem größte Teil des Trockengewichtes der *Spirophyllum*-Fäden aus Eisenoxydhydrat besteht. Dieses Endprodukt der chemischen Umsetzung kann eben hier nicht wie bei anderen autotrophen Bakterien in das umgebende Wasser diffundieren, sondern bleibt in fester Form im Bakterienkörper zurück.

Die Analyse bestätigt zweifellos die bereits aus anderen Versuchen gewonnene Erfahrung, daß *Spirophyllum* bei seinem Wachstum in anorganischer Nährlösung anorganischen Kohlenstoff bindet.

Ist die Eisenspeicherung ein rein mechanischer Vorgang?

Durch die beschriebenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß bei *Spirophyllum* mit dem Gewinn organischer Substanz aus anorganischer Kohlensäure notwendigerweise eine Oxydation von Eisenoxydul zu Eisenoxyd verbunden ist, wobei zugleich eine Speicherung des gebildeten Eisenoxydhydrats im Bakterienkörper stattfindet.

Zunächst ist zu beachten, daß bei *Spirophyllum* nicht eine Eiseninkrustation eintritt wie etwa die Kalkinkrustation bei gewissen Wasserpflanzen, z. B. *Chara, Cladophora, Elodea* usw. (vgl. Hassak, 1). Das abgeschiedene Eisenoxydhydrat bildet nicht eine mehr oder weniger starke Schicht um den Bakterienkörper wie der

abgeschiedene Kalk bei den erwähnten Wasserpflanzen, sondern das Eisenhydroxyd hat die *Spirophyllum*-Fäden durchdrungen, und zwar, soweit es sich unter dem Mikroskop beurteilen läßt, ganz gleichmäßig. Die Menge des abgeschiedenen Eisens ist im Innern des Fadens ebenso groß wie an der Peripherie. Etwas anders verhalten sich *Crenothrix polyspora*, *Clonothrix fusca* und *Leptothrix ochracea*. Bei diesen ist eine Differenzierung der Bakterienfäden in einzelne Zellglieder und eine äußere Gallertscheide deutlich zu beobachten. Die Eisenspeicherung tritt hier nur in der Scheide ein, aber auch hier ist das Eisen in der Gallertsubstanz der Scheide gleichmäßig verteilt. Mit dem Zunehmen der gespeicherten Eisenmenge nimmt auch das Volumen der Scheide zu. Nur bei ganz alten, meist schon abgestorbenen Fäden von *Spirophyllum* und anderen Eisenbakterien findet man manchmal eine Rostanhäufung außerhalb der Scheide, die aber aller Wahrscheinlichkeit nach auf rein mechanischem Wege entstanden ist. Mit Salzsäure ist diese Rostkruste leicht wegzulösen und es tritt dann der eisenhaltige Bakterienfaden deutlich hervor, da das in der Gallertsubstanz enthaltene Eisen in Salzsäure schwer löslich ist. Bei meinen Versuchen war eine Rostabscheidung außerhalb des *Spirophyllum*-Fadens nur an ganz alten Kolonien und auch nur in seltenen Fällen zu beobachten.

Es fragt sich nun, ob die Eisenspeicherung bei *Spirophyllum* von der Lebenstätigkeit des Organismus abhängig ist oder nicht. Da das Eisen nur immer innerhalb der Substanz des *Spirophyllum*-Fadens gespeichert wird, liegt der Schluß nahe, daß die Eisenspeicherung überhaupt nicht von der Bakterienzelle abhängig ist, sondern lediglich auf eine mechanische Tätigkeit der Gallertsubstanz des Fadens zurückzuführen ist. Molisch sucht diesen Schluß für *Leptothrix ochracea* zu beweisen. Er sagt (Molisch 6): „Das Auffallende liegt bei den Eisenbakterien gar nicht in einem spezifischen Oxydationsvermögen, sondern vielmehr in einer merkwürdigen Anziehungskraft der Gallertscheide für Eisenverbindungen“. Er gründet diesen Satz hauptsächlich darauf, daß er in den Bakterienzellen von *Leptothrix* Eisen nicht nachweisen konnte und daß auch tote Scheiden von *Leptothrix* in eisenhaltigem Wasser eine gewisse Menge Eisen aufnehmen. Ich habe diese Angaben nachgeprüft und kann sie bestätigen.

Um genauer festzustellen, inwieweit tote Gallertmassen fähig sind, Eisensalze aufzunehmen, stellte ich weitere Versuche an. Die *Spirophyllum*-Fäden besitzen anscheinend eine ähnliche galler-

tige Konsistenz wie die Scheiden von *Crenothrix*, *Clonothrix* und *Leptothrix*. Ich bemühte mich nun zunächst eine Masse herzustellen, deren physikalische Beschaffenheit der Substanz der Gallertscheide der Eisenbakterien möglichst nahekam. Eine brauchbare Masse erhielt ich schließlich durch Härten von Gelatine in ca. 3-proz. Formollösung. Mit dieser so hergestellten Masse wurden folgende Versuche angestellt. Zunächst wurde festgestellt, daß die Masse aus sehr verdünnten Lösungen tatsächlich Eisen speichert. Die Gelatine gab, nachdem sie 24 Stunden in einer 0,001-proz. Lösung von Eisenchlorid gelegen hatte, eine starke Eisenreaktion, die weit stärker war, als sie einer Lösung von gleicher Konzentration zukommt. Dasselbe Resultat erzielte ich mit einer Lösung von Eisenoxydulsulfat. — Das Leipziger Leitungswasser gibt mit Blutlaugensalz keine deutliche Eisenreaktion. Nachdem sich die gehärtete Gelatine 8 Tage lang in fließendem Leitungswasser befunden hatte, gab sie eine sehr deutliche Reaktion.

Die Versuche zeigen also, daß tote Gallertmassen fähig sind, gewisse Mengen von Eisensalzen in sich aufzunehmen. Es ist hierbei vollkommen gleich, ob es sich um Oxyd- oder Oxydulsalze handelt. — Ich machte wiederholt die Beobachtung, daß z. B. auch die zähe Gallertmasse, die den Laich von Wasserschnecken (Planorbis) umgibt, ebenfalls oft beträchtliche Eisenmengen speichert. Die Laichmassen färben sich oft mit gelbem Blutlaugensalz und verdünnter Salzsäure tiefblau. Die Speicherung von Eisensalzen in Gallerte ist also ein allgemein verbreiteter Vorgang. Die Beobachtung von Molisch, der aus den Bakterienscheiden von *Leptothrix* das Eisen herauslöste und dann beobachtete, daß die toten Scheiden in eisenhaltigem Wasser wieder Eisen aufnahmen, ist somit vollkommen erklärt. Dennoch spielt die Eisenspeicherung bei dem Wachstum der Bakterien eine ganz wesentliche Rolle. Bei der rein mechanischen Speicherung wird in allen Fällen nämlich nur eine ganz bestimmte Menge Eisen von der Gallerte aufgenommen, ist dieser Punkt erreicht, so nimmt die Masse aus der Lösung von konstanter Konzentration kein Eisen mehr auf. Ich habe dies durch viele Versuche genau festgestellt. Ob ich z. B. die gehärtete Gelatine 8 Tage oder 4 Wochen lang in fließendem Leitungswasser liegen ließ, war für die gespeicherte Eisenmenge ganz gleich. Die Sättigung war bereits nach einigen Tagen eingetreten, und obwohl der Gelatine immer neues Eisen zur Verfügung stand, nahm sie doch keine Spur mehr davon auf. Derartige Versuche lassen sich

kolorimetrisch sehr genau durchführen. Bei den toten Bakterienscheiden ist genau derselbe Vorgang zu beobachten. Ganz anders liegt der Fall bei den lebenden Bakterien. Die *Spirophyllum*-Fäden nehmen solange Eisen auf, als sie lebenstätig sind. Dasselbe gilt von anderen Eisenbakterien. Bereits Winogradsky (2) beschreibt die an *Leptothrix* gemachte Beobachtung, daß nur der Teil der Scheide größere Mengen von Eisen speichert, der eine lebende Bakterienzelle enthält. Besonders deutlich können wir an *Crenothrix* und *Clonothrix* beobachten, daß die Scheiden durch Eisenaufnahme um so dicker werden, je älter die Fäden sind. Nach längerem Wachstum können die Scheiden weit mehr als das Zehnfache ihrer ursprünglichen Dicke erreichen. Tote Bakterienscheiden oder andere Gallertmassen nehmen bei der Eisenspeicherung nie auch nur im geringsten Grade an Volumen zu, auch steht die gespeicherte Eisenmenge in gar keinem Verhältnis zu der von den lebenden Bakterien aufgenommenen, sie ist im Vergleich zu dieser verschwindend gering.

Die chemische Natur der Gallerte kann hierbei keine wesentliche Rolle spielen. Nehmen wir z. B. an, die Gallertsubstanz wäre an sich alkalisch, so würde sich in derselben wohl eine größere Eisenmenge niederschlagen können, als in einer neutralen Gallerte, aber auch nur bis zu einem gewissen Sättigungsgrade. Ist dieser erreicht, so nimmt die Gallerte kein Eisen mehr auf. (Ganz anders würde natürlich der Fall liegen, wenn die Bakterienzelle dauernd Alkali in die Gallertsubstanz ausschiede. Dann liegt aber indirekt eine Lebenstätigkeit der Bakterienzelle und nicht ein mechanischer Prozeß der Gallerte vor.)

Aus dem Gesagten geht also hervor, daß sowohl bei *Spirophyllum* als auch bei den anderen Eisenbakterien die intensive Eisenspeicherung in irgend einem Zusammenhange mit dem Leben dieser Organismen stehen muß.

Besondere Beobachtungen machte ich noch bei meinen Versuchen mit *Spirophyllum*. Wenn man die beschriebenen Kulturen mit einer relativ geringen Menge Eisen und mit einem bestimmten, möglichst konstant bleibenden Überschuß von CO_2 versetzt, so ist in der Kultur mechanisch durch den Luftsauerstoff ausgefallenes Eisen nicht wahrzunehmen. Nach dem chemischen Massenwirkungsgesetz kann in einer $FeCO_3$-Lösung das Eisen eben nicht ausfallen, wenn CO_3-Ionen im Überschuß vorhanden sind. Die in der Kultur gewachsenen *Spirophyllum*-Fäden enthielten aber eine beträchtliche

Menge Eisenoxydhydrat gespeichert. Durch diese Tatsache ist unzweifelhaft bewiesen, daß bei *Spirophyllum* die Eisenspeicherung durch eine spezifische Wirkung des Organismus herbeigeführt wird. Einen ganz analogen Vorgang beschreibt Winogradsky (3) von *Leptothrix ochracea*.

Die intensive Eisenspeicherung bei *Spirophyllum* und den anderen Eisenbakterien muß also in irgend einem Zusammenhange mit dem Leben dieser Organismen stehen, und ist nicht auf einen rein mechanischen Prozeß zurückzuführen. Welcher Art dieser Zusammenhang ist, ist jedoch nicht ohne weiteres zu ersehen. Ob die Speicherung von den Organismen herbeigeführt wird, um irgend einen Nutzen daraus zu ziehen, oder ob dieselbe nur ein sekundärer Vorgang ist, indem sie vielleicht durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte (alkalische Sekrete, Sauerstoff usw.) herbeigeführt wird, geht aus den beschriebenen Beobachtungen nicht hervor. Vor allen Dingen ist sehr fraglich, ob die Eisenspeicherung bei allen als Eisenbakterien bezeichneten Organismen dieselbe Bedeutung und dieselbe Ursache hat.

Die Oxydation des Eisenoxydulkarbonates als Energiequelle.

Die beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, daß *Spirophyllum* imstande ist, bei Oxydation von Eisenoxydulkarbonat zu Eisenoxydhydrat den zu seinem Wachstum nötigen Kohlenstoff aus anorganischer Kohlensäure zu gewinnen.

Eine chemosynthetische Assimilation von Kohlensäure[1]) ist bereits von verschiedenen zu den Bakterien gehörigen Organismen bekannt. Zunächst zeigte Winogradsky (5), daß die von ihm rein kultivierten Nitrat- und Nitritbakterien ohne organische Substanz zu wachsen vermögen. Für die Nitritbakterien zeigte er, daß sie CO_2 assimilieren, mit den Nitratbakterien führte er diese Untersuchungen nicht durch, jedoch geht aus seinen Versuchen hervor, daß auch sie wahrscheinlich ihren Kohlenstoff durch Zerlegung von Kohlensäure gewinnen können. Gegen diese Untersuchungen Winogradskys ist später der Einwand erhoben worden, daß die von ihm kultivierten Bakterien bei der langen Versuchsdauer ihren Kohlenstoff aus den organischen Kohlenstoffverbindungen der Labo-

1) Der Ausdruck Chemosynthese ist von Pfeffer (1) eingeführt und bezeichnet die Bindung anorganischen Kohlenstoffes durch Zerlegung von Kohlensäure mit Hilfe chemischer Energiequellen.

ratoriumsluft gewinnen könnten. Dieser Einwand wurde jedoch später von Godlewsky (1) wenigstens für die Nitritbakterien widerlegt. Später wies Nathansohn (1) durch einwandfreie Untersuchungen nach, daß eine von ihm rein kultivierte Bakterienart, die imstande ist, Thiosulfat zu Tetrathionsäure und Schwefelsäure zu oxydieren, ihren Kohlenstoff aus anorganischer Kohlensäure gewinnt. Im Jahre 1906 bewies Kaserer (1) die CO_2-Assimilation für Wasserstoff oxydierende Bakterien. Nach neueren Untersuchungen von Niklewski (1) besorgen die Wasserstoffoxydationen hauptsächlich zwei verschiedene Bakterienarten, die er *Hydrogenomonas vitrea* und *H. flava* nennt. Bei normalem Sauerstoffdruck sollen beide nur zusammen befähigt sein, autotroph zu leben, aber nicht jeder einzelne Organismus in Reinkultur. Nach Kaserer (2) und Söhngen (1) sollen gewisse Bakterienarten fähig sein CH_4 und CO zu oxydieren und dabei gleichzeitig diese Verbindungen als Kohlenstoffquelle zu benutzen.

Ob die Schwefelbakterien fähig sind CO_2 zu assimilieren, bedarf neuer Untersuchungen. (Vgl. Winogradsky (4) und Molisch (7).)

Es sind also bereits eine ganze Reihe von Bakterienarten bekannt, die fähig sind, sich mit Hilfe chemischer Energiequellen anorganischen Kohlenstoff nutzbar zu machen.

Eisenbakterien sind, wie bereits erwähnt wurde, hauptsächtich von Winogradsky und Molisch in bezug auf ihre Ernährungsansprüche näher untersucht worden. Beide führten ihre Untersuchungen mit *Leptothrix ochracea* aus. Winogradsky sieht die Eisenoxydation als Quelle der Lebensenergie von *Leptothrix* an, von einer CO_2-Assimilation spricht er in seiner Arbeit nicht. Molisch zeigte später mit Reinkulturen desselben Organismus, daß er ohne Zusatz von Eisen oder Mangan in organischer Nährlösung gedeihen kann. Wie bereits erwähnt wurde, bilden diese beiden Resultate durchaus keinen Widerspruch. Die Frage, ob die Oxydation von Eisenoxydul zu Eisenoxyd für *Leptothrix* und andere Arten von Eisenbakterieu von ernährungs-physiologischer Bedeutung sein kann, bedarf weiterer Untersuchungen. Die in vorliegender Arbeit angeführten Resultate gelten zunächst nur für *Spirophyllum*.

Spirophyllum ist fähig, mit anorganischer Nahrung zu gedeihen. Eine Ernährung mit organischer Substanz ist bisher nicht gelungen, wie das bereits von den Nitrit- und Nitratbakterien, den Thiosulfatbakterien und den CO-oxydierenden Bakterien bekannt ist. Wie bei den Nitrit- und Nitratbakterien und den CO-oxydierenden Bak-

terien wirkt sogar ein Zusatz von organischer Substanz hemmend auf das Wachstum ein.

Daß sich nicht alle eisenspeichernden Bakterien in dieser Weise verhalten, ergibt sich daraus, daß Molisch *Leptothrix ochracea* in organischer Nährlösung ohne Zusatz von Eisen kultiviert hat. Daß *Spirophyllum* bei anderer Versuchsanordnung event. befähigt sein könnte, mit organischer Nahrung zu gedeihen, ist trotz meiner vergeblichen Versuche nicht ausgeschlossen, Es ist bereits von den Wasserstoffbakterien mit Sicherheit bekannt, daß sie je nach den angewendeten Kulturbedingungen sowohl autotroph als heterotroph zu leben vermögen (vgl. Lebedeff (1), Niklewski (1).)

Wie sich die verschiedenen Eisenbakterien in dieser Hinsicht verhalten, muß für jede einzelne Art besonders untersucht werden. Es ist schließlich sehr wohl möglich, daß es Eisenbakterien gibt, die, trotzdem sie durch ihre Lebenstätigkeit bedeutende Mengen Eisen speichern, dennoch nicht imstande sind, CO_2 zu assimilieren.

Mit der Konstatierung der Tatsache, daß *Spirophyllum* fähig ist, CO_2 durch Chemosynthese zu assimilieren, bleibt die Frage noch offen, wie sich dieser Vorgang im einzelnen abspielt. Ebensowenig wie für die anderen autotrophen Bakterien läßt sich hierüber für *Spirophyllum* etwas Bestimmtes sagen. Es sind ja auch die Prozesse der Photosynthese der Chlorophyll-Pflanzen noch unaufgeklärt. Die hierüber bestehenden Theorien gründen sich größtenteils auf Vermutungen. Da keine bestimmten Beobachtungen vorliegen, halte ich es nicht für angebracht, über den Vorgang der chemosynthetischen Assimilation bei *Spirophyllum* Hypothesen aufzustellen.

Bei jeder bis jetzt bekannten chemosynthetischen Assimilation finden wir einen gemeinsamen Faktor: die Assimilation ist in allen Fällen mit einem Oxydationsprozeß bestimmter Stoffe verkettet. So gewinnen z. B. die Wasserstoffbakterien ihre Assimilationsenergie durch Oxydation von Wasserstoff zu Wasser, die Nitritbakterien durch Oxydation von Ammoniak zu salpetriger Säure usw. Hierbei ist zu beachten, daß nur ganz bestimmte Organismen fähig sind, bestimmte chemische Stoffe zu oxydieren. Es können z. B. die Nitritbakterien nur Ammoniak zu salpetriger Säure, nicht aber salpetrige Säure zu Salpetersäure oder Wasserstoff zu Wasser oxydieren.

Ein solcher spezifischer Oxydationsprozeß liegt auch bei *Spirophyllum ferrugineum* vor, und zwar handelt es sich um die Oxy-

dation von Eisenoxydulkarbonat zu Eisenoxydhydrat. Man kann diesen Vorgang am einfachsten durch folgende Gleichung darstellen:

$$2\ FeCO_3 + 0 + 3\ H_2O = Fe_2(OH)_6 + 2\ CO_2.$$

Es ist mir bei meinen Versuchen nicht gelungen, das Eisenoxydulkarbonat durch andere Eisenoxydulsalze zu ersetzen. Auch Mangankarbonat konnte das Eisenkarbonat nicht ersetzen, obwohl, wie bereits erörtert wurde, die Möglichkeit dieses Ersatzes vielleicht nicht ausgeschlossen ist. Die Oxydation des Eisenoxydulkarbonates zu Eisenoxydhydrat kann theoretisch sehr wohl als Energiequelle für die CO_2-Assimilation angesehen werden. Die bei der Oxydation freiwerdende Wärmemenge ergibt sich aus folgender Berechnung.

$$\left.\begin{array}{lllll} 2\ FeCO_3 & + 3\ H_2O & + O = & Fe_2(OH)_6 & + 2\ CO_2 \\ 2 \times 184 & 3 \times 69 & & 398 & 2 \times 103 \end{array}\right\} + 29 \text{ kg-Kal.},$$

d. h. pro Gramm oxydiertes Eisenoxydulkarbonat 125 g-Kal. Die Oxydation ist also mit einem beträchtlichen Energiegewinn verbunden. Im Vergleiche zu dem Energiegewinn anderer autotroph wachsender Bakterien ist derselbe aber ziemlich gering, es ist ungefähr die Hälfte der bei der Nitratbildung und $^1/_8$ der bei der Nitritbildung gewonnenen Wärmemenge (vgl. Jensen (1).)

Die bei dem Oxydationsprozeß freiwerdende Energiemenge ist natürlich nur von relativer Bedeutung für die CO_2-Assimilation der Organismen, was schon daraus hervorgeht, daß gewisse Bakterien, die Oxydationsprozesse mit großem Energiegewinn hervorrufen (wie z. B. die Bakterien der Essigsäuregärung), dennoch nicht imstande sind, CO_2 zu assimilieren.

Wie sich aus der Analyse ergibt, muß *Spirophyllum* eine recht beträchtliche Menge Eisen oxydieren, um einen Teil Kohlenstoff zu gewinnen. Das Verhältnis des oxydierten Eisens zum gewonnenen Kohlenstoff läßt sich bei der angewendeten Kulturmethode nicht sicher ermitteln, da es sehr schwierig wäre, die zugesetzte Menge $FeCO_3$ zu bestimmen. Außerdem ist sehr fraglich, ob dieses Verhältnis konstant ist, da bereits von den Wasserstoffbakterien bekannt ist, daß das Verhältnis des gebundenen Kohlenstoffes zum oxydierten Wasserstoff selbst in derselben Kultur zu verschiedenen Zeiten sehr variiert.

Aus einer Kulturreihe berechnete Winogradsky (vgl. Lafar (3),) daß die Nitritbakterien, um einen Teil Kohlenstoff zu gewinnen, 96 Teile salpetriger Säure bilden müssen. Die Menge Eisenoxyd-

hydrat, die von *Spirophyllum* bei den angewendeten Kulturbedingungen gebildet werden muß, um einen Teil Kohlenstoff zu gewinnen, ist allem Anschein nach noch weit größer. Falls *Spirophyllum* dieselbe Energiemenge aufwenden müßte, um einen Teil Kohlenstoff zu assimilieren, wie die Nitritbakterien, so würden hierbei über 750 Teile Eisenoxydhydrat im Bakterienkörper angehäuft werden. Aus oben erwähnten Gründen macht dieser Zahlenwert jedoch durchaus keinen Anspruch auf Genauigkeit.

Inwieweit bei anderen Eisenbakterien die Eisenspeicherung für die chemosynthetische Assimilation von CO_2 von Bedeutung ist, ist fraglich. Es ist nicht erwiesen, daß die Oxydation des Eisenoyydulkarbonates, auch wenn sie durch den Organismus herbeigeführt wird, diesen zur CO_2-Assimilation befähigen muß. Selbst bei *Spirophyllum* könnte event. teilweise Eisen gespeichert werden, ohne daß damit eine CO_2-Assimilation verkettet wäre. Es sind z. B. auch die Wasserstoffbakterien in organischer Nährlösung vielleicht fähig, H zu oxydieren, ohne dabei CO_2 zu assimilieren, doch bedarf dieser Vorgang weiterer Untersuchungen (vgl. Niklewski (2).) Die Eisenspeicherung könnte von den Bakterien ja auch zu anderen Zwecken herbeigeführt werden, sie könnte ihnen z. B. als Schutzmittel dienen.

Uber die Ursachen der Eisenspeicherung lassen sich ebenfalls bestimmte Angaben nicht machen. Daß die Eisenspeicherung bei *Spirophyllum* tatsächlich durch die Lebenstätigkeit des Organismus herbeigeführt wird, wurde bereits erörtert. Ob die eigentliche Oxydation von dem Organismus durch Ausscheidung von Sauerstoff herbeigeführt wird, ist damit aber noch nicht gesagt. Das Eisen könnte ebensogut als Eisenoxydulhydrat in dem Bakterienkörper niedergeschlagen werden und dieses könnte, da es außerordentlich leicht Sauerstoff aufnimmt, durch den im Wasser gelösten Luftsauerstoff oxydiert werden. Die Eisenspeicherung könnte also auch dadurch zustande kommen, daß dem Eisenoxydulkarbonat von *Spirophyllum* die CO_2 entzogen würde, oder daß z. B. alkalische Stoffwechselprodukte ausgeschieden würden, ähnlich wie das bei den erwähnten Wasserpflanzen der Fall ist, die durch Alkaliausscheidung das Calciumbikarbonat zerlegen und die freiwerdende CO_2 assimilieren.

Ob bei *Spirophyllum* diese Prozesse im Innern der eigentlichen Bakterienzelle vor sich gehen oder ob sie außerhalb derselben in der umgebenden Hülle stattfinden, läßt sich nicht ohne weiteres

entscheiden. Meiner Ansicht nach ist es nicht notwendig, daß diese Prozesse im Innern der Zelle stattfinden müssen, auch wenn sie vielleicht indirekt das Mittel zur chemosynthetischen Assimilation sind. Bei den Wasserpflanzen, die eine Kalkinkrustation aufweisen, tritt nach den Untersuchungen von Hassak (2) das gelöste Calciumkarbonat auch nicht erst in das Innere der Pflanzenzelle, um dann wieder als Monokarbonat ausgeschieden zu werden, trotzdem die Ausfällung von der Pflanze herbeigeführt wird und ihr die freiwerdende CO_2 als Nahrung dient. Versuche zur Entscheidung dieser Frage habe ich mit *Spirophyllum* nicht angestellt.

Die vorstehende Arbeit wurde im Laboratorium des Botanischen Institutes der Universität Leipzig ausgeführt. Für die vielfachen Anregungen bin ich Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Pfeffer in ganz besonderer Weise zu Danke verpflichtet. Desgleichen spreche ich den Herren Prof. Dr. Miehe und Dr. Gießler für ihre Unterstützung meinen verbindlichsten Dank aus.

Zusammenstellung der hauptsächlichsten Resultate.

Spirophyllum ferrugineum Ellis und *Gallionella ferruginea* Ehrenberg sind morphologisch wesentlich verschieden. Ob es sich um verschiedene Wachstumsformen desselben Organismus oder um verschiedene Arten handelt, geht aus den beschriebenen Untersuchungen nicht mit Sicherheit hervor.

Die in der Literatur für die Kultur anderer Eisenbakterien angegebenen Methoden ergaben mit *Spirophyllum* kein Resultat.

Die Herstellung von Reinkulturen von *Spirophyllum* gelang durch fortgesetztes Überimpfen in eine Nährlösung, die außer anorganischen Salzen kohlensaures Eisenoxydul, aber keine organischen Nährstoffe enthielt.

Das Licht hat auf das Wachstum von *Spirophyllum* und wahrscheinlich auch auf das Wachstum anderer Eisenbakterien keinen Einfluß.

Die Temperatur ist für das Wachstum der Eisenbakterien von wesentlicher Bedeutung. *Spirophyllum* ist im Gegensatz zu anderen Eisenbakterien ausgesprochen kälteliebend.

Ohne Eisenzusatz war ein Wachstum von *Spirophyllum* nicht zu erzielen.

Andere Metalle konnten das Eisen nicht vertreten.

Bei Zusatz einer Lösung von Eisenoxydulkarbonat gedieh *Spirophyllum* vorzüglich.

Andere Eisenoxyd- und Oxydulsalze konnten das Eisenoxydulkarbonat nicht ersetzen.

Spirophyllum ferrugineum ist aërob.

Der Einfluß der freien Kohlensäure ist direkt nicht nachzuweisen, da bei Abwesenheit von CO_2 in den beschriebenen Kulturen die Bildung von Eisenoxydulkarbonat ausgeschlossen ist.

Spirophyllum gedeiht bei vollkommenem Ausschluß organischer Substanz.

Bei Zusatz von organischer Substanz wird das Wachstum von *Spirophyllum* stark gehemmt resp. ganz aufgehoben.

Die quantitative Kohlenstoffbestimmung aus dem Ertrag einer Kultur bestätigt den Gewinn organischer Substanz aus Kohlensäure. Die relativ geringe Menge des gefundenen Kohlenstoffes erklärt sich aus dem hohen Wasser- und Eisenoxydhydrat-Gehalt der lebenden *Spirophyllum*-Fäden.

Die Eisenspeicherung ist bei *Spirophyllum* auf die Lebenstätigkeit des Organismus zurückzuführen.

Die Oxydation des Eisenoxydulkarbonates zu Eisenoxydhydrat muß als Energiequelle für die chemosynthetische Assimilation von CO_2 angesehen werden.

Literatur-Verzeichnis.

Adler (1), Centralbl. f. Bakteriol., II. Abt., 1904, Bd. XI, S. 277.
Büsgen (1), Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1894, Bd. XII, S. 147.
Cohn (1), Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Heft 3, S. 186 u. 202.
Ehrenberg (1), Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Leipzig 1838.
Ellis (1), Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Vol. XXVIII, part. I (No. 6), 1897, p. 21. — Vgl. auch Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1907, Bd. XIX, S. 505.
— (2), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1907, Bd. XIX, S. 505.
— (3), A. a. O., S. 502.
— (4), A. a. O., S. 511.
— (5), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1910, Bd. XXVI, S. 321.
Godlewsky (1), Anzeiger d. Akad. d. Wissensch. in Krakau, 1892, S. 408.
Hassak (1), Unters. aus d. Botan. Inst. zu Tübingen, S. 473.
— (2), A. a. O., S. 476.
Jackson (1), Hygien. Rundschau, 1904, S. 19.
Jensen (1), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXII, S. 312.
Kaserer (1), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1906, Bd. XVI, S. 681.
— (2), A. a. O., S. 769.

Lafar (1), Techn. Mykologie, II. Aufl., Jena 1904—1906, Bd. III, S. 194.
— (2), A. a. O., S. 193.
— (3), A. a. O., S. 164.
Lebedeff (1), Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. XXVII, S. 598.
Migula (1), Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1897, Bd. XV, S. 321.
Molisch (1), Die Eisenbakterien. Jena 1910.
— (2), A. a. O., S. 25.
— (5), A. a. O., S. 41.
— (3), Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892.
— (4), A. a. O., S. 60.
— (6), A. a. O., S. 71.
— (7), Die Purpurbakterien. Jena 1907, S. 64.
Nathansohn (1), Mitteil. a. d. Zool. Station zu Neapel, 1902, Bd. XV, Heft 4.
Niklewski (1), Jahrb. f. wiss. Bot., 1910, Bd. XLVIII, S. 113.
— (2) A. a. O., S. 136.
Pfeffer (1), Pflanzenphysiologie, II. Aufl., S. 346.
Rößler (1), Archiv der Pharmazie, 1895, Bd. 233, S. 189.
Schorler (1), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1904, Bd. XII, S. 681.
— (2), A. a. O., S. 692.
— (3), A. a. O., S. 691.
Söhngen (1), Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1906, Bd. XV, S. 513.
Winogradsky (1), Botan. Zeitung, 1888, Bd. 46, S. 261.
— (2), A. a. O., S. 267.
— (3), A. a. O., S. 266.
— (4), Botan. Zeitung, 1887, Bd. 45, S. 489.
— (5), Annales de l'Inst. Pasteur, 1890, Bd. IV, p. 213 und 1891, Bd. V, S. 517.
Zopf (1), Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über *Crenothrix polyspora*, die Ursache der Berliner Wasserkalamität. Berlin 1879.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik

Jahr/Year: 1911

Band/Volume: 49

Autor(en)/Author(s): Lieske Rudolf

Artikel/Article: Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Spirophyllum ferrugineum Ellis, einem typischen Eisenbakterium. 91-127