Über Stickstoffbakterien.

Mit Tafel II.

Vortrag, gehalten auf der 62. Generalversammlung des Naturhistorischen Vereins zu Coblenz.

Von

Dr. Hugo Fischer,

Privatdozenten der Botanik, Bonn.

Nach den glänzenden Entdeckungen von Rob. Koch und derer, die ihm nachfolgten, war die Bakterienkunde auf dem besten Wege, eine rein medizinische Wissenschaft zu werden. Doch hat sich in aller Stille ein Umschwung vorbereitet, und heut wissen wir soviel bereits sicher, daß in Hinsicht auf unser Wohl und Wehe, wie auf den gesamten Kreislauf der belebten Natur, eine Reihe von Mikroorganismen ein weit höheres Interesse beansprucht, als die pathogenen Spaltpilze, die uns doch glücklicherweise nur zuweilen heimsuchen, während jene anderen tagaus tagein zu unserm Nutzen oder Schaden tätig sind.

Zumal die für das Pflanzenwachstum, und damit für die Ernährung von Mensch und Tier so überaus wichtigen Umwandlungen und Umsetzungen der organischen Substanzen im Ackerboden, insbesondere der Kreislauf des Kohlenstoffes und in noch höherem Maße der des Stickstoffes sind an Bakterientätigkeit gebunden. Die hier obwaltenden Verhältnisse sind in einigen Hauptpunkten klargestellt, eine große Reihe von theoretisch wie praktisch höchst wichtigen Fragen harrt noch der Lösung.

Für den Anbau unserer Kulturgewächse ist von allergrößter Bedeutung die Frage: Wie führen wir dem Boden diejenigen Stickstoffmengen zu, die er für eine gute Ernte benötigt? In dieser Haupt- und Kardinalfrage kommen dem Landwirt gewisse Bakterien zu Hilfe, nach unserer Kenntnis die einzigen Wesen, die befähigt sind, den molekularen Stickstoff aus der Luft aufzunehmen und zu verwerten — zunächst zwar nur zum Aufbau ihrer Leibessubstanz; doch kommt der so gewonnene Stickstoff auch dem Boden und damit dem Pflanzenwuchs zugute.

Seit rund 20 Jahren kennen wir das symbiotische Verhältnis, in welchem die Hülsenfrüchte zu ihren Knöllchenbakterien stehen, — ein Verhältnis, das eben darin beruht, daß die zunächst von der Pflanze ernährten Bakterien den atmosphärischen Stickstoff assimilieren und zu Eiweiß verarbeiten, von welchem dann die grüne Pflanze zehrt. Daß es auch freilebende Spaltpilze gibt, welche den Stickstoff aufzunehmen und den Boden damit anzureichern imstande sind, ist eine neuere Erfahrung.

Nach unserer bisherigen Erkenntnis scheint unter allen der wichtigste derjenige Organismus zu sein, den Beijerinck im Jahre 1901 beschrieben und Azotobakter Chroococcum benannt hat.

Schon morphologisch und systematisch ist dieser Organismus höchst interessant. Er gehört zweifellos zu den Kugelbakterien oder Coccaceen, unter denen er sich durch seine beträchtliche Größe, von 2—5 µ Durchmesser, auszeichnet. Wie in der Größe, ist er auch im übrigen Aussehen äußerst veränderlich. Häufig, aber nicht immer, besitzt er eine deutliche Gallerthülle [Fig. 2—4], durch die er wie eine farblose Form gewisser Cyanophyceen erscheint; unter diesen erinnert er am meisten an die Gattung Aphanocapsa. Doch besitzen meist nur kleinere Zellgruppen, von 4 oder höchstens 8 Zellen, eine deutliche gemeinsame Hülle; sie können aber durch die verschleimende Membran zu größeren Klumpen oder Häuten zusammenhängen [Fig. 4]. In gewissen jüngeren Entwickelungszuständen sind die Gallerthüllen sehr dick [Fig. 2], die Zellen dafür auffallend

klein, selbst bis gegen 1 μ herunter; ältere Zellen sind größer, mit viel dünnerer Membran. In angetrockneten and gefärbten Präparaten erscheint die Gallerthülle oft strahlig oder sternförmig. Die kugeligen Zellen teilen sich ohne vorherige Längsstreckung, wie das für die Coccaceen als Regel gilt. Die Teilungen gehen nacheinander nach allen drei Richtungen des Raumes vor sich, so daß jene charakteristischen Pakete [Fig. 3, 4] entstehen, von welchen die Kokkengattung Sarcina ihren Namen hat. In sehr jungen Aussaaten findet man aber ganz anders aussehende Zellen; solche sind deutlich länglich elliptisch, in der Teilungsrichtung gestreckt, zuweilen bis 6 µ lang, doch auch weit kleiner, stets eipzeln oder höchstens paarweise zusammenhängend [Fig. 1]. Von einer Gallerthülle ist an solchen Zellen nichts zu hemerken. Sie zeigen eine nicht sehr lebhafte und bald vorübergehende Eigenbewegung; wie bereits Beijerinck gezeigt hat, mittels je einer langen und dünnen Geißel. Nach dem soeben gesagten kann dieses Schwärmstadium in der Zellvermehrung ganz ausfallen.

Sehr merkwürdig ist fernerhin eine dritte Erscheinungsform unseres Azotobakter: er kann sich auch ganz nach Art eines Streptococcus vermehren, indem sich die Zellen fortgesetzt nur nach einer Richtung teilen; dadurch entstehen perlschnurförmige Ketten von vier, acht oder sechzehn Zellen [Fig. 5]. In diesem Streptokokkenzustand fehlt die Gallerthülle fast vollständig. Fast wird es schwer zu glauben, daß alle diese Formen: Pakete mit dicken und mit dünnen Gallerthüllen, die Schwärmer und die Ketten alle zu einer Art gehören sollen, und doch sprechen alle Beobachtungen dafür, daß es in der Tat so ist.

So fremdartig gerade die Perlenschnüre gegenüber den oben beschriebenen Paketen aussehen, so gehören sie doch sicher in den Formenkreis der gleichen Spezies: oft findet man solche, deren Zellen sich eben quer zu der bisherigen Richtung zu teilen beginnen, oder man sieht acht oder sechzehn in einer Reihe liegende Pakete, ihrerseits aus acht, sechzehn oder mehr Zellen bestehend, die

durch ihre gegenseitige Lage deutlich verraten, wie sie durch Sarcinateilung (vgl. o.) aus einer Kette hervorgegangen sind [Fig. 6, 7, 8].

Die Streptokokkenform, die sowohl in wässrigen Lösungen, als auch auf festen Nährböden (Agar, Gipsplatten) auftreten kann, stets aber in den jüngeren Aussaaten, gehört also ebensogut in den Entwicklungsgang des Azoto. bakter Chroococcum, wie die anderen erwähnten Formen Diese Tatsache ist von Interesse in Hinblick auf das System der Spaltpilze. Die Systematik dieser allerkleinsten und allereinfachsten Organismen stößt, sohald sie mehr als einen Katalog liefern, wenn sie die natürliche Verwandtschaft der Lebewesen zum Ausdruck bringen will, auf ganz besondere Schwierigkeiten; vielfach ist man auf die "physiologischen Merkmale" angewiesen, die aber naturgemäß am allerehesten einer anpassenden Veränderung unterliegen können, für die Systematik also von recht bedenklichem Werte sind. Gerade die Gattungen Strepto. coccus und Sarcina standen aber bisher als völlig gesicherte und deutlich getrennte Typen einander gegenüber - hier sehen wir auch diese Grenze verwischt1), sehen eine und dieselbe Art in den beiden so verschieden aussehenden Erscheinungsformen auftreten. Übrigens kommt auch Teilung nach zwei Richtungen, in einer Ebene vor, so daß tafelförmige Kolonien entstehen, wie sie (in Migula's System) die Gattung Micrococcus charakterisieren; Azotobakter vereinigt also alle drei Hauptgattungen der Kugelbakterien in einer Art, dazu noch die (unsicheren) Gattungen Planococcus und Planosarcina.

Dazu kommt, daß zwei neuerdings aus Nordamerika bekannt gewordene Arten von Azotobakter die beiden extremen Typen getrennt zeigen: an der einen, A. Vinelandii, sind bisher nur Sarcinaformen beobachtet, die andere A. Beijerinckii, scheint fast nur in Gestalt von Ketten vor-

¹⁾ Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß nun die beiden Gattungen in eine zusammengeworfen werden müßten

zukommen [Fig. 9]; wenigstens habe ich unter zahlreichen Proben des letzteren nur einmal in einer älteren, aber noch üppig wachsenden Kultur einige wenige Gruppen gesehen, welche deutlich das Übergehen von der Kettenform zur Paketform erkennen ließen. Die aus physiologischen Gründen allein nicht aufrecht zu erhaltende "Gattung" Azotobakter erhält durch diese Tatsachen, die ihre Zwischenstellung zwischen Streptococcus and Sarcina andeuten, erst ihre tiefere Berechtigung.

Im Zellinhalt kann man zwei Dinge unterscheiden: in allen Zellen ein Netzwerk, in älteren Zellen einzelne Körnchen; beide sind deutlich verschieden und durch Farbreaktionen sichtbar zu machen. Das Netzwerk [Fig. 10] erfüllt das Zellinnere bis an die Peripherie, durch Verdickung der Ecken kann es das Bild einzelner Körnehen vortäuschen, doch ist es bei genauem Zusehen mittels starker Vergrößerung (Öl Immersion 1000 fach) stets deutlich als Wabengerüst zu erkennen. Es färbt sich mit den verschiedensten Anilinfarben: Fuchsin, Eosin, Methylenblau, Thionin, Malachiterun, Bismarckbraun etc., und tritt deutlich zum Vorschein, wenn man die Präparate mit Wasser auswäscht; es färbt sich auch gut nach der Methode Heidenhains mit Ammonium-Eisenoxydsulfat und Haematoxylin. Schließt man das an der Luft getrocknete Objekt in Canadabalsam ein, so erhält man vortreffliche Dauerpräparate. Zuweilen sieht man dicke, kugelige Zellen, beträchtlich über den normalen Durchmesser hinausgehend, die keine Körnchen, das Netz jedoch sehr deutlich zeigen; jedenfalls sind es Involutionsformen besonderer Art (vgl. u.).

Die erst in älteren Zellen auftretenden Körnchen geben die von Arthur Meyer¹) angegebene "Volutin-Reaktion": mit Methylenblau gefärbt und mit einprozentiger Schwefelsäure ausgewaschen, bewahren sie allein die

¹) Arthur Meyer, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903. S. 81.

Färbung und erscheinen als tief schwarzblaue, scharf begrenzte Kügelchen [Fig. 12]. Mittels alkalischer Methylenblaulösung 1 kann man sie "metachromatisch" färben, d. h. sie speichern dann jenes tiefrote Zersetzungsprodukt des Methylenblaus das als "Nocht'sches Rot" oder als "Rot aus Methylenblau" in der medizinischen Bakteriologie (z. B. zur Diffe, renzierung der Malaria-Parasiten) vielfach verwendet wird Zuweilen erhielt ich so auch Rotfärbung nach der erwähnten Auswaschung mittels verdünnter Schwefelsäure. man die mit alkalischem Methylenblau gefärbten Objekte gut mit starkem Alkohol oder mit Nelkenöl auswäscht und darauf in Kanadabalsam einschließt, sieht man sie als dunkelrote Punkte in der blau gefärbten Zelle [Fig. 11]. Auch in Glyzeringelatine erhielt ich zuweilen eine dauernde Rotfärbung der Körnchen. Diese sind höchst wahrscheinlich eine Nukleïnverbindung, aber nicht das, was der Kern in den Zellen höherer Organismen ist. Sehr reichlich erscheinen sie in manchen Degenerations- oder Involutionsformen; ihre Menge und ihre Neigung, sich nach der angegebenen Methode rot zu färben, ist um so größer, je weiter die Zelle degeneriert ist.

Solche Involutionsformen des Azotobakter Chroococcum kommen in verschiedener Art vor; die erwähnten dicken Kugeln hat schon Beijerinck a. a. O. beschrieben und dargestellt (ähnlicher Gebilde erwähnt Lipman von seinem Azotobakter Vinelandii). Ich beobachtete eine andere, viel auffallendere Form: schlauchförmige, dick angeschwollene Zellen von unregelmäßig gekrümmter Gestalt [Fig. 13, 14]. Diese Involutionsformen habe ich bisher nur in Mischkolonien auf Agarplatten beobachtet. Azotobakter ist, wenn einmal verunreinigt, schwierig wieder in Reinkultur zu gewinnen; vermutlich haften die viel kleineren Keime anderer Spaltpilze besonders fest an seinen Gallerthüllen, von welchen

¹) 1 g Methylenblau und 0,5 g kryst. Soda in 100 ccm Wasser, nach längerem Stehen oder nach 24 stündigem Erwärmen auf 60-80° zu benutzen.

sie durch Schütteln nur schwer zu trennen sind. So trat auf den Agarplatten häufig ein kleiner, beweglicher Bazillus in Kolonien von halbkugeliger Form, von anfangs glashellem, später gelblich getrübtem Aussehen auf; in solchen Kolonien nun, die diesen Bazillus neben dem Azotobakter enthielten, erschienen nach einiger Zeit jene Involutionsformen. Ähnliche Gestalten, nur mehr schlauch-, weniger keulenförmig, dafür aber von beträchtlicher Länge [Fig. 15], fand ich in Reinzuchten des A. Beijerinckii, wo sie also auf fremdartige Einwirkung, wie jene, nicht zurückzuführen sind.

Soviel von der Morphologie und Systematik der merkwürdigen Gattung Azotobakter, die unsere Aufmerksamkeit jedoch in noch viel höherem Maße verdient durch ihre physiologischen Eigenschaften.

Unter diesen steht die Fähigkeit, den atmosphärischen stickstoff an sich zu ziehen und zu verarbeiten, natürlich obenan; diese Fähigkeit ermöglicht es ihm, in einem völlig oder fast völlig stickstofffreien Nährboden, der außer einem Kohlenliydrat (am besten Mannit, aber auch Glukose, Glyzerin od. dergl.) nur etwas Kaliumphosphat und Calciumkarbonat enthält, aufs üppigste zu gedeihen. Der ausgesprochen aërophile Organismus wächst von allen künstlichen Substraten am besten auf Gipsplatten, die mit obiger Nährlösung durchtränkt sind. Unter solchen besonders günstigen Bedingungen konnte eine Stickstoffaufnahme bis zu 180 mg für jeden verbrauchten Liter einer zweiprozentigen Mannitlösung festgestellt werden. In einem gut durchlüfteten Ackerboden dürfte seine assimilierende Tätigkeit schwerlich geringer sein; hier dürfte er das unentbehrliche, kohlenstoffhaltige Nähr- und Atemmaterial hauptsächlich von solchen Spaltpilzen geliefert bekommen, welche Cellulose u. dgl. hydrolysieren - selbst ist er dazu nicht imstande, nur gewisse Pektinverbindungen haben sich ihm als zugänglich erwiesen. Sehr gern und häufig scheint er mit bodenbewohnenden niederen Algen vergesellschaftet vorzukommen; wenigstens konnte ich ihn stets auffallend rasch und in großen Mengen züchten, wenn ich flach abgehobene Rasen von Oscillaria mit Mannitlösung überschichtete. Es scheint hier ein ähnliches, nur minder enges Verhältnis auf Gegenseitigkeit zu bestehen, wie zwischen Flechtenpilz und Flechtenalgen: die Oscillaria liefert dem Azotobakter Kohlenhydrate und empfängt dafür von ihm gebundenen Stickstoff. Mit meiner Beobachtung erklärt sich wohl die früher aufgetretene, als irrtümlich erkannte Behauptung, daß Oscillarien selbst fähig wären, molekularen Stickstoff zu verarbeiten.

Übrigens ist auch Azotobakter für gebundenen Stickstoff durchaus nicht undankbar; er gedeiht, wie schon Beijerinck betont und wie ich bestätigt fand, sehr gut, wenn man seiner Nährlösung 0,1 Prozent Kaliumnitrat zusetzt; Ammoniumsulfat bekommt ihm schon weniger gut, Pepton in gleicher Dosis ermöglicht nur ein geringes Wachstum; auf Gelatine wächst er sehr schlecht oder gar nicht.

Bezüglich seines Verhaltens in verschiedenartigen Böden konnte ich eine nicht unwichtige Beobachtung machen, zu welcher mir ein von Wohltmann auf dem Poppelsdorfer Versuchsfelde seit 1894 unterhaltener "spezifischer Düngungsversuch" Anlaß bot. Hier haben siebzehn Bodenstreifen Jahr für Jahr die gleiche, jeder einzelne aber eine andere Düngung erhalten. Der schwere, nährstoffarme Lehmboden enthält nur sehr wenig Kalk. in der obersten Schicht nur etwa 0,06 Proz. im Durchschnitt. Dieser geringe Kalkgehalt reicht augenscheinlich zu einer ausgiebigen Entwicklung des Azotobakter nicht hin. Aus den sechs Streifen, welche Kalkdüngung erhalten hatten, ging er in entsprechend beschickten Zuchtgefäßen üppig auf. Von den elf anderen aber, die ungekalkt geblieben waren, ließen neun ihn vollständig vermissen. In zwei Beeten der letzteren Kategorie war er jedoch gerade ganz besonders reichlich vorhanden, was mich anfänglich stutzig machte, doch fand das Rätsel bald seine Lösung: diese beiden Streifen sind am äußersten Rande des Versuchsfeldes gelegen und sind durch ein

anstoßendes, ebendort seine Grenze erreichendes Lößlager von Natur schon kalkhaltiger als die übrigen. Ein Vergleich vorliegender Analysenzahlen läßt darauf schließen, daß unter den gegebenen Verhältnissen ein Kalkgehalt von 0,1 Proz. CaO die untere Grenze ist, bis zu welcher der Azotobakter eine reichere Entwicklung finden und eine ausgiebige Tätigkeit entfalten kann. In Kulturen, die ihm sonst günstigste Nährbedingungen bieten, kommt er auch mit geringerem Kalkgehalt aus. Eine obere Grenze des Kalkgehaltes scheint für unseren Azotobakter nicht zu existieren.

Bei beginnendem Wassermangel geht der Azotobakter zur Sporenbildung (i. w. S.) über. Es kommt nicht zur sichtbaren Abwerfung einer äußeren Membran, wie bei den Stäbchen-Bakterien, sondern die ganze Zelle wird zur Dauerform, welche nachweislich mehr als ein Jahr lang lufttrocken liegen kann, ohne zugrunde zu gehen. In frische Nährlösung gebracht, keimt sie bald wieder aus; so viel ich beobachten konnte, wird auch dabei keine Sporenmembran abgeworfen.

Über die Art und Weise, wie sich nun im Boden die Wirksamkeit des Azotobakter bez. anderer Stickstoffbakterien gestaltet, läßt sich zur Zeit noch kaum etwas genaues sagen. So viel ist ja wohl gewiß, daß sie ein sehr stickstoffarmes Substrat mit Stickstoff anreichern werden. Sobald der Boden aber größere Mengen von Stickstoff enthält, machen sich auch Verluste daran bemerklich: teils durch Nitrifikation und die nachfolgende unvermeidliche Auswaschung der Nitrate, teils durch Vorgänge der Denitrifikation, der Zersetzung der Nitrate unter Entbindung von gasförmigem Stickstoff. Und wie nun der Kalk das Gedeihen des Azotobakter sichtlich fördert, so begünstigt er auch jene beiden anderen Gruppen von Spaltpilzen (die nitrifizierenden und die denitrifizierenden) und damit die Stickstoffverluste. Es scheint, als ob die stickstoffmehrenden und die stickstoffzehrenden Mikroben einem gewissen Gleichgewichtszustande zustrebten, der durch künstliche Stickstoffzufuhr nur vorübergehend verschoben werden kann und bald wieder erreicht wird. Vielleicht gelingt es weiteren Forschungen, die Bedingungen aufzufinden, unter welchen eine vorhaltende Steigerung des Stickstoffgehaltes im Boden erreicht werden kann; das wenige, was wir bisher über das Zusammenleben der Mikroorganismen im Boden wissen, reicht zur Beautwortung dieser Frage nicht aus.

Ehe man den Azotobakter kannte, war der Gedanke angeregt und auch zur mißglückten Ausführung gebracht worden, durch Einführung stickstoffsammelnder Bakterien den Boden zu verbessern. Jedoch abgesehen davon, daß der dafür empfohlene Spaltpilz, der Bacillus Ellenbachensis gar nicht freien Stickstoff assimiliert, war ein Versuch in dieser Richtung von vornherein nicht sehr aussichtsvoll Bei der großen Verbreitungsfähigkeit der Bakterienkeime ist anzunehmen, daß ein jeder Boden diejenigen Spaltpilze bereits enthält, die sich in ihm entwickeln können: die aber die Bedingungen ihres Gedeihens nicht vorfinden. werden auch nach künstlicher Zuführung früher oder später wieder zugrunde gehen. Das illustriert uns die ohen mitgeteilte Beobachtung aus dem spezifischen Düngungsversuch: die gekalkten und die ungekalkten Streifen liegen abwechselnd nebeneinander, der Wind muß die Keime des Azotobakter von einem zum andern tragen, und trotzdem war dieser in den kalkarmen Böden nicht nachzuweisen, in den kalkreicheren fand er sich in Menge vor, ohne daß er jemals künstlich hineingebracht worden wäre.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im bakteriologischen Laboratorium des Instituts für Bodenlehre und Pflanzenbau (Direktor: Prof. Dr. Th. Remy) an der Landwirtschaftlichen Akademie Bonn-Poppelsdorf ausgeführt.

Figurenerklärung.

Sämtliche Aufnahmen sind in 1000:1 photographiert. Es diente dazu die Horizontal-Vertikal-Kamera von Zeiß, Objektiv für homogene Immersion von 3 mm Brennweite, 1,40 Apertur und Kompensations-Okular 8.

Alle außer 9 und 15 beziehen sich auf Azotobakter Chroo-

coccum aus dem Poppelsdorfer Versuchsfeld.

Fig. 1. Sehr jugendliches Stadium, Zellen einzeln oder paarweise, ohne Gallerthülle, Inhalt wenig differenziert. Färbung: Malachitgrün.

Fig. 2. Zellen mit abnorm dicken Gallerthüllen; Färbung:

Methylenblau.

Fig. 3 und 4. Häufigste Wuchsform, kleinere und größere Pakete, mit Gallertmembran mittlerer Dicke; ungefärbt.

Fig. 5. Streptokokken-Form; inmitten der längeren Kette beginnende Querteilung; Färbung: alkalisches Methylenblau.

Fig. 6, 7, 8. Übergänge von der Streptokokken- zur Sarcina-Form. Färbung w. o.

Fig. 9. Azotobakter Beijerinckii, normale Wuchsform. Färbung w. o.

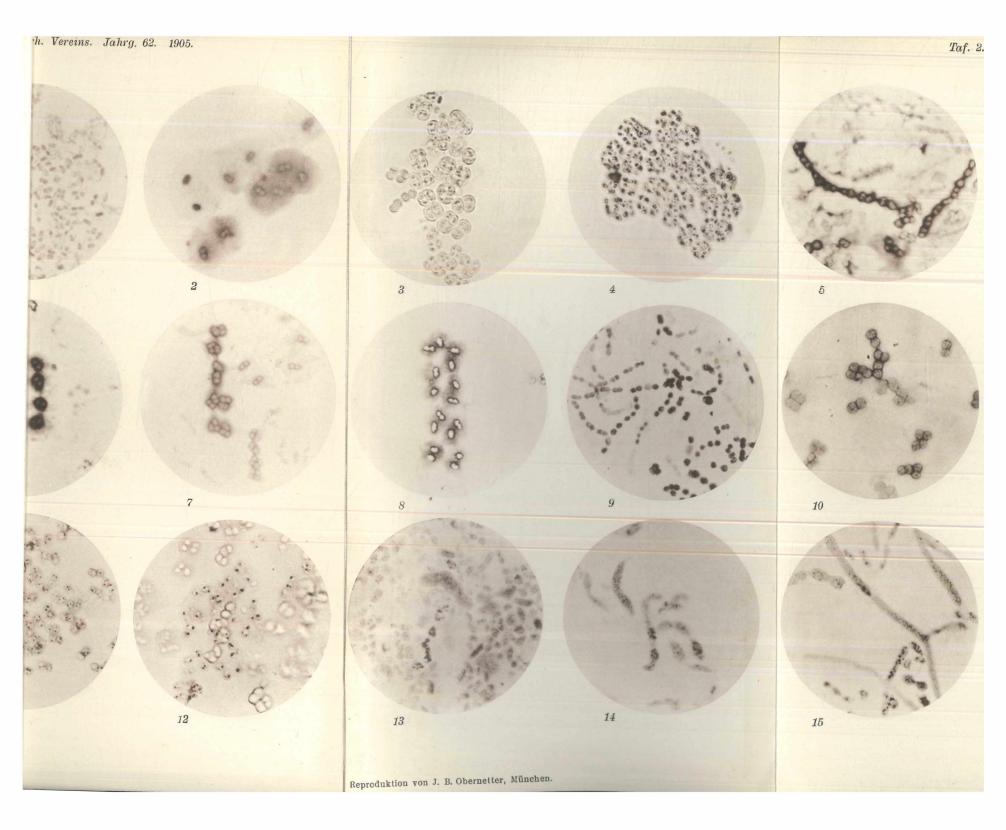
Fig. 10. Az. Chroococcum, Netzwerk innerhalb der Zellen. Färbung w. o.

Fig. 11. Metachromatische Körnchen in den Zellen. Färbung w. o.; Balsampräparat.

Fig. 12. Desgl., nach A. Meyer mit 1 proz. Schwefelsäure behandelt, Körnchen tiefblau. Präparat in Wasser, daher nicht alle Zellen in einer Ebene.

Fig. 13 und 14. Involutionsformen aus Mischkultur, Färbung alkalisches Methylenblau. In 13 die größte Zelle ziemlich diffus blau, daneben drei kleinere mit sehr undeutlicher Membran, dicht mit metachromatischen Körnchen erfüllt.

Fig. 15. Involutionsformen von Azotobakter Beijerinckii; Färbung w. o.



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen des naturhistorischen

Vereines der preussischen Rheinlande

Jahr/Year: 1905

Band/Volume: 62

Autor(en)/Author(s): Fischer Hugo

Artikel/Article: Über Stickstoffbakterien 135-145