

Züchtungsversuche einiger in Schlamm lebenden Bakterien auf selenhaltigem Nährboden.

Von

Widar Brenner.

Die Arbeiten von Nathansohn¹⁾ und Beijerinck²⁾ haben die Aufmerksamkeit auf eine Gruppe von Bakterien gelenkt, die gewisse Schwefelverbindungen oxydieren können und dadurch ihre Energie zum Stoffaufbau und Leben gewinnen. Im Gegensatz zu den echten Schwefelbakterien: *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Chromatium* u. a., lassen sich diese sog. Thionsäurebakterien leicht auf Agarplatten züchten und in Reinkultur gewinnen. Wenn man die Analogien zwischen dem Schwefel und den Elementen Selen und Tellur derselben natürlichen Gruppe in Betracht zieht, könnte es von Interesse sein, das Verhalten solcher in Schlamm lebenden Bakterien gegen Selen- und Tellurverbindungen zu erforschen. Am nächsten lag daran zu denken, daß Natriumthiosulfat oder Natriumsulfid, die bekanntlich durch die „Thionsäurebakterien“ oxydiert werden, z. B. durch Natriumselenid zu ersetzen wären. Dieser Gedanke war der Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung. Das Ergebnis in bezug auf diesen Punkt fiel zwar negativ aus, doch kamen bei den Versuchen Tatsachen zum Vorschein, die einer näheren Aufklärung wert schienen. Es handelt sich vor allem um eine Art Bakterien, die eine eigentümliche Abhängigkeit von der Anwesenheit gewisser Selenverbindungen im Nährsubstrate zeigten.

1) Mitteilungen a. d. zoologischen Station zu Neapel, Bd. 15 (1902), S. 655.

2) Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 11 (1904), S. 593.

Im folgenden empfiehlt es sich, erst die Darstellung der Selenpräparate zu beschreiben. Dann sollen die Kulturversuche mit den „Thionsäurebakterien“ kurz Erwähnung finden. Den Hauptinhalt dieser Untersuchung bilden aber Studien über die eben genannte Bakterienart, deren Züchtung, Verhalten zu verschiedenen Selenverbindungen und Ansprüche auf Kohlenstoffnahrung in besonderen Kapiteln behandelt werden. Ferner soll über Versuche zum Ersatz der Selenverbindungen durch andere Stoffe berichtet werden.

I. Die Darstellung der Natriumselenidpräparate.

Da das Natriumselenid wegen seiner geringen Haltbarkeit nicht im Handel zu haben ist, mußte es besonders dargestellt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden versucht.

A. Durch Reduzieren von Natriumselenit mit Wasserstoff.

Etwa 0,5 g kristallisiertes Natriumselenit ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 + 5 \text{ aq.}$, Präparat von A. Merck) wird in ein Porzellanschiffchen von der Art, die bei Elementaranalysen verwendet wird, gebracht und in einem kurzen Verbrennungsrohre aus Kaliglas in einem lebhaften Wasserstoffstrome erhitzt. Die Gase, die das Rohr passiert haben, münden unter Wasser aus. Das Verbrennungsrohr ist an beiden Enden durch Anbringen von Klemmschrauben verschließbar zu machen. Die Erhitzung, die nach sorgfältigem Austreiben der Luft aus dem Apparate beginnen kann, wird mit einem Buusenbrenner erst vorsichtig bis zur völligen Abgabe des Kristallwassers, dann bis zum Schmelzen des Salzes gebracht. Die Reduktion tritt kurz vor dem Schmelzen ein und zeigt sich in dem allmählichen Braunschwarzwerden des Salzes und der lebhaften Absorption des Wasserstoffs. Wenn der Inhalt des Schiffchens geschmolzen und der Wasserstoff wieder in demselben Tempo durch den Apparat strömt wie vor der Reaktion, wird die Erhitzung unterbrochen. Das Ganze läßt man bei fortdauerndem Wasserstoffstrome abkühlen, worauf das Rohr durch die Klemmschrauben geschlossen wird. Das Reaktionsprodukt ist eine schwarzbraune Schmelze, die außer Natriumselenid (Na_2Se) immer etwas Polyselenide, Selen, beträchtliche Mengen unverändertes Natriumselenit und freies Alkali enthält. Es wird in 10 ccm destilliertem Wasser gelöst und die von kolloidem Selen tiefrote Lösung sofort zum Gießen von Agar-

platten benutzt. Das trockene Reaktionsprodukt kann nur im geschlossenen Rohre in Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt werden, die Lösung dagegen ist nicht haltbar. Infolge von Reaktionen, die sich zwischen den verschiedenen Verbindungen (z. B. zwischen Na_2SeO_3 und Na_2Se) vollziehen, und durch Einwirken der Luft wird die Lösung bald trübe; rotes Selen scheidet sich mehr und mehr aus, bis unter Umständen schon nach wenigen Stunden alles Selen als Bodensatz zu finden ist. Dieser erhebliche Übelstand konnte nicht beseitigt werden. Zwar ist die Geschwindigkeit, mit der das Selen gefällt wird, von der Vollständigkeit der Reduktion abhängig; doch konnte es nie verhindert werden, daß genügende Mengen Selenit zurückblieben, um die lästigen Fällungsreaktionen zu begünstigen. (Wie später zu ersehen ist, spielen bei den Züchtungen eben diese Selenitreste eine überaus wichtige Rolle.) Bei der Fällung des kolloiden Selens dürften noch die Salze, die durch das Alkali bei der hohen Temperatur aus dem Porzellanschiffchen herausgelöst werden, eine nicht unbedeutende Rolle spielen¹⁾. — Verfährt man mit genügender Schnelligkeit, so können trotz aller Schwierigkeiten Agarplatten gegossen werden, die Natriumselenid dauernd enthalten. Im starren Agar nimmt nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit so erheblich ab, daß sie praktisch nicht mehr in Betracht kommt. Die rote Lösung des Reaktionsproduktes in 10 ccm Wasser, die bei den Versuchen verwendet wurde, enthielt, wenn man annimmt, daß die Hälfte des Selens in Form von Selenid zugegen war (genaue Analysen sind bei der Labilität der Lösung ausgeschlossen), etwa 1,2 % Na_2Se . Das, wie oben beschrieben, durch Reduktion von Natriumselenit gewonnene Na_2Se -Präparat wird im folgenden als Se I bezeichnet.

B. Durch Neutralisieren von Natriumhydroxyd mit Selenwasserstoff.

Etwa 1 g rotes, amorphes Selen wurde in einem aus Kaliglas bestehenden Kugelrohre, das außen mit Asbest bekleidet war, auf 400—500° in lebhaftem Wasserstoffstrom erhitzt. Die Gase, die etwa zur Hälfte aus Selenwasserstoff bestehen, passierten ein U-förmig

1) Auch wurden Versuche mit anderen Na_2SeO_3 -Präparaten, z. B. einem von Kahlbaum stammenden, sehr karbonathaltigen Präparat gemacht, sie gaben aber alle bei der Reduktion schlechtere Ergebnisse, als das ziemlich reine Mercksche.

gebogenes sog. Chlorcalciumrohr, wo sich soviel einer 25proz. Natronlauge befand, daß die Gase eben keinen freien Durchlauf mehr hatten, sondern durch die Flüssigkeit strömen mußten¹⁾. Hierbei wird der größte Teil des Selenwasserstoffs unter Bildung von Natriumselenid absorbiert. Die abgehenden Gase enthalten doch immer noch soviel H_2Se , daß sie entweder ins Freie oder zur Zerstörung des genannten, äußerst giftigen Bestandteiles in eine Chromsäurelösung geleitet werden müssen. In der Natronlauge scheiden sich beim Absorbieren allmählich weiße, aus nadelförmigen Kristallen bestehende Flocken ($Na_2Se + n^2$) aq.) aus. Eine auftretende Krustenbildung auf der Oberfläche der Flüssigkeit muß durch Schütteln beseitigt werden. Die Reaktion ist beendet, wenn die Menge des ausgeschiedenen Produktes das Durchströmen der Gase hindert. Man schaltet das U-Rohr ab, läßt das Selenid zu Boden sinken und gießt dann vorsichtig, aber möglichst schnell die überflüssige Natronlauge durch Öffnen des einen Schenkels ab. Sie wird sofort durch einige Kubikzentimeter dest. Wassers ersetzt und das Rohr wieder verschlossen. Die Wassermenge ist am vorteilhaftesten so klein zu wählen, daß sie zur Auflösung des ganzen Bodensatzes nicht genügt. Auf diese Weise erhält man eine immer gleich konzentrierte, gesättigte Lösung möglichst reinen Natriumselenids. Sie ist farblos oder schwach rötlich und kann besonders unter Lichtausschluß lange aufbewahrt werden. Beim Öffnen des Rohres kommt die Oberfläche der Lösung immer in Berührung mit dem Sauerstoff der Luft; dabei bildet sich eine Haut von Selen, die die tieferen Schichten gegen Oxydation zu schützen scheint. Die gesättigte Lösung, die im folgenden als Se II bezeichnet wird, enthält bei Zimmertemperatur, wie Analysen³⁾ ergaben, rund 2 % Na_2Se .

1) Eine reichlichere Fällung würde wohl die Absorption fördern, verursacht aber durch eine bald auftretende und schwer zerstörbare Kruste das frühzeitige Aufhören der Reaktion.

2) Wahrscheinlich handelt es sich um das Salz $Na_2Se + 16$ aq., das von C. Fabre (Annales de chimie et de physique, T. 10, Sér. 6 [1887], p. 500) charakterisiert wird.

3) Die Analysen wurden hauptsächlich nach den Vorschriften in Treadwells Quantitative Analyse gemacht. 10 ccm der bei Zimmertemperatur gesättigten Na_2Se -Lösung wurden unter Umrühren in siedendes Königswasser langsam getropft. Die Oxydation des Na_2Se zu Se und H_2SeO_3 geht sehr schnell; H_2Se -Geruch war nicht wahrnehmbar. Durch wiederholtes Abdampfen mit konz. Salzsäure wurde die Salpetersäure zerstört und vertrieben. Aus der farblosen, salzsauren Lösung wurde das Selen bei $100^\circ C$ mit einer konz. Na_2SO_3 -Lösung gefällt, einige Stunden warm stehen gelassen

II. Züchtungsversuche mit Thionsäurebakterien auf selenhaltigem Nährboden.

Meine „Thionsäurebakterien“, die zu folgenden Versuchen benutzt wurden, stammten aus einigen stark nach Schwefelwasserstoff riechenden, marinen Bodenschlammproben, die ich durch Vermittlung des Leipziger Botanischen Institutes von Herrn Prof. Schröder in Kiel erhielt, für dessen Liebenswürdigkeit ich hier meinen besten Dank ausdrücken möchte¹⁾. Die Nathansohnsche Lösung gab, mit diesem Schlamm geimpft, bei 27° C schon nach 1—2 Tagen eine kräftige, weiße Haut aus Schwefelkörnchen und Bakterien. Von diesen Rohkulturen wurden Platten aus 1,5 % Agar gegossen, der mit Wasser, sehr verdünnter Salzsäure und nochmals mit dest. Wasser 3 Tage ausgelaugt worden war, und so aus der Bakterienhaut eine Art isoliert, deren Kolonien starke Schwefelausscheidung zeigten. In einigen Agarplatten wurde das Thiosulfat der Nathansohnschen Lösung durch die beiden Natriumselenid-Präparate in verschiedenen Konzentrationen (etwa 0,01; 0,005; 0,001 %) ersetzt. Die Zugabe der unbeständigen Präparate erfolgte selbstverständlich nach dem Sterilisieren, beim Gießen der Platten. Sie wurden mit der „Thionsäurebakterie“ beimpft, die Schalen unter eine geräumige Glasglocke bei 25° C offen hingestellt; zur Versorgung mit genügendem Kohlendioxyd wurde ein Luftstrom durchgesogen. In keiner der Na₂Se-haltigen Kulturen konnte ein Wachstum erzielt werden. Dasselbe negative Ergebnis ergab ein Versuch mit einer Schwefel-

und wieder geprüft, ob eine neue Portion Na₂SO₃ eine Fällung hervorrufe. War dies nicht mehr der Fall, wurde das Selen, das bereits in der Wärme in die schwarze Modifikation übergegangen war, auf einem tarierten Filter gesammelt, gewaschen, bei 100° C getrocknet und gewogen. Auffallend ist der geringe Löslichkeitsgrad des Natriumselenids, wenn man ihn mit demselben des Sulfids vergleicht. Genaue Angaben darüber habe ich in der chemischen Literatur nicht gefunden, außer der von Uelsmann (Liebig's Annalen, Bd. 116, S. 127), der die Verbindung kurz als sehr schwerlöslich bezeichnet.

1) Es gelang mir nicht, die fraglichen Bakterien aus den Bassins des Leipziger Botanischen Gartens und geeigneten Standorten der Umgebung zu bekommen, obwohl Lieske (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 30 [1912], S. [12]) einige Jahre zuvor mehrere zu den „Thionsäurebakterien“ gehörende Arten aus denselben Standorten isoliert hatte. Bei meinen Bemühungen in dieser Richtung benutzte ich sowohl Nathansohns Thiosulfat-Mineralisalzlösung, als auch die von Beijerinck (a. a. O.) für seinen *Thiobacillus thio-parus* empfohlene Nährlösung. Woran das Ausbleiben der Bakterien bei meinen Versuchen lag, vermag ich nicht zu sagen. Vielleicht spielte dabei die Jahreszeit eine Rolle.

wasserstoff-Bakterie, welche Herr Prof. Dr. Beijerinck die Liebeshwürdigkeit hatte mir in Reinkultur zu senden. Es scheint also demnach, als ob der Schwefel, der ja auch als H_2S oder Na_2S den Thionsäurebakterien eine gute Nahrung darbietet, nicht durch Selen ersetzt werden kann. Dies Ergebnis steht in Widerspruch zu der Angabe Gehrings¹⁾, es sei nachgewiesen, daß Schwefelbakterien Salze von Selen und Tellur als Energiequelle verwenden könnten. Worauf er diese Angabe stützt, ist mir nicht bekannt. Ihre Gültigkeit für die von mir untersuchte Art muß ich auf Grund meiner Versuche in Abrede stellen.

III. Eine neue Bakterienart und ihre Züchtung.

Nach einigen Versuchen, die Dr. H. Weyland früher im Leipziger Botanischen Institut mit Bodenschlamm aus dem Hafen zu Kiel gemacht hatte, und deren Ergebnisse er mir freundlichst mitteilt, hat er durch Beimpfung Na_2Se -haltiger Agarplatten rote Kolonien einer Bakterienart bekommen, die allerdings schon mit den in der Luft befindlichen C-Verbindungen auskommen konnte, durch Zugabe von ein wenig Alkoholdampf aber günstig beeinflusst wurde. Ich wiederholte seine Versuche, erhielt aber bei reichlicher Impfung von Platten, die aus ausgelaugtem Agar gegossen waren und etwa 2—4 Tropfen $Se I^2$, d. i. rund 0,01—0,005 % Natriumselenid, enthielten, ohne besondere C-Quelle kein Wachstum, obwohl die Schalen offen standen und für genügend Kohlendioxyd durch Durchsaugen von Luft gesorgt war. Waren dagegen Spuren von Alkoholdampf in der Luft vorhanden, so sah man nach einigen Tagen ein Bakteriumwachstum beginnen, das eine lebhaftere Rotfärbung der beimpften Stellen herbeiführte. Nach wiederholtem Plattengießen (die Petrischalen wurden jetzt auch geschlossen gehalten) gelang es mit ziemlich hohem Selengehalt (etwa 0,01 bis 0,05 % $Se I$) und wenig Alkoholdampf in der Luft (0,5 % Alkohol in 50 ccm Wasser gelöst in offenem Schälchen unter einer Glasglocke von 5,5 l Rauminhalt) zwei Bakterienarten zu isolieren. Wir benennen die Arten A und B. Von diesen beiden wird uns vor allem A im folgenden interessieren.

1) Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 42 (1914), S. 416.

2) Siehe S. 97.

Zur Züchtung dieser Bakterie wurde folgende Mineralsalzlösung verwendet: 0,25% NH_4Cl , 0,12% K_2HSO_4 , 0,06% MgSO_4 in destilliertem Wasser. Die geringe Haltbarkeit der Na_2Se -haltigen Lösungen schloß Flüssigkeitskulturen aus. Agar- und zwar Plattenkulturen in kleinen Petrischalen schienen am geeignetesten zu sein, da die Schalen am besten die Aufnahme von Nahrung aus der Luft, z. B. Alkoholdampf, gestatten. Der Mineralsalzlösung wurden also 1,5% Agar zugefügt, der, wenn Versuche über die Kohlenstoffnahrung in Frage kamen, zuvor gut ausgelaugt worden war. Erst nach dem Sterilisieren, beim Gießen der Platten, auf die etwa 10 ccm kamen, wurde die Na_2Se -haltige Lösung tropfenweise, gewöhnlich 3 Tropfen von Se I oder 2 von Se II zugegeben. Se I war vorher immer frisch hergestellt worden. Sowohl das Plattengießen, als die Impfung wurden wegen der Infektionsgefahr hauptsächlich im Dampfkasten vorgenommen. Die Kulturen wurden bei etwa 27°C unter Glocken hingestellt, wobei dafür gesorgt war, daß eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre das Eintrocknen der Platten verhinderte.

Das Wachstum der Bakterien (hier handelt es sich, wie stets im folgenden, um die Art A) erfolgte recht langsam. Selbst unter den günstigsten Bedingungen, die ich gefunden habe, bei Anwendung des Präparats Se I und Alkoholdampf in der Luft, muß man auf Strichkulturen 5—6 Tage warten. Liegen Kulturen mit in dem Nährsubstrate zerstreuten, einzelnen Individuen vor, so sind oft erst nach 10 Tagen die ersten Kolonien zu bemerken. Ob die Temperatur 27°C oder die gewöhnliche Zimmertemperatur war, schien dabei keinen großen Einfluß zu haben. Dies außerordentlich langsame Wachsen ist bei der Züchtung ein erheblicher Übelstand, teils weil das Arbeiten dadurch sehr langwierig wird, teils weil viele Bakterien, die als Verunreinigungen auftreten, einen erheblichen Vorsprung erhalten, ehe die geimpften Bakterien überhaupt zum Vorschein gelangten, und sie oft ganz an der Entwicklung verhindern.

Die auf selenhaltigem Agar gebildeten Kolonien waren schön rot gefärbt, besaßen eine gallertartige Konsistenz und traten, wenn sie oberflächlich wuchsen, ein wenig über den Nährboden hervor. Ihr Ausbreitungsvermögen war sehr gering. Die Einzelkolonien wurden kaum größer als 1 mm im Durchmesser; auch die Striche blieben immer relativ schmal. Nur dadurch, daß man bakterien-

haltige Wassertropfen auf die Platten verbreitete, bekam man größere, blutrote Vegetationsflächen.

Die mikroskopische Untersuchung mit 2 mm Apochromat und $\frac{1}{12}$ Zoll Öl-Immersion ließ wenig bemerkenswerte Eigenschaften der Organismen erkennen. Im Gallerte eingebettet sah man eine Unmenge äußerst kleiner Bakterien, die eigentlich nur dank ihrer Einschlüsse von Selenkörnchen hervortraten. Beim Zerdrücken der Gallerte gelangten viele Individuen in Freiheit und waren so leichter zu studieren. Sie gehören zu den kleinsten bekannten Organismen und sind ihrer meist kugelfunden Form wegen als Mikrokokken anzusprechen. Die Dimensionen halten sich immer unter $0,5 \mu$, einer Größe, bei der genaue Messungen schon aus optischen Gründen illusorisch werden. Ob die Bakterien selbständig beweglich sind, habe ich nicht sicher feststellen können, da bei der in Frage kommenden Größe die Brownsche Molekularbewegung schon beträchtlich ist. Mit Karbolfuchsin oder noch besser mit Methyleneblau läßt sich eine Färbung durchführen. Man sieht, wie die Selenkörnchen die Zellen mehr oder weniger erfüllen. Bisweilen bleiben die Bakterien auch paarweise zusammenhängend. Geißelfärbungsversuche ergaben keine Resultate. Auch sonst lassen die winzigen Organismen keine Einzelheiten im Bau der Zellen hervortreten.

Die Einbettung in Gallerte erschwert das Reinkultivieren. Ich habe eine geraume Zeit damit verbracht, um unser Bakterium aus einer durch *Bacterium coli* verunreinigten Kultur rein zu gewinnen. Durch Verwendung von sehr wenig Alkoholdampf als Kohlenstoffquelle und niedrigere Temperatur (etwa 20° C) führten meine Bemühungen schließlich zum Ziel.

IV. Versuche mit verschiedenen Selenverbindungen.

Für die Isolierung der fraglichen Bakterienart wurde, wie schon berichtet, das Präparat Se I, das außer Natriumselenid noch un-reduziertes Natriumselenit, Polyselenide und Selen enthält, verwendet. Das Wachstum war, wenn Äthylalkoholdampf in der Luft als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand und wenn etwa 2–4 Tropfen des Präparates zugefügt worden waren, das üppigste, was ich überhaupt beobachtet habe. Die Kolonien waren, wie im vorigen Kapitel schon beschrieben wurde, blutrot, die Zellen meist von Selen ge-

füllt. Als die Kulturglocken geöffnet wurden, machte sich ein starker, übler Geruch¹⁾ bemerkbar, der sicher nicht von Selenwasserstoff herrühren konnte. Parallelkulturen ohne Se I blieben steril.

Nachdem es so gelungen war, unser Bakterium mit dem Selenidpräparate Se I unter gleichzeitiger Anwesenheit von Alkoholdampf in der Luft zu züchten, galt es zu untersuchen, ob wirklich das Natriumselenid oder vielleicht eine andere im Präparate enthaltene Selenverbindung als Wachstumserreger in Frage kam. Zunächst wurden Kulturen mit dem Präparate Se II, Natriumselenid in möglichst reiner Form, gemacht. Dabei kamen Konzentrationen von etwa 0,01; 0,005 und 0,001 % Na_2Se zur Verwendung. Als Kohlenstoffquelle diente, wie früher, Alkoholdampf in der Luft²⁾. In keiner der Kulturen konnte, nicht einmal nach einem Monat, ein Wachstum beobachtet werden. In ein paar Schalen waren Schimmelpilze als Verunreinigung eingedrungen und wuchsen gut. Die angewandten Konzentrationen Selenid waren also wenigstens für diese Organismen nicht zu hoch. Das Ausbleiben des Bakterienwachstums beweist, daß im Präparate Se I dem Selenid nicht die wichtigste Rolle zukommen kann.

Wie man sich erinnert, enthielt das Präparat Se I (vgl. S. 97) außer Natriumselenid noch beträchtliche Mengen unreduziertes Natriumselenit. Es lag also am nächsten, diese Verbindung auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. In diesen Versuchen waren 0,1 bis 0,05 % kristallisiertes Natriumselenit anwesend³⁾. Durch 1–2 Tropfen 1proz. Natronlauge wurde für eine schwach alkalische Reaktion im Nährsubstrate gesorgt. Als Kohlenstoffquelle diente wieder Äthylalkoholdampf. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich die Bakterien, doch ließ das Wachstum immer gegen das mit Se I bedeutend nach. In den Bakterienzellen waren immer kleinere oder größere Mengen Selen ausgeschieden, die die Kolonien hell-

1) Nach Untersuchungen von Maaßen (Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 18 (1901), S. 475) rührt der üble, charakteristische Geruch, der sehr häufig beim Züchten von Bakterien und Pilzen auf selenhaltigem Nährboden auftritt, von gebildetem Äthylselenid her.

2) 50 ccm 2proz. Alkohollösung standen unter jeder Glocke von 5,5 l Rauminhalt.

3) Nach Chabrie et Lapique (Compt. rend., T. 110 (1890), p. 152) verhindert die selenige Säure, als Selenit geboten, in einer Konzentration von 2 pro mille das Wachstum von Hefen und Bakterien noch nicht.

bis siegellackrot färbten. Der üble Geruch nach der organischen Selenverbindung, der bei den Kulturen mit Se I so sehr auffiel, war hier nicht zu bemerken.

Da die Beständigkeit des Natriumselenits Flüssigkeitskulturen gestattet, wurden auch solche angestellt. Das Ergebnis war das gleiche wie bei den Plattenkulturen. Es setzten sich hellrote, ein wenig gallertartige Flocken auf dem Boden des Reagensrohres ab. Bei diesen Versuchen war der Alkohol in einer Konzentration von 0,1 % der Nährlösung nach der Sterilisation zugefügt worden.

Das Selenit kann also für sich das Wachstum der Bakterien ermöglichen, aber zusammen mit den anderen im Präparate Se I enthaltenen Verbindungen war der Effekt größer. Von Interesse war es deshalb zu sehen, ob ein Zusatz vom Präparate Se II, das reines Natriumselenid enthielt, zu dem Selenite günstige Wachstumsbedingungen schaffen könnte. Dies war in der Tat der Fall. Durch Zufügen von gleichen Mengen Natriumselenit zu den früher verwendeten Konzentrationen Se II wurde ein gutes Wachstum erzielt¹⁾ und damit die Erkenntnis gewonnen, daß das üppige Gedeihen auf Se I durch die gleichzeitige Anwesenheit von Selenit und Selenid veranlaßt war²⁾.

Im Anschluß an die Kulturen mit Natriumselenit wurden noch Versuche mit Natriumselenat gemacht. Die Platten enthielten 0,05 % Na_2SeO_4 und waren durch Hinzufügen von 1—2 Tropfen 1proz. Natronlauge alkalisch gemacht. Als Kohlenstoffquelle diente wieder Äthylalkohol in Dampfform. In den Strichkulturen war zunächst kein Wachstum zu sehen. Nach 2 Monaten waren deutliche Spuren vorhanden. Die Bakterien hatten Selen in sehr geringem Maße in sich abgeschieden.

Bei allen diesen Kulturen wurden Vergleichsversuche ohne Zugabe von Selenverbindungen gemacht. Sie zeigten immer kein Wachstum.

Als Zusammenfassung der obigen Versuche mag folgende Tabelle dienen:

1) Diese Erfahrung wurde erst später gemacht, sonst wäre vielleicht unter diesen Umständen eine Mischung von gleichen Teilen Se II und entsprechend konzentrierter Na_2SeO_3 -Lösung, die sich besser hält als das Präparat Se I, diesem bei der Isolierung der Bakterien vorzuziehen gewesen.

2) Da also durch ein Gemisch von Selenid und Selenit in reinem Zustande derselbe Effekt wie mit Se I erzielt wird, liegt kein Grund vor, den übrigen in diesem Präparate befindlichen Stoffen (Se, Polyselenide) eine besondere Rolle zuzuschreiben.

Tabelle I¹⁾.

Wirksamkeit verschiedener Se-Verbindungen.

C-Quelle: Alkoholdampf. — Versuchstemperatur: 27° C.

Zusatz von:	Wachstum:
Se I (Na ₂ Se, Na ₂ SeO ₃ usw.):	+ + + +
Se II (Na ₂ Se):	0
Na ₂ SeO ₃ :	+ +
Se II (Na ₂ Se) + Na ₂ SeO ₃ :	+ + + +
Na ₂ SeO ₄ :	Spuren nach längerer Zeit.
Ohne Zusatz einer Selenverbindung:	0

V. Versuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen²⁾.

Auf S. 100 wurde schon gezeigt, daß unser Bakterium nicht ohne eine besonders zugegebene Kohlenstoffquelle zu wachsen vermag. Das Kohlendioxyd und die gewöhnlichen kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen der Luft können also nicht ausgenutzt werden. Daß das Kohlendioxyd auch sonst keine Rolle spielt, wurde durch folgenden Versuch erwiesen. Das genannte Gas wurde ausgeschlossen, indem man den Luftstrom, der durch die gut schließende Kulturglocke geleitet wurde, in üblicher Weise erst durch U-Röhren mit Kalilauge-getränkten Bimssteinstückchen passieren ließ. Unter der Glocke, neben den mit Se I versetzten Kulturen stand ein Gefäß mit Kalilauge und eines mit 2% Äthylalkohol in Wasser gelöst. Das Wachstum der Bakterien war das übliche.

Aus den Versuchen des vorigen Abschnittes ist der Äthylalkohol in Anwesenheit von Se I schon als eine gute Kohlenstoffquelle bekannt. In der Absicht, den Einfluß verschiedener Konzentrationen dieses Nährstoffes zu studieren, wurden folgende Versuchsserien durchgeführt. Unter mehrere Glocken von 5,5 l Rauminhalt wurden neben den Kulturen mit Se I Schalen mit

1) In den Tabellen bedeuten: + + + + = gutes bis sehr gutes Wachstum, + + + = gutes bis ziemlich gutes, + + = ziemlich gutes bis mittelmäßiges, + = schlechtes und 0 = kein Wachstum.

2) Zu allen Experimenten, bei denen es sich um die Kohlenstoffquelle handelte, wurde Agar verwendet, der mit Wasser, dann mit verdünnter Salzsäure und schließlich mit strömendem Wasser 3 Tage ausgelaugt worden war.

50 ccm Flüssigkeit hingestellt, die 10, 2 und 0,1 % Alkohol in Wasser enthielten.

10 % Äthylalkohol (entsprechend einer Gleichgewichtskonzentration von ca. 11 mg pro Liter Luft) ergab kein Wachstum.

2 % Äthylalkohol (entsprechend einer Konzentration von ca. 2,2 mg pro Liter Luft) gab ein gutes Wachstum.

0,1 % Äthylalkohol (entsprechend einer Konzentration von ca. 0,11 mg pro Liter Luft) gab noch eine ziemlich gute, doch etwas langsamer verlaufende Entwicklung.

Ohne besonders zugegebene Kohlenstoffnahrung blieb, wie schon mehrfach berichtet wurde und hier nochmals hervorgehoben sei, im allgemeinen das Wachstum aus¹⁾.

Außer dem Äthylalkohol schien es wünschenswert, noch andere organische Stoffe zu prüfen, vor allem solche, die als Nahrung für Bakterien eine vielfache Verwendung gefunden haben, z. B. Dextrose, Asparagin, Pepton, Fleischextrakt. Unter Zusatz von Se I wurden folgende Versuche angestellt:

Asparagin, 1 %, gab ein ziemlich gutes Wachstum, doch merkbar schlechter als das mit Äthylalkohol.

Dextrose, 1 %, gab ein schlechtes Wachstum.

Pepton, 1 %, gab kein Wachstum.

Fleischextrakt (Liebig), ungefähr 1 % (mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht), gab kein Wachstum.

Erbsendekokt, ein paar Tropfen, gab kein Wachstum.

Durch diese Ergebnisse tritt ein ziemlich eigentümliches Verhalten in bezug auf die Kohlenstoffquelle zutage. Besonders Pepton und Fleischextrakt, die meist gute Bakteriennahrung darbieten, werden hier gänzlich verschmäht.

Mit Asparagin, das sich in Gegenwart von Se I als eine ziemlich gute, wenn auch nicht dem Äthylalkohol ebenbürtige Kohlenstoffquelle gezeigt hatte, wurde noch eine Reihe Kulturen unter Benutzung verschiedener Konzentrationen des Nährstoffes angesetzt:

Asparagin, bis zur Sättigung (etwa 7 %), den Agarplatten

1) In einem einzigen Falle schien es zunächst so, als ob ohne besondere C-Quelle einige Kolonien zu unbedeutender Entwicklung kamen, doch stellte sich heraus, daß vorher in dem Raume, in dem die Kulturglocken standen, mit Alkohol gearbeitet worden war.

zugegeben, gab nur kümmerliche Spuren von Bakterienwachstum.

2 % Asparagin gab eine ziemlich gute Entwicklung von hellroten Kolonien, die aber recht klein blieben.

0,5 % Asparagin ließ noch Kolonien, wenn auch langsamer, zustande kommen.

0,05 % Asparagin veranlaßte kein Wachstum mehr.

War kein Asparagin zugegeben, entstand ebensowenig Wachstum; auch blieben Kulturen mit Asparagin, aber ohne Se I, steril.

Da es sich also herausgestellt hatte, daß keine der sonst üblichen Kohlenstoffquellen den Nähreffekt des Äthylalkohols für die fraglichen Bakterien erreichen konnte, schien es angebracht, im Vergleich mit diesem einige andere, niedere Alkohole zu prüfen. Das Präparat Se I wurde auch bei diesen Versuchen in üblichen Mengen zugegeben.

Methylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung unter der Glocke von 5,5 l Rauminhalt, entsprechend einer Grenzkonzentration von 3,6¹⁾ mg = 0,112 mg-Mol. pro Liter Luft) gab sehr schlechtes Wachstum.

Methylalkohol (50 ccm 1proz. Lösung; entsprechend der Grenzkonzentration 1,8 mg = 0,056 mg-Mol. pro Liter Luft) gab ziemlich gutes Wachstum.

Äthylalkohol²⁾ (50 ccm 2proz. Lösung, entsprechend der Grenzkonzentration 2,2 mg = 0,048 mg-Mol. pro Liter Luft) gab gutes Wachstum.

1) Die Konzentrationszahlen sind für die Versuchstemperatur von 27° C berechnet. Für Methylalkohol dürften die Zahlen ziemlich genau sein, da nach Konowalow (Wiedemanns Annalen der Physik, Bd. 14 [1881], S. 34) die Tensionskurve verschieden verdünnter Lösungen einen geradlinigen Verlauf nimmt, und somit die Tension einer 2proz. Lösung bei 27° C mit Hilfe der Zahlen für Wasser und reinen Alkohol bei dieser Temperatur leicht interpoliert werden kann. Die Zahlen für Äthylalkohol sind dagegen wahrscheinlich etwas zu niedrig. Die Tensionskurve weicht nämlich ein wenig von der Geraden ab, insofern als bei kleinen Alkoholkonzentrationen sich eine höhere Tension ergibt, als die Proportionalität mit der Zusammensetzung der Lösung erwarten läßt. Diese Erscheinung kommt noch in viel höherem Grade bei Iso-Butyl- und Iso-Amylalkohol zu Tage. Deshalb habe ich von der Anführung irgendwelcher Zahlen, die mangels empirischer Daten nur sehr ungenau geschätzt werden könnten, abgesehen. Doch sei gesagt, daß die Tensionen und damit die Grenzkonzentrationen in der Luft für 2proz. Iso-Butyl- und Iso-Amylalkohollösungen kaum kleiner sein können, als die des Äthylalkohols.

2) Das Ergebnis wird wegen des Zusammenhanges wiederholt.

Iso-Butylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung) gab ziemlich gutes Wachstum.

Iso-Amylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung) gab ziemlich gutes bis mittelmäßiges Wachstum.

Die Kontrollplatten, die mit Se I, aber ohne Alkohol, sowie die mit Alkohol, aber ohne Se I angesetzt waren, blieben steril.

Bei den oben erwähnten Versuchen wurde, wie gesagt, immer das Präparat Se I verwendet, das ja ein Gemisch von Natriumselenid und Natriumselenit darstellt. Interessant war jetzt zu sehen, ob eine Verschiebung oder Veränderung der Nährwerte der Kohlenstoffverbindungen eintreten würde, wenn das Selenit, das nach den Erfahrungen in Kap. IV ein mittelmäßiges Wachstum hervorrufen kann, allein zugegeben würde. 0,05 % Natriumselenit wurden also statt des Präparates Se I bei den folgenden Versuchen verwendet. Um eine schwach alkalische Reaktion beizubehalten, wurde dem Agar 1–2 Tropfen 1proz. Natronlauge zugefügt.

Methylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung, entsprechend der Grenzkonzentration 3,6 mg = 0,112 mg-Mol. pro Liter Luft). Sehr schlechtes Wachstum. (Leider wurde mit 1 % Methylalkohol kein Versuch gemacht.)

Äthylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung, entsprechend der Grenzkonzentration 2,2 mg = 0,048 mg-Mol. pro Liter Luft). Ziemlich gutes bis mittelmäßiges Wachstum.

Iso-Butylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung). Ziemlich gutes bis mittelmäßiges Wachstum.

Iso-Amylalkohol (50 ccm 2proz. Lösung). Mittelmäßiges bis schlechtes Wachstum.

Asparagin (1 % in den Agarplatten). Ziemlich gutes Wachstum, besser als mit den Alkoholen.

Dextrose (1 %). Ziemlich gutes Wachstum, wenig schlechter als mit Asparagin.

Pepton (1 %). Kein Wachstum.

Fleischextrakt (1 %). Unbedeutende Spuren von Wachstum.

Kulturen mit Kohlenstoffquelle in den erwähnten Mengen, aber ohne Zusatz von Selenit blieben steril, so auch solche mit Selenit, aber ohne Kohlenstoffquelle.

Wie man sieht, haben tatsächlich Verschiebungen der Nährwerte gegenüber den Kulturen mit Selenid stattgefunden. So stehen jetzt die niederen, aliphatischen Alkohole, wie dies auch sonst meist der Fall ist, Asparagin und Dextrose nach. Amylalkohol

tritt jetzt bedeutend hinter die anderen, wenigstens die Äthyl- und Butylalkohole zurück. Dextrose wird von den Bakterien in großem Maßstabe verwertet und gibt ein ziemlich gutes Wachstumsergebnis. Dagegen scheinen Pepton und Fleischextrakt auch unter diesen Umständen nicht gut angegriffen werden zu können.

Ein Unterschied zwischen Selenit-Kulturen mit und ohne Selenid, der deutlich hervortrat, sobald ein Wachstum stattgefunden hatte, machte sich insofern geltend, als die Kulturen mit Se I immer, gleichgültig ob Asparagin oder ein Alkohol als Kohlenstoffquelle benutzt wurde, einen starken üblen Geruch, nach den Maaßenschen¹⁾ Untersuchungen zu schließen wohl von Äthylselenid stammend, entwickelten. Die Kulturen mit reinem Selenit waren dagegen geruchlos, eine Tatsache, auf die später noch kurz zurückzukommen sein wird.

Als Zusammenfassung und zum leichteren Überblicken werden noch die wichtigsten Resultate bezüglich der Kohlenstoffquellen in Tabellenform dargestellt.

Tabelle II.

Wirkung verschiedener Alkoholkonzentrationen.

Zusatz von Se I ($\text{Na}_2\text{Se} + \text{Na}_2\text{SeO}_3$ usw.) — Temperatur: 27° C.

C-Quelle:	Wachstum:
Äthylalkoholdampf 11 mg <small>pro Ltr. Luft:</small>	0
„ 2,2 „ „	+ + + +
„ 0,11 „ „	+ + +
Kein Alkoholdampf in der Luft:	0

Tabelle III.

Wirkung verschiedener Konzentrationen Asparagin.

Zusatz von Se I. — Temperatur: 27° C.

C-Quelle:	Wachstum:
Asparagin etwa 7 ‰:	Spuren.
„ 2 „:	+ + +
„ 0,5 „:	+
„ 0,05 „:	0
Kein Asparagin:	0

1) Vgl. S. 103.

Tabelle IV.

Wirkung verschiedener C-Quellen.

Zusatz von Se I oder Na_2SeO_3 . — Temperatur: 27° C.

C-Quelle:	Mit Se I:	Mit Na_2SeO_3 :
Methylalkohol, Dampf einer 2proz. Lösung:	+	+
„ „ Dampf einer 1proz. Lösung:	+ + +	nicht untersucht
Äthylalkohol, Dampf einer 2proz. Lösung:	+ + + +	+ +
Iso-Butylalkohol, desgl.:	+ + +	+ +
Iso-Amylalkohol, desgl.:	+ +	+
Asparagin, 1 %:	+ + +	+ + +
Dextrose, 1 %:	+	+ + +
Pepton, 1 %:	0	0
Fleischextrakt, 1 %:	0	(Spuren)
Erbsendekokt, ein paar Tropfen:	0	nicht untersucht

VI. Können die Selenverbindungen durch andere Stoffe ersetzt werden?

In Kapitel IV wurde schon gezeigt, daß unser Bakterium nicht zur Entwicklung kommt, wenn nicht Natriumselenit oder ein dieses Salz enthaltendes Präparat (z. B. Se I) zugegen war. Bei diesen Versuchen wurde Äthylalkoholdampf als Kohlenstoffquelle verwendet. Aber nicht nur für den Fall, wo Alkohol als Kohlenstoffnahrung da war, zeigte sich das Selenit als eine *conditio sine qua non*. Auch mit den im vorigen Kapitel als tauglich erkannten sonstigen Kohlenstoffquellen konnte kein Wachstum erzielt werden, wenn die betreffenden Stoffe ohne Zusatz von Natriumselenit oder dem Präparate Se I geboten wurden.

Es lag nun nahe zu fragen, ob diese das Wachstum hervorrufoende Wirkung ausschließlich an das Selen geknüpft war oder ob vielleicht auch andere Verbindungen denselben Einfluß ausübten. Daß es dabei nicht auf das Element Se in beliebiger Verbindung ankam, zeigten schon die Versuche in Kap. IV, wo mit reinem Natriumselenid kein Wachstum erzielt wurde und mit Natriumselenat nur Spuren zu entdecken waren. Bei der Wahl der Stoffe, die geprüft werden sollten, kamen solche in erster Linie in Frage, die Berührungspunkte mit dem Natriumselenit zeigen.

Demnach lag es am nächsten, Versuche mit Tellurit anzustellen. Bei diesen kamen 0,05 % eines hygroskopischen und ein

wenig wasserhaltigen K_2TeO_3 -Präparates zur Verwendung. Die Platten waren durch Ausscheidung von Spuren H_2TeO_3 getrübt. Als Kohlenstoffquelle wurde der Dampf von einer 2proz. Athylalkohollösung in Wasser benutzt. Die Kulturen blieben auch nach Monaten vollkommen steril. Kaliumtellurit kann somit das Selenit nicht als Wachstum erregendes Mittel vertreten.

Unter Schwefelverbindungen wurden Natriumsulfit, Natriumthiosulfat und Kaliumsulfid versucht. Natriumsulfit, 0,1—0,05% (der Nährboden wurde durch Hinzufügen von einem Tropfen 1proz. Natronlauge alkalisch gemacht), ließ keine Bakterienentwicklung erkennen. Mit Natriumthiosulfat dagegen, in Konzentrationen von 0,1—0,05% in den schwach alkalisch reagierenden Agarplatten vorhanden, wurde immer ein mittelmäßiges Wachstum erzielt. Kohlenstoffquellen waren teils Alkoholdampf, wie in den vorigen Versuchen, teils 1% Asparagin. Die sich entwickelnden Kolonien gediehen etwa wie die mit Selenit, waren aber selbstverständlich nicht rot, sondern von einer weißlichgelben Farbe. Ausscheidung von Schwefel außerhalb der Zellen fand nicht statt, davon konnte man sich mit dem Mikroskop leicht überzeugen. Wahrscheinlich waren Schwefeltröpfchen intrazellulär vorhanden; doch war die Sache bei der Kleinheit der Organismen nicht ohne weiteres festzustellen. Diese Frage muß wie manche andere, die Schwefelverbindungen betreffende unentschieden bleiben, da mir zurzeit genügende Unterlagen fehlen. Mit Sulfaten sind keine besonderen Versuche gemacht worden. Die Mineralsalzlösung enthielt aber immer 0,06% Magnesiumsulfat, das sich als unwirksam erwiesen hatte. Kulturen mit 0,1% Kaliumsulfid sind noch zu erwähnen. Sie blieben steril, ohne Spuren von Wachstum. Als Kohlenstoffquelle war Alkoholdampf zugegen.

Eine hervortretende Eigenschaft des Natriumselenits ist die leichte Reduzierbarkeit. Dieselbe Eigentümlichkeit kommt gewissen Farbstoffen zu, die leicht in eine farblose Leukoverbindung übergehen und deshalb seit lange zum Demonstrieren der Reduktionsfähigkeit verschiedener Organismen Verwendung finden. Außer dem, daß sie leicht Sauerstoff abgeben resp. unter Freigabe von Sauerstoff reagieren, haben sie mit dem Selenit nichts Gemeinsames.

Ein paar solche Farbstoffe wurden bei meinen Versuchen geprüft, wobei allerdings die Komplikation hinzukam, daß die genannten Verbindungen außer sonstigem Einfluß vielleicht auch als Kohlenstoffquellen wirken könnten. Wegen seiner geringen Giftig-

keit kam das Indigkarmin, indigodisulfonsaures Natrium, zuerst in Betracht. Dem Nähragar wurde 0,1—0,5 % Indigkarmin zugefügt. Als Kohlenstoffquellen dienten Alkoholdampf oder 1 % Asparagin. Es zeigte sich, daß die Bakterien damit ziemlich gut wuchsen, ja sogar meist etwas besser als mit Selenit, wenn diese Verbindung ohne Zusatz von Selenid geboten wurde. Kulturen ohne besondere Kohlenstoffquelle blieben steril, so auch die Kontrollproben, wo zwar die Kohlenstoffquelle, nicht aber Indigkarmin anwesend war. Die Kolonien waren farblos, opaleszierend. Irgend eine sichtbare Veränderung im Nährsubstrate war nicht hervorgerufen worden. Kolonien, die durch langes Verweilen ohne Kohlenstoffnahrung nicht mehr lebensfähig oder schon tot waren, färbten sich immer dunkelblau. Sie hatten viel Indigkarmin gespeichert, was erst zutage trat, als durch das Aufhören der reduzierenden Tätigkeit des Organismus der Farbstoff sich an der Luft wieder oxydieren konnte. Außer mit Indigkarmin wurde noch mit Lackmus, 0,1—0,5 %, ein ziemlich gutes und mit Methylenblau, 0,01 %, ein bedeutend schlechteres Wachstum unter sonst gleichen Versuchsbedingungen erzielt. Kulturen ohne besondere Kohlenstoffquelle ergaben eine unbedeutende Entwicklung, die nicht notwendig von einem Nährwerte des Farbstoffes als Kohlenstoffquelle bedingt sein muß, da ich keine Garantien für die völlige Reinheit meiner Präparate hatte.

Als Stoffe, die kein positives Ergebnis brachten, mögen noch erwähnt werden: Kaliumnitrat und Kaliumpermanganat in Konzentrationen von 0,05 %. Kaliumpermanganat hielt sich im Agar nicht gut und dürfte im übrigen auch giftig wirken.

Folgende Tabelle enthält die wichtigsten Ergebnisse der eben beschriebenen Versuche. Zum Vergleich sind die Resultate des Kapitels IV darin mit einbezogen.

Tabelle V.

Wirkung verschiedener Stoffe als Wachstumserreger.

C-Quelle: Alkoholdampf. — Temperatur: 27° C.

Zusatz von:	Wachstum:
Se I (Na ₂ Se, Na ₂ SeO ₃ usw.):	+ + + +
Se II (Na ₂ Se):	0
Na ₂ SeO ₃ :	+ +
Se II + Na ₂ SeO ₃ :	+ + + +
Na ₂ SeO ₄ :	Spuren nach längerer Zeit.

Zusatz von:	Wachstum:
K_2TeO_3 :	0
$Na_2S_2O_3$:	+ +
Na_2SO_3 :	0
K_2S :	0
KNO_3 :	0
$KMnO_4$:	0
Indigkarmin:	+ + +
Lackmus:	+ + +
Methylenblau:	+ +
Ohne Zusatz:	0

Von großer Bedeutung wäre es noch gewesen, durch anaerobes Züchten die Beziehungen der Bakterien zum atmosphärischen Sauerstoff genau festzustellen. Einige Kulturen sowohl mit Selenit als mit Indigkarmin und Asparagin als Kohlenstoffquelle wurden auch in Wasserstoffatmosphäre gemacht, wobei für diesen Zweck reingezüchtete *Amylobacter*-Kulturen als Indikator auf genügende Sauerstofffreiheit zugegen waren. Leider zeigte es sich, daß das verwendete Impfmateriel von dem schon anfangs erwähnten *Bacterium coli* verunreinigt war, und da dieses auch anaerob zu leben vermag, darf den Ergebnissen kein entscheidender Wert beigemessen werden. Es sei nur erwähnt, daß die angesetzten Kulturen unter diesen Bedingungen sich ziemlich gut entwickelten. Die Versuche müßten, um völlig eindeutig zu sein, mit reinem Material wiederholt werden, woran ich leider aus äußeren Gründen verhindert war.

VII. Besprechung der Resultate.

Will man sich ein Bild von dem Stoffwechsel unseres Bakteriums machen, so muß man vor allem die Frage nach der Rolle der Selenverbindungen zu beantworten versuchen. Dabei hat man folgende Tatsachen festzuhalten: Das Präparat Se I, das sowohl Natriumselenid als auch Selenit enthält, sowie ein Gemisch von diesen beiden Stoffen in möglichst reinem Zustande bedingen ein gutes Wachstum. Natriumselenid allein gibt kein Wachstum, Natriumselenit aber für sich ruft ein mittelmäßiges Wachstum hervor. Ohne Zugabe vom Präparat Se I oder Natriumselenit oder von einem Stoffe, der diese zu ersetzen vermag, erhält man kein Wachstum. Es ist also klar, daß diese Bakterien nicht unter

gewöhnlichen Kulturbedingungen zu wachsen vermögen, und daß eine Zugabe von Natriumselenit das Wachstum hervorruft, das noch durch die Anwesenheit von Natriumselenid erheblich begünstigt wird. Halten wir uns erst an das Selenit, das hier die Rolle eines bedingenden Faktors zu spielen scheint.

Man könnte sich denken, das Selenit ermögliche als Katalysator das Wachstum. Begnügte man sich mit einer solchen allgemeinen Formulierung, so wäre dies im Grunde gleichbedeutend mit einem Verzicht auf nähere Erklärungsversuche, was hier um so weniger zu empfehlen wäre, als auch einige Befunde gegen die Auffassung des Selenits als eines unveränderlichen Katalysators sprechen. Das Selenit bleibt nicht dauernd unverändert, sondern wird in die Bakterienzellen aufgenommen und daselbst unter Ausscheidung von beträchtlichen Mengen Selen reduziert. Es bliebe dann also nur übrig, in den intrazellularen Selenkörnchen einen Katalysator des Wachstums zu erblicken. Dann müßten aber auch die Stoffe, die durch Reduktion von Indigkarmin, Lackmus usw.¹⁾, sowie die, die durch Verarbeitung von Natriumthiosulfat durch die Bakterien entstehen, dieselbe katalysatorische Wirkung ausüben, obwohl sie unter sich und mit dem Selen nichts Gemeinsames haben.

Man kann aber über diese allgemein gehaltene Annahme eines katalysatorischen Effekts der fraglichen Stoffe hinausgehen und den Versuch machen, eine besondere Erklärung ihrer Wirkungsweise zu geben. Es sprechen nämlich viele Tatsachen dafür, daß wir es hier mit einer Sauerstoffquelle des Organismus zu tun haben.

Das Selenit wird reduziert; seine Verwendung hat also nichts mit der Oxydation des Thiosulfates zu tun, wodurch die Thionsäurebakterien ihre Energie gewinnen. Das Produkt der Reduktion ist metallisches Selen. Keine Tatsachen sprechen dafür, daß die Reduktion noch weiter bis zum Selenwasserstoff ginge. Die Kulturen, wo nur Selenit zugegen war, rochen nie weder nach Selenwasserstoff noch nach der organischen Selenverbindung²⁾, die immer die Anwesenheit von Selenid in den Kulturen begleitete, sobald ein Wachstum zustande gekommen war.

Die Reduktion des Selenits zu Selen ist keine spezielle Eigentümlichkeit unseres Bakteriums. Im Gegenteil kommt sie den meisten Bakterien zu, wie es aus den Arbeiten von Chabrie und

1) Mit diesen Stoffen ist Wachstum erzielt worden. Vgl. Tabelle V, S. 112/113.

2) Vgl. S. 103 u. 109.

Lapique¹⁾, Scheurlen²⁾, Klett³⁾, Maaßen⁴⁾ und Gosio⁵⁾ hervorgeht⁶⁾. Das Eigenartige bei meinen Versuchen ist jedoch, daß es nie gelang, die Bakterien ohne Selenit oder einen Ersatzstoff zur Entwicklung zu bringen. Ist man schon deshalb versucht, in dem leicht Sauerstoff-abgebenden Selenit eine Sauerstoffquelle statt des offenbar unbrauchbaren atmosphärischen Sauerstoffs zu erblicken, so wird diese Auffassung noch sehr durch die Art der zum Ersatz tauglichen Stoffe gestützt. Außer Natriumselenit haben noch Indigkarmin, Lackmus, Methylenblau und Natriumthiosulfat Wachstum hervorrufen können. Diese Verbindungen, die den verschiedensten chemischen Gruppen angehören, haben, soweit ich sehe, nur das gemeinsam, daß sie leicht Sauerstoff abgeben resp. unter Freigabe von Sauerstoff reagieren, mit anderen Worten, daß sie als Sauerstoffquellen dienen können. Unter diesen müßte, wenn unsere Annahme zutrifft, das Indigkarmin die wertvollste sein, weil es nicht nur den einmal im Moleküle vorhandenen Sauerstoff leicht abgibt, sondern auch als Überträger für den atmosphärischen Sauerstoff wirken könnte. Wie bekannt, nimmt die farblose Leukoform des Farbstoffes außerordentlich leicht Sauerstoff auf und geht in die farbige Verbindung über, die dann wieder den Sauerstoff abliefern kann. Beim Selenit ist etwas Ähnliches ausgeschlossen. Da bleibt das Selen unverändert in den Zellen und das Selenit kann somit nur mit dem in seinem Molekül ursprünglich gebundenen Sauerstoff dienen. Inwieweit die erörterte Möglichkeit zur Übertragung des atmosphärischen Sauerstoffs eine Rolle bei den Kulturen mit Indigkarmin gespielt hat, habe ich nicht näher untersucht. Zwar ergaben die Versuche mit Indigkarmin meist ein etwas besseres Wachstum als die mit Selenit (vgl. Tabelle V auf S. 112/113). Einwandfrei hätte die Frage nur durch anaerobe Kultur entschieden werden können. Den Ergebnissen meiner Versuche in dieser Richtung kann ich aber zunächst keine entscheidende Bedeutung beimessen, da die fraglichen Kulturen sich als verunreinigt herausstellten (vgl. S. 113).

1) Compt. rend., T. 110 (1890), p. 152.

2) Zeitschr. f. Hygiene usw., Bd. 33 (1900), S. 135.

3) Ebenda, S. 137.

4) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 18 (1901), S. 475.

5) Zeitschr. f. Hygiene usw., Bd. 51 (1905), S. 65.

6) Die Reduktion wird nach Maaßen (Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 21 (1904), S. 377) von Enzymen vollbracht, die auch in Preßsäften tätig bleiben.

Die Stoffe, die untauglich zur Erzeugung eines Wachstums waren, können entweder gar nicht oder schwerer Sauerstoff abspalten als die tauglichen. Natriumselenid und Kaliumsulfid enthalten keinen Sauerstoff. Kaliumnitrat und Sulfate sind relativ schwer reduzierbar. Kaliumtellurit ist zwar von Gosio¹⁾ vor dem Natriumselenit als Indikator für durch Bakterien verursachte Reduktionen und damit für das Bakterienleben selbst bevorzugt worden. Auch Maaßen²⁾ und Pollacci³⁾ haben Pilze Tellurit reduzieren sehen. Das Tellurit ist also nach diesen Arbeiten nicht schwer reduzierbar⁴⁾, doch bezeichnet es Gosio als erheblich resistenter gegen Reduktionswirkungen als das Selenit.

Befremdend und anscheinend unerklärlich wirkt die Tatsache, daß wohl das Natriumthiosulfat, nicht aber das nahestehende Sulfid Wachstum hervorruft⁵⁾.

Den von mir studierten Bakterien wäre nach meiner Ansicht der freie Sauerstoff keine genügende Sauerstoffquelle. Die Ursache ist nicht eine Anpassung an das anaerobe Leben und eine damit oft zusammenhängende Empfindlichkeit für den atmosphärischen Sauerstoff, denn die Bakterien wuchsen ja an der Luft sehr gut. Will man einen Versuch zur Erklärung wagen, könnte man vielleicht sagen, daß der molekulare Sauerstoff zu schwer aktivierbar scheint, d. h. die Stoffe scheinen zu fehlen, die die Übertragung des Luftsauerstoffs in genügenden Mengen auf die zu oxydierenden

1) A. a. O.

2) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 18 (1901), S. 475.

3) Atti dell'Inst. Bot. dell'Università di Pavia, Vol. 15, Ser. II (1914), p. 281.

4) Nach Gloger (Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 40 (1906), S. 584) beruht die Ausfällung von schwarzem Niederschlag in Zellen bei Anwesenheit von Tellurit nicht auf einer einfachen Reduktionswirkung, sondern hängt davon ab, ob Bedingungen zur Fällung von TeS vorhanden sind oder nicht.

5) Bei einer Berechnung ergibt sich, daß die theoretische Reaktion zwischen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und Alkohol, wodurch der Alkohol zu CO_2 oxydiert, das $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zu S reduziert wird, exotherm ist. Die entsprechende Reaktion zwischen Na_2SO_3 und Alkohol steht dagegen auf der Grenze zu den endothermen Reaktionen. Obwohl der Umsatz nicht so einfach zu denken ist, sind doch die erwähnten theoretischen Reaktionen dafür entscheidend, ob in einem oder anderem Falle Energie zur Verfügung steht oder nicht. Wenn die Reaktion $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Alkohol}$ keine, die Reaktion $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{Alkohol}$ dagegen eine beträchtliche Menge Energie gibt, so muß, vorausgesetzt, daß Na_2SO_3 und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ als O-Quellen wirken sollen, das Wachstum bei Benutzung des ersten Salzes ausbleiben, während ein Gedeihen bei Verwendung des zweiten möglich ist. Erwähnt sei noch, daß die Reaktionen zwischen Na_2SeO_3 und Alkohol, Asparagin usw. stark exotherm sind.

Verbindungen bewirken. Die Rolle dieser Sauerstoffüberträger, „Katalysatoren“, „Induktoren“ (vgl. Oppenheimer, Die Fermente, Aufl. IV, S. 757 f.) hat man sich so zu denken, daß sie eine Oxydation herbeiführen, die nur auf die Stoffe wirkt, die als Brennmaterial dienen. Es ist nämlich, wie Pfeffer¹⁾ zeigte, kein allgemeines Oxydationsvermögen im Plasma vorhanden. Wenn es auch als Regel gelten mag, daß der Sauerstoff, „sofern er geboten ist, immer in mehr oder minder hohem Grade in den Stoffwechsel gerissen wird“ (Pfeffer, a. a. O., S. 556), so wäre eine Ausnahme meines Erachtens nicht befremdend, wenn man bedenkt, daß das Eintreten von Reaktionen, hier Oxydationen, die in vitro nicht oder sehr langsam verlaufen, im Plasma von dem Vorhandensein spezifischer Verbindungen, der Enzyme, abhängen muß. Daß bei meinen Bakterien eine solche Ausnahme vorhanden wäre, kann ich nicht sicher behaupten. Zwar scheint der freie Sauerstoff insofern vollkommen indifferent, daß er weder Entwicklung hervorruft, noch einem durch geeignete Sauerstoffquellen zustande gekommenen Wachstum schadet. Die Möglichkeit besteht aber noch immer, daß er doch irgend eine Rolle spielen und in ein schon vorhandenes Wachstum eingreifen könnte.

Für das Wachstum ist, wie schon oft hervorgehoben wurde, das Vorhandensein von Stoffen notwendig, die leicht atomistischen Sauerstoff abgeben resp. unter Freigabe von solchem reagieren, und so selbst den vermuteten Mangel an zelleigenen Sauerstoffüberträgern ausfüllen könnten. Bei meinen Versuchen haben Natriumselenit und Farbstoffe, wie z. B. Indigkarmin, in dieser Hinsicht die wichtigste Rolle gespielt. Es wäre kurzsichtig zu denken, daß diese Verbindungen, die beim natürlichen Leben der Bakterien kaum in Frage kommen, die besten oder gar die einzigen Sauerstoffquellen wären. Im Bodenschlamm des Kieler Hafens werden viele organische Stoffe vorhanden sein, die leicht Sauerstoff unter Oxydation der Zellstoffe abspalten oder sonst unter Energieabgabe reagieren. Die nützlichen Verbindungen können, wie schon die Experimente mit Natriumselenit und Indigkarmin zeigen, sehr verschiedener Natur sein. Die Hauptsache ist, daß sie leicht reagieren. In dieser Hinsicht besteht nicht einmal das Kaliumtellurit, das sonst von den meisten Bakterien reduziert wird, die Probe.

1) Pflanzenphysiologie, Aufl. II, Bd. I, S. 551 f.

Entscheidend für die Auffassung, daß das Selenit, das Indigkarmin usw. bei unseren Bakterien die Rolle einer Sauerstoffquelle spielt, ist es natürlich nicht, daß diese Stoffe aufgenommen werden. Es hat ja Pfeffer¹⁾ gezeigt, daß Farbstoffe, darunter auch das Methylenblau, in pflanzlichen Zellen gespeichert werden, ohne daß von einer Bedeutung der Verbindungen im Stoffwechsel der Zellen die Rede sein kann. Auch das Selenit, das, wie schon gesagt, in den meisten Bakterienzellen aufgenommen und reduziert wird, dürfte da kaum eine Rolle spielen. Jedenfalls ist es nach Versuchen von Scheurlen²⁾ mit Milzbrandbakterien und von Klett³⁾ mit typisch aeroben Bakterien klar, daß das Selenit nicht diesen Organismen als Ersatz für den atmosphärischen Sauerstoff dienen kann. Für uns ist von Bedeutung die Tatsache, daß ein Organismus, der in Anwesenheit des freien Sauerstoffs nicht zu wachsen vermag, durch das Darbieten von mehreren Stoffen zur Entwicklung gebracht wird, die nicht nur einer nachweislichen Reduktion in den Zellen unterliegen, sondern auch als einzige gemeinsame Eigenschaft diese leichte Reduzierbarkeit haben, d. i. die Fähigkeit, Sauerstoff in statu nascendi abzugeben. Dies berechtigt meiner Ansicht nach mit großer Wahrscheinlichkeit zur Auffassung der fraglichen Stoffe als Sauerstoffquellen.

Wenn wir nun zur Diskussion des Natriumselenids und dessen Bedeutung für das Bakterienwachstum übergehen, muß an folgende Tatsachen erinnert werden: Reines Selenid kann für sich kein Wachstum hervorrufen. Zu einer Kultur mit Selenit hinzugefügt, bewirkt das Selenid ein etwa doppelt kräftigeres Wachstum. Dabei ist die Ausscheidung von Selen in den Zellen viel intensiver, was die Kulturen meist dunkelrot macht. Ein starker, übler Geruch von organischen Selenverbindungen tritt immer, und zwar unabhängig von der Art der Kohlenstoffquelle auf.

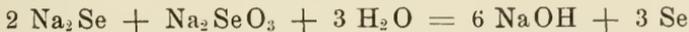
Auch hier könnte man sich vielleicht nur damit begnügen, die Wirkung des Selenids als eine katalytische zu bezeichnen, dies um so mehr, als es sich in diesem Falle nicht um einen bedingenden,

1) Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Tübinger Untersuchungen, 1886—88, Bd. 2, S. 179.

2) Zeitschr. f. Hygiene usw., Bd. 33 (1900), S. 135.

3) Ebenda, S. 137.

sondern nur einen begünstigenden Faktor handelt. Gegen diese Auffassung sind aber Bedenken derselben Art vorhanden, wie sie beim Selenit hervorgehoben wurden. Das Selenid wird ebenso wie das Selenit in den Zellen aufgenommen. Wäre dies nicht der Fall, könnte man schwerlich das Auftreten der übelriechenden Gase erklären, die nach Maaßens¹⁾ Untersuchungen an Bakterien und Pilzen auf einer Äthylierung beruhen sollen. Da dieser Geruch, den man übrigens unmöglich mit dem des Selenwasserstoffs verwechseln kann, nicht bei den Kulturen mit Selenit, sondern nur bei Gegenwart von Selenid auftrat, muß er einer Äthylierung kleiner Mengen Selenids resp. Selenwasserstoffs zugeschrieben werden, und da weiter diese Äthylierung kaum in dem Nährmedium außerhalb der Zellen vollbracht werden kann, kommt man eben zu der Annahme, daß das Selenid in die Zellen gelangen muß. Werden aber einmal sowohl Selenid als Selenit aufgenommen, so ist es schwer einzusehen, warum sie in den Zellen nicht reagieren sollten. Die Reaktion



findet schon allmählich in einer Lösung von Selenid und Selenit statt, und nur einer erheblichen Verzögerung des Reaktionsverlaufes durch den Agar verdankt man es, daß man Natriumselenid überhaupt lange Zeit im Nährboden haben kann. Setzt man nun keine lokale Trennung der beiden Reaktionskomponenten im Zellinnern oder eine sonstige Verhinderung des Vorganges voraus, so muß schon aus chemischen Gründen das Selenit das Selenid oxydieren und das Selenid das Selenit reduzieren. Das Selenid würde also in den Zellen verbraucht, was mit dem Begriffe eines Katalysators nicht gut vereinbar ist. Freilich kann man sich die Sache noch so vorstellen, daß zwar ein Teil des Selenids verbraucht wird, ein anderer Teil aber noch dauernd katalytisch wirksam bleibt.

Die Reaktion zwischen Selenid und Selenit, die, wie wir sahen, stattfinden muß, selbst wenn sie durch keine enzymatische Wirksamkeit in den Zellen unterstützt wird, ist selbstverständlich ein exothermer Vorgang, der als Energiequelle dienen kann. Es liegt deshalb nahe, in dem begünstigten Wachstum der Bakterien den Einfluß der neuen Energiequelle zu erblicken. Damit wäre ein positiver Versuch gewagt zur Erklärung, warum die Bakterien bei

1) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 18 (1901), S. 475.

Anwesenheit von Selenid so viel besser gedeihen. Ob es sich um einen Zuschuß zu der durch Verbrennung der Kohlenstoffquelle erzeugten Energie handelt, oder ob die Oxydation des Selenids allein mit so günstigem Ergebnis als Energiequelle dient, ist eine Frage, die zu sehr in der Luft schwebt, als daß man eine bestimmte Meinung darüber äußern könnte. Für die zweite Annahme spricht allerdings die Tatsache, daß im Präparate Se I, das ja das beste Wachstum erzeugte, mehr Selenid als Selenit enthalten sein dürfte. Demnach müßte kein Selenit zur Oxydation der Kohlenstoffquelle übrig bleiben, da es ja notwendig von dem viel leichter oxydablen Selenid verbraucht wird. Die Kohlenstoffquelle aber würde in diesem Falle vor Oxydation geschützt werden und somit nur als Baustoff dienen können.

Im Anschluß an die vermutete Rolle des Selenids als Energiequelle mögen die Versuche über die Kohlenstoffquelle erörtert werden. Zuerst sei hervorgehoben, daß unsere Bakterien eine besondere Kohlenstoffquelle unbedingt nötig haben; das Kohlendioxyd der Luft sowie die gewöhnlich in der Luft vorhandenen organischen Verunreinigungen können nicht ausgenützt werden. Eigentümlich ist, daß Pepton und Fleischextrakt, die doch als gute Bakteriennahrung bekannt sind, hier vollkommen versagen. Bei der Beurteilung der Nährwerte sonstiger Kohlenstoffquellen ist es nicht gleichgültig, ob sie zusammen mit reinem Selenit oder einem Gemisch von Selenit und Selenid geboten wurden. Ein Vergleich zwischen den beiden Kolumnen der Tabelle IV (S. 110) ergibt dies ohne weiteres.

Die erste Kolumne der Tabelle IV behandelt Versuche, die mit einem Gemisch von Selenit und Selenid (dem Präparate Se I) ausgeführt wurden. Da steht der Äthylalkohol in erster Reihe, vor Methyl- und Butylalkohol, die denselben Nährwert wie Asparagin haben. Die Dextrose zeigt nur ein schlechtes Wachstumsergebnis. Die zweite Kolumne mit Versuchen, wo als Zusatz reiner Selenit verwendet wurde, zeigt dagegen Dextrose und Asparagin am ersten Platze, vor den Alkoholen. Diese Tatsachen lassen sich gut in Einklang mit der Hypothese vom Selenid als Energiequelle bringen. Wo Selenid zugegen ist, kann die Kohlenstoffquelle mehr oder weniger vollständig zum Aufbau verwendet werden. Die guten Brennstoffe, Asparagin, besonders aber Dextrose, können unter diesen Umständen nicht zur Geltung kommen. Ist kein Selenid dabei, nehmen sie ihren gewöhnlichen Platz wieder

ein und stehen vor den zweifelsohne als Brennmaterial minderwertigen Alkoholen. Noch sei darauf aufmerksam gemacht, mit wie kleinen Mengen Kohlenstoffnahrung, besonders Alkohol, die Bakterien auskommen, wenigstens wenn Selenid und Selenit zusammen geboten werden. Es genügen schon die Alkoholdämpfe, die von 50 ccm einer 0,1proz. Alkohollösung zu einem Luftraum von 5,5 l abgegeben werden (etwa 0,11 mg pro Liter), um ein gutes Wachstum hervorzurufen. Diese bescheidenen Ansprüche auf Kohlenstoffnahrung erinnern an den *Bacillus oligocarpophilus* von Beijerinck und van Delden¹⁾, der allerdings schon unter den gewöhnlich in der Luft vorhandenen organischen Verbindungen seine besten C-Quellen findet. Bei meinen Bakterien war, wie gesagt, Alkohol in der Luft notwendig, unter Umständen aber nur in so kleinen Mengen, wie sie durch Umgehen mit Alkohol im Laboratorium zustande kommen.

Sucht man Anknüpfungspunkte zwischen den Bakterien, die den Gegenstand dieser Untersuchung bildeten, und anderen früher bekannten Organismen, so sind sie wohl unter den schlamm- und erdebewohnenden Mikroorganismen zu finden. Mit den von Winogradsky²⁾, Keil³⁾ u. a. untersuchten Schwefelbakterien, mit den Nathansohnschen⁴⁾ sog. Thionsäurebakterien sowie mit dem zu derselben Gruppe gehörenden *Thiobacillus thioparus* von Beijerinck⁵⁾ und Jacobsen⁶⁾ haben meine Bakterien offenbar nichts zu tun. Jene gewinnen ja durch Oxydation verschiedener anorganischer Schwefelverbindungen mittels des atmosphärischen Sauerstoffs Energie genug für die Reduktion des Kohlendioxyds. Bei diesen wurde es einwandfrei gezeigt, daß der atmosphärische Sauerstoff die erforderliche Energiereaktion nicht zustande bringen kann, und daß das Kohlendioxyd überhaupt keine Rolle spielt.

Gewisse Beziehungen könnte man aber zu einigen denitrifizierenden Bakterien finden. Der von Beijerinck⁷⁾ beschriebene *Thiobacillus denitrificans* und die ähnlichen von Lieske⁸⁾ und

1) Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 10 (1903), S. 33.

2) Bot. Ztg., Bd. 45 (1887), S. 489 und Beiträge zur Morphologie u. Physiologie d. Bakterien, 1888, Heft 1.

3) Cohns Beiträge, Bd. 11 (1912), S. 335.

4) Mitteil. a. d. Zoolog. Station zu Neapel, Bd. 15 (1902), S. 655.

5) Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 11 (1904), S. 593.

6) Folia Microbiologica, Bd. 1 (1912), S. 487 und Bd. 3 (1914), S. 155.

7) A. a. O.

8) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 30 (1912), S. (12).

Gehring¹⁾ studierten Bakterien benutzen nämlich als Sauerstoffquelle nicht den Luftsauerstoff, sondern eine sauerstoffreiche, reduzierbare Verbindung, das Kaliumnitrat. Als oxydierbare Stoffe werden Schwefelwasserstoff, Schwefel, Natriumthiosulfat usw. verwendet. Dieser Stoffwechsel wäre somit mit der bei meinen Bakterien offenbar vorkommenden Energiereaktion zwischen der Sauerstoffquelle Selenit und dem oxydierbaren Stoff Selenid vergleichbar. Unterschiede bestehen darin, daß die genannten denitrifizierenden Bakterien sauerstofffliehend sind und als Kohlenstoffquelle nicht organischen Kohlenstoff nötig haben, sondern mit Karbonaten auskommen.

Weitere Anknüpfungspunkte sind wohl zu einigen reduzierenden Schwefelbakterien vorhanden, namentlich zu dem *Spirillum desulfuricans* von Beijerinck²⁾ und der *Microspira aestuarii* von van Delden³⁾. Diese brauchen organische Kohlenstoffnahrung, reduzieren Schwefelverbindungen und kommen außerdem an gleichen Lokalitäten vor wie meine Bakterien. Sie sind aber streng anaerob, was meine Bakterien nicht sind, und haben ein ungemein kräftigeres Reduktionsvermögen.

Im Vergleich mit anderen Organismen sind meine Bakterien als sehr niedrig stehend zu betrachten. Spuren von morphologischer Differenzierung waren schon wegen der Kleinheit nicht zu entdecken. Ich halte es nicht für unmöglich, daß sie auch in ihrem Stoffwechsel sehr primitiv ausgerüstet und zufolge dessen weniger spezialisiert sind in bezug auf die Stoffe, die zur Energiebeschaffung dienen können. Energiereaktionen, wie die mit Hilfe des molekularen Sauerstoffs, die einen besonderen enzymatischen Apparat voraussetzen, fehlen vielleicht. Dagegen können möglicherweise eine ganze Menge exothermer Reaktionen, die sich gewöhnlich im Bodenschlamme abspielen, zum Erhalten des Lebens dienen, wenn nur die teilnehmenden Verbindungen in die Zellen hinein gelangen und daselbst genügend leicht reagieren. Dies sei nicht gesagt, um zu behaupten, daß es gerade bei meinen Bakterien zutreffen müsse (um das sicher behaupten zu können, reichen die beobachteten Tatsachen nicht aus), sondern mehr, um auf die Möglichkeit solcher allerprimitivsten Organismen aufmerksam zu machen.

1) Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 42 (1914), S. 402.

2) Daselbst, Bd. 1 (1895), S. 1, 49 u. 104.

3) Daselbst, Bd. 11 (1903), S. 81 u. 113.

Ob die Bakterienart, die der Hauptgegenstand dieser Arbeit war, früher beobachtet worden ist, ist wohl unmöglich zu entscheiden. Jedenfalls war der Stoffwechsel, der hier mit manchen Lücken beschrieben wurde und welcher die einzigen sicheren Erkennungszeichen birgt, nicht vorher bekannt. Van Delden¹⁾ berichtet, daß er beim Kultivieren seiner sulfatreduzierenden *Microspira aestuarii*, die aus ähnlichem, schwefelwasserstoffhaltigem Seebodenschlamme, wie meine Bakterien, isoliert wurde, immer in jungen Kulturen einen *Micrococcus* beobachtet habe. Andererseits sah ich in den ersten Rohkulturen meines Bakteriums immer ein schnell bewegliches Spirillum, das mit der *Microspira aestuarii* van Deldens möglicherweise identisch sein könnte. Die Spirillen verschwanden beim weiteren Kultivieren sehr schnell, dagegen waren die zur Gruppe des *Bacterium coli* gehörenden Organismen, wie schon berichtet wurde, wenn sie auftraten, sehr schwer zu entfernen²⁾. Ob nun der von van Delden beobachtete *Micrococcus* und der meinige dieselben sind, kann nicht entschieden werden. Die gleichen Standorte und die Gesellschaft lassen es jedenfalls als möglich erscheinen. Mangels mikroskopischer oder, kurz ausdrückbarer, physiologischer Merkmale schlage ich für meine Bakterie den Namen *Micrococcus selenicus* vor. Mit diesem Namen sei nicht gesagt, daß die Bakterie speziell an Selen durch besondere Beziehungen gebunden wäre, sondern nur an die Umstände erinnert, worunter sie zuerst gezüchtet wurde. Ihre charakteristischen Eigenschaften und ihr Stoffwechsel sind, soweit die in manchem Punkte unvollständigen Untersuchungen darüber Aufklärung bringen, am Schlusse der Arbeit noch einmal kurz zusammengefaßt.

VIII. Das Bakterium B.

Um das Wesen der auf S. 100 erwähnten Bakterie B aufzuklären, habe ich eine Menge Kulturen mit dieser Art gemacht. Da aber die Versuche nichts Interessantes zutage brachten, kann ich mich darüber kurz fassen.

Auch diese Organismen sind außerordentlich klein. Sie sind

1) A. a. O.

2) Abhängig vom *Bact. coli*, etwa so wie das eine demitrifizierende Bakterium von Burri und Stutzer (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. I (1895), S. 257, 350 u. 422), ist meine Bakterie sicher nicht.

ovaler Form, meistens zweimal so lang wie breit. Die Länge schätze ich auf etwa $0,6 \mu$. Sehr häufig bleiben die Zellen nach der Teilung zu zwei und zwei zusammenhängend. Mit Methylblau werden sie besonders gut gefärbt. Geißelfärbungen waren auch hier erfolglos, obwohl die Bakterien den Eindruck machten, als ob sie selbständig beweglich seien. Die Kolonien auf selenfreiem Nährboden¹⁾ waren kleinen, opaleszierenden Flüssigkeitstropfen ähnlich, hatten also keine festere Konsistenz. Die oberflächlichen Kolonien wuchsen etwas schneller und wurden auch größer als bei A, die im Agar eingeschlossenen dagegen blieben immer sehr klein und brauchten eine geraume Zeit, um sichtbare Dimensionen zu erreichen.

Beim Züchten fiel vor allem auf, daß diese Organismen, im Gegensatz zu den früheren, auf Nährböden gut wuchsen, die Se II (reines Na_2Se), K_2S , Na_2SO_3 , Na_2SeO_4 , aber auch keine von den Selen- oder Schwefelverbindungen enthielten. Die Kolonien blieben in allen diesen Fällen farblos, ohne bemerkbare Selen- oder Schwefelausscheidung, dagegen färbten sie sich durch intrazelluläres Selen hellrot, wenn Na_2SeO_3 zugegen war. Aus den vielfach wiederholten Versuchen ging also hervor, daß das Bakterium B sich in keiner Hinsicht von dem gewöhnlichen aeroben Bakterientypus unterscheidet, wenn man ihm vielleicht nicht eine größere Resistenz gegen Selenverbindungen und bescheidene Ansprüche auf Kohlenstoffnahrung zuschreiben wollte. Mit diesem Erkenntnis erübrigt sich ein näherer Bericht über meine Versuche, die außer mit den schon genannten Stoffen mit einigen Kohlenstoffquellen gemacht wurden.

IX. Zusammenfassung der Resultate.

1. Es wurde gezeigt, daß eine aus dem Bodenschlamme des Kieler Hafens gewonnene, zu dem Nathansohn-Beijerinckschen *Thiobacillus thioparus* gehörende Bakterienart sich nicht entwickelte, wenn statt Natriumsulfid oder Thio-sulfat Natriumselenid geboten wurde.
2. Aus derselben Bodenschlammprobe wurde eine andere Bakterie isoliert, für die ich den Namen *Micrococcus*

1) Dieselbe Mineralsalzlösung, wie bei der Bakterie A, wurde auch hier benutzt.

selenicus vorschlage und die sich durch folgende Merkmale kennzeichnet:

- a) Es ist ein meist kugelrunder *Micrococcus* von Dimensionen unter $0,5 \mu$, färbbar mit Methylenblau und Karbolfuchsin.
- b) Die Einzelkolonien auf Agar sind sehr klein (1 mm Durchmesser), gallertartig und sich etwas über das Substrat erhebend. Strich- und Tropfenkulturen besitzen gleichfalls ein sehr beschränktes Ausbreitungsvermögen.
- c) Die Zeit bis Erscheinen der Kolonien auf günstigem Nährboden beträgt etwa 5—10 Tage.
- d) Der *Micrococcus* konnte nicht gezüchtet werden, wenn als einzige Sauerstoffquelle der atmosphärische Sauerstoff zugegen war. (Ein orientierender Versuch deutet darauf hin, daß anaerobes Wachsen möglich ist.)
- e) Beim Züchten an der Luft können folgende Stoffe unter gleichzeitiger intrazellulärer Reduktion Wachstum hervorrufen: Natriumselenit, Natriumthiosulfat, Natriumselenat (Spuren), Indigkarmin, Methylenblau und Lackmus. Unwirksam sind: Kaliumnitrat, Sulfate, Natriumsulfit, Kaliumsulfid, Natriumselenid, Kaliumtellurit.
- f) Als oxydierbare Verbindungen können die Kohlenstoffquellen, wahrscheinlich aber auch das Natriumselenid benutzt werden. Wenn das Selenid (zugleich mit Natriumselenit) geboten wird, ist das Wachstum unverhältnismäßig kräftiger.
- g) Bei Anwesenheit von Selenid (neben dem Selenit), wo nach meiner Deutung eine Schonung der Kohlenstoffnahrung als Energiequelle ermöglicht wird, sind die geprüften Kohlenstoffquellen (Aufbaustoffe) in nachstehender Reihenfolge günstig: Äthylalkohol, Iso-Butylalkohol, Asparagin, Methylalkohol, Iso-Amylalkohol, Dextrose. Untauglich waren: Pepton, Fleischextrakt, Erbsendekokt, sowie das Kohlendioxyd und gewöhnliche organische Verbindungen der Luft. Bei Abwesenheit von Selenid (die C-Nahrung dient in vollem Umfange sowohl als Energiequelle als auch als Baumaterial) war die Reihenfolge: Asparagin, Dextrose, Äthylalkohol,

Iso-Butylalkohol, Iso-Amylalkohol, Fleischextrakt (Spuren?). Untauglich waren Pepton, sowie das Kohlendioxyd und die gewöhnlichen organischen Verunreinigungen der Luft. In beiden Fällen wurde Natriumselenit als Wachstumserreger (Sauerstoffquelle) benutzt.

3. Ferner wurde aus derselben Schlammprobe noch eine Kurzstäbchen-Bakterie isoliert, die auf ziemlich stark natriumselenidhaltigem Nährboden und mit sehr wenig Kohlenstoffnahrung wuchs, sich aber sonst nicht von dem Typus der gewöhnlichen Aeroben unterschied.

Zum Schluß sei es mir erlaubt, Herrn Geheimen Rat Prof. Dr. W. Pfeffer, auf dessen Anregung und in dessen Institut zu Leipzig diese Arbeit ausgeführt wurde, meinen ergebensten Dank für seine wohlwollende Unterstützung auszusprechen. Auch den Herren Prof. Dr. H. Miede und Privatdozent Dr. J. Buder bin ich zu bestem Dank verpflichtet.

Literatur-Verzeichnis.

- Beijerinck, M. W., Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfatreduktion. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 1 (1895), S. 1, 49, 104.
- —, Über Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 11 (1904), S. 593.
- Beijerinck, M. W. und van Delden, A., Über eine farblose Bakterie, deren Kohlenstoffnahrung aus der atmosphärischen Luft herrührt. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 30 (1903), S. 33.
- Burri, R. und Stutzer, A., Über Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 1 (1895), S. 257, 350 u. 422.
- Chabrie, C. und Lapique, L., Sur l'action physiologique de l'acide selenieux. Compt. rend., T. 110 (1890), p. 152.
- Van Delden, A., Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 11 (1903), S. 81 u. 113.
- Gehring, A., Beiträge zur Kenntnis der Physiologie und Verbreitung denitrifizierender Thiosulfat-Bakterien. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 42 (1914), S. 402.
- Gloger, R., Kalium tellurosum in der Medizin und Hygiene. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 40 (1906), S. 584.
- Gosio, B., Indikatoren des Bakterienlebens und ihre praktische Bedeutung. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 51 (1905), S. 65.

- Jacobsen, H. C., Die Oxydation von elementarem Schwefel durch Bakterien. *Folia Microbiologica*, Bd. I (1912), S. 487 und Bd. III (1914), S. 155.
- Keil, F., Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. *Cohns Beiträge*, Bd. 11 (1912), S. 335.
- Klett, A., Zur Kenntnis der reduzierenden Eigenschaften der Bakterien. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. 33 (1900), S. 137.
- Lieske, R., Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Schwefelbakterien. *Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.*, Bd. 30 (1912), S. (12).
- Maaßen, A., Die biologische Methode Gosios zum Nachweis des Arsens und die Bildung organischer Arsen-, Selen- und Tellurverbindungen durch Schimmelpilze und Bakterien. *Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, Bd. 18 (1901), S. 475.
- —, Über das Reduktionsvermögen der Bakterien und über reduzierende Stoffe in pflanzlichen und tierischen Zellen. *Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, Bd. 21 (1904), S. 377.
- Nathansohn, A., Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. *Mitteil. a. d. Zoolog. Station zu Neapel*, Bd. 15 (1902), S. 655.
- Oppenheimer, C., *Die Fermente*, Aufl. IV.
- Pfeffer, W., Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. *Tübinger Untersuchungen*, Bd. 2 (1886—88), S. 179.
- —, *Pflanzenphysiologie*, Aufl. II.
- Pollacci, G., Sulla bioreazione del tellurio e sulla sua applicazione pratica agli studi di fisiologia e di patologia vegetale. *Atti dell' Inst. Bot. dell' Università di Pavia*, Vol. 15, Ser. II (1914), p. 281.
- Scheurlen, Die Verwendung der selenigen und tellurigen Säure in der Bakteriologie. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. 33 (1900), S. 135.
- Winogradsky, S., Über Schwefelbakterien. *Bot. Ztg.*, Bd. 45 (1887), S. 489 und *Beiträge z. Morphologie u. Physiologie d. Bakterien*, 1888, Heft 1.
-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik](#)

Jahr/Year: 1917

Band/Volume: [57](#)

Autor(en)/Author(s): Brenner Widar

Artikel/Article: [Züchtungsversuche einiger in Schlamm lebenden Bakterien auf selenhaltigem Nährboden. 95-127](#)